

ISSN 0023-4761

Том 68, Номер 6

Ноябрь - Декабрь 2023



КРИСТАЛЛОГРАФИЯ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 68, номер 6, 2023

Колонка главного редактора 843

ОБЗОРЫ

Структурные основы взаимодействия протонного М2-канала вируса гриппа А с противовирусными лекарственными препаратами адамантанового ряда
А. А. Лашков, Т. М. Гараев, С. В. Рубинский, В. Р. Самыгина 845

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Предварительное рентгеновское исследование кристаллов, полученных при сокристаллизации гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы из *Escherichia coli* и производных пиразин-2-карбоксамида

Ю. А. Абрамчик, Е. А. Заяц, В. И. Тимофеев, М. Б. Шевцов, М. А. Костромина,
И. В. Фатеев, Д. О. Юровская, А. А. Каранов, И. Д. Константинова,
И. П. Куранова, Р. С. Есипов 854

Влияние возвращения CuS11 на структуру и функцию $\text{S11C CuS-free Nt.BspD61}$
Р. И. Артюх, Б. Ф. Фатхуллин, В. Н. Антипова, Т. А. Перевязова,
Г. С. Качалова, А. К. Юнусова 859

Получение и кристаллографический анализ комплекса рецепторсвязывающего домена SARS-CoV-2 и вируснейтрализующего наноантитела
К. М. Бойко, Л. А. Варфоломеева, Н. А. Егоркин, М. Е. Миняев, И. А. Алексеева,
И. А. Фаворская, Е. И. Рябова, В. В. Прокофьев, И. Б. Есмагамбетов,
Д. В. Щебляков, Д. Ю. Логунов, А. Л. Гинцбург, В. О. Попов, Н. Н. Случанко 866

Исследования структуры приона Sup35 из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* методом электронной микроскопии
А. Д. Бурцева, А. В. Моисеенко, Т. Н. Баймухаметов, А. А. Дергалева,
К. М. Бойко, В. В. Кушников 874

Исследования структуры светособирающего пигмент-белкового комплекса LH2 из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* методом криоэлектронной микроскопии
А. Д. Бурцева, Т. Н. Баймухаметов, И. О. Илясов, М. А. Большаков,
А. А. Москаленко, К. М. Бойко, А. А. Ашихмин 881

Улучшение дифракционных свойств кристаллов тиоцианатдегидрогеназы
Л. А. Варфоломеева, К. М. Поляков, А. С. Комолов, Т. В. Ракитина,
Н. И. Дергоусова, П. В. Дороватовский, К. М. Бойко, Т. В. Тихонова,
В. О. Попов 888

Ab initio-форма супрамолекулярных комплексов кукурбит [8]урилы в растворе по данным малоуглового рентгеновского рассеяния
В. В. Волков, В. А. Лившиц, Б. Б. Мешков, В. Е. Асадчиков 894

Влияние микрогравитации на кристаллизацию кардиотоксина из яда очковой кобры *Naja naja*
К. М. Дубова, П. В. Дубовский, Ю. Н. Уткин, В. Р. Самыгина 902

Структура белка Hfq из *Chromobacterium haemolyticum* выявила новый вариант регуляции связывания РНК с белком
Н. В. Леконцева, А. Д. Никулин 907

Сравнительное структурное исследование гистоноподобных белков НУ методом малоуглового рентгеновского рассеяния
М. В. Петухов, Т. В. Ракитина, Ю. К. Агапова, Д. Е. Петренко, П. В. Конарев,
В. В. Бритиков, Е. В. Бритикова, Э. В. Бочаров, Э. В. Штыкова 914

Предварительное рентгеноструктурное исследование пуриннуклеозидфосфорилазы из галоалкалофильной бактерии *Halomonas chromatireducens*
Т. Н. Сафонова, А. Н. Антипов, В. П. Вейко, Н. Н. Мордкович, Н. А. Окорокова,
П. В. Дороватовский, К. М. Поляков 922

Получение и кристаллизация рекомбинантного пикорнаина 3С риновируса A28 <i>А. Е. Тишин, А. В. Гладышева, Л. А. Пятавина, С. Е. Олькин, А. А. Гладышева, И. Р. Имамдинов, А. В. Власкина, А. Ю. Николаева, В. Р. Самыгина, А. П. Агафонов</i>	926
Кристаллическая структура комплекса трансаминазы D-аминокислот из бактерии <i>Aminobacterium colombiense</i> с D-цикloserином <i>С. А. Шилова, И. О. Матюта, Е. Ю. Безсуднова, М. Е. Миняев, А. Ю. Николаева, В. О. Попов, К. М. Бойко</i>	934

ДИФРАКЦИЯ И РАССЕЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

Определение формы спиральной частицы по данным малоуглового рентгеновского рассеяния: модификация алгоритма “имитации отжига” <i>В. А. Григорьев, П. В. Конарев, В. В. Волков</i>	941
Восстановление профилей интенсивности малоуглового рассеяния от двух конформационных состояний 3-изопропилмалатдегидрогеназы с помощью эволюционного факторного анализа <i>П. В. Конарев, В. В. Волков</i>	946

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Исследование предкристаллизационного раствора лизоцима методом ускоренной молекулярной динамики <i>А. С. Ивановский, И. Гарипов, Ю. В. Кордонская, В. И. Тимофеев, М. А. Марченкова, Ю. В. Писаревский, Ю. А. Дьякова, М. В. Ковальчук</i>	951
Применение кристаллической структуры спайкового белка SARS-CoV-2 для разработки пептидной противовирусной вакцины <i>А. С. Ивановский, И. А. Колесников, Ю. В. Кордонская, А. В. Ермаков, М. А. Марченкова, В. И. Тимофеев, Ю. В. Писаревский, Ю. А. Дьякова, М. В. Ковальчук</i>	955
Поиск новых потенциальных Т- и В-клеточных эпитопов в спайковом белке SARS-CoV-2 <i>И. А. Колесников, В. И. Тимофеев, М. В. Николенко, А. В. Ермаков, А. С. Ивановский, Ю. А. Дьякова, Ю. В. Писаревский, М. В. Ковальчук</i>	959
Поиск потенциальных эпитопов в оболочечном белке вируса африканской чумы свиней <i>И. А. Колесников, В. И. Тимофеев, А. В. Ермаков, А. С. Ивановский, Ю. А. Дьякова, Ю. В. Писаревский, М. В. Ковальчук</i>	971
Применение данных белковой кристаллографии и машинного обучения для разработки пептидной вакцины против африканской чумы свиней <i>А. С. Ивановский, И. А. Колесников, Ю. В. Кордонская, А. В. Ермаков, М. А. Марченкова, В. И. Тимофеев, Ю. В. Писаревский, Ю. А. Дьякова, М. В. Ковальчук</i>	979
Влияние плазменной обработки биомедицинских матриц на адгезию нейрональных клеток <i>А. М. Азиева, Е. В. Ястремский, Д. А. Кириллова, Т. Д. Пацаев, А. А. Михуткин, Р. В. Шариков, Р. А. Камышинский, К. И. Луканина, Н. А. Шарикова, Т. Е. Григорьев, А. Л. Васильев</i>	983

ПОВЕРХНОСТЬ, ТОНКИЕ ПЛЕНКИ

Структурная реорганизация моделей клеточных мембран под действием противоопухолевого антибиотика доксорубина <i>Н. Н. Новикова, М. В. Ковальчук, А. В. Рогачев, Ю. Н. Малахова, Ю. О. Котова, С. Э. Гельперина, С. Н. Якунин</i>	990
--	-----

НАНОМАТЕРИАЛЫ

Минерализация карбонатом кальция оболочек эмульсионных полиэлектролитных микрокапсул <i>А. В. Бусленко, Т. В. Букреева, А. П. Чистяков, М. А. Ванцян, Д. Б. Трушина, Е. Д. Никольская, М. Р. Моллаева, Н. Г. Яббаров, М. Б. Сокол</i>	1002
---	------

КОЛОНКА ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

DOI: 10.31857/S0023476123700327, EDN: XSEBLK

Уважаемые читатели!

Представляем вашему вниманию тематический выпуск, посвященный работам российских исследователей в области структурной биологии.

Структурная биология — междисциплинарная наука, изучающая биомолекулы на уровне трехмерных структур и их динамики. Объектами изучения являются белки, нуклеиновые кислоты, а также сложные макромолекулярные комплексы. Изучение структуры и ее динамических изменений позволяет понять детали механизма функционирования биологических молекул и использовать эти знания для разработки новых лекарственных средств и усовершенствования уже существующих, разработки экономически целесообразных биотехнологических цепочек. Структурная биология включает в себя экспериментальные и вычислительные методы, а также использует результаты комплементарных биофизических и биохимических методов для интерпретации структурных данных.

Рентгеноструктурный анализ макромолекул, для реализации которого необходимо получить кристаллы, является основным методом структурной биологии. В России это направление зародилось в конце 1950-х гг., его лидером и вдохновителем был академик Б.К. Вайнштейн, создавший лабораторию белковой кристаллографии в Институте кристаллографии РАН (сейчас ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, присоединенный в 2023 г. к Курчатовскому институту). В лаборатории Вайнштейна было выполнено большое количество работ мирового уровня, внесших серьезный вклад в исследования разных классов белков, а также методов кристаллизации и развития программного обеспечения для белковой кристаллографии.

В настоящем тематическом сборнике представлен ряд работ, посвященных кристаллическим структурам ДНК-связывающих белков, токсина из змеиного яда, тиоцианатдегидрогеназы, гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы, трансаминазы (Леконцева и др.; Шилова и др.; Сафонова и др. и пр.). В работах для решения и уточнения кристаллических структур использованы широко востребованные во всем мире программы: молекулярного замещения (Molrep) и уточнения (Refmac). Одним из разработчиков этих программ являлся бывший сотрудник лабо-

ратории белковой кристаллографии Института кристаллографии РАН А. Вагин, которого не стало в марте этого года.

Ключевым компонентом успеха метода является получение высококачественных кристаллов исследуемых объектов. В сборнике часть статей посвящена использованию вариаций методов кристаллизации белков, в том числе в условиях микрогравитации (в рамках программы Роскосмоса по кристаллизации белков на русском сегменте международной космической станции), влиянию метода получения кристаллов на кристаллическую упаковку (Дубова и др.), подходам к улучшению дифракционного качества кристаллов (Сафонова и др.; Абрамчик и др.) и использованию молекулярной динамики для исследования процессов роста белковых кристаллов (Ивановский и др.).

Отдельно можно выделить ряд работ по структурной вирусологии и вакцинологии: рентгеноструктурный анализ рецепторсвязывающего домена SARS-CoV-2 с нейтрализующим антителом (Бойко и др.), кристаллизации пикорнаина 3С (Тишин и др.), обзор работ по взаимодействию протонного М2-канала вируса гриппа А с противовирусными лекарственными препаратами (Лашков и др.), ряд новаторских работ по биоинформационному анализу потенциальных эпитопов вирусных белков (И.А. Колесников и др.).

Представлены работы по развитию методов обработки данных малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) (Конарев и др.; Волков), а также экспериментальные результаты МУРР, позволившие получить важную структурную информацию об исследуемых объектах. В сборник вошли статьи по использованию электронной микроскопии для исследования структур биологических объектов (Бурцева и др.). Метод является быстроразвивающимся и перспективным как для предварительной характеристики образцов, так и для получения структур высокого разрешения. Выполнение данных работ стало возможно благодаря уникальному оборудованию ресурсного центра “Нанозонд” Курчатовского института, в частности современному криоэлектронному микроскопу Titan Krios, не имеющему аналогов в России.

Методами двумерной дифракции и рентгеновской рефлектометрии изучены молекулярные ме-

ханизмы взаимодействия противоопухолевого антибиотика доксорубицина с липидными моделями клеточных мембран (Новикова и др.).

Практически во всех работах по рентгеноструктурному анализу, экспериментальным работам по МУРР, рентгеновской дифракции и рефлексомерии высокие результаты удалось получить благодаря синхротронному излучению, что подчеркивает важность “Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 годы”, в рамках которой получен ряд представленных в сборнике результатов.

Выпуск дает общее представление о направлениях работ по структурной биологии различных исследовательских групп в России, о методах, используемых в данной области, о потенциале этой междисциплинарной науки, и могут быть интересны как структурным биологам, так и ученым, работающим в смежных областях.

*Главный редактор, член-корреспондент РАН
профессор М.В. Ковальчук,*

*Приглашенные редакторы
академик РАН, доктор химических наук В.О. Попов,
кандидат физико-математических наук В.Р. Самыгина*

УДК 544.1+548.737+577.1+577.3

СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТОННОГО M2-КАНАЛА ВИРУСА ГРИППА А С ПРОТИВОВИРУСНЫМИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ АДАМАНТАНОВОГО РЯДА

© 2023 г. А. А. Лашков^{1,*}, Т. М. Гараев², С. В. Рубинский¹, В. Р. Самыгина^{1,3}¹Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: alashkov83@gmail.com

Поступила в редакцию 29.06.2023 г.

После доработки 24.07.2023 г.

Принята к публикации 24.07.2023 г.

Пандемия вируса гриппа А остается значительной угрозой для здоровья населения планеты. Для борьбы с пандемией в основном используется один класс противовирусных препаратов, а именно, ингибиторы специфического вирусного фермента — нейраминидазы, к которым относятся занамивир (Relenza™) и озельтамивир (Tamiflu™). Отметим, что устойчивость вируса к этому классу соединений неуклонно растет. Протонный канал M2 вируса гриппа А является альтернативной, клинически доказанной мишенью противовирусной терапии. Однако многие циркулирующие штаммы вируса имеют аминокислотные мутации в белке M2, вызывающие устойчивость к препаратам адамантанового ряда — блокаторам M2, таким как римантадин и амантадин. Следовательно, ингибиторы, способные воздействовать на мутантные формы канала M2, крайне необходимы для биобезопасности населения. Представлен обзор структурно-функциональных взаимодействий экспериментальных лекарственных препаратов с белком-мишенью — трансмембранным доменом протонного канала M2 вируса гриппа. Проведен анализ экспериментальных и модельных структурных данных, находящихся в открытом доступе.

DOI: 10.31857/S0023476123600374, EDN: HAPIRE

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение

1. Общее описание функций и структуры M2-белков
2. Структурные основы действия ингибиторов M2
3. Биологическое действие гистидин-римантадина
4. Молекулярное моделирование комплекса His-Rim с M2-каналом

Заключение

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия вируса гриппа А остается значительной угрозой для здоровья населения планеты. Борьба с пандемией в основном связана с одним классом противогриппозных препаратов — ингибиторами специфического вирусного фермента нейраминидазы (НА): занамивиром (Relenza™) и озельтамивиром (Tamiflu™) (рис. 1). Отметим, что устойчивость вируса гриппа А к этому классу соединений неуклонно растет. С 2007 г. все чаще сообщается о широком распространении лекарственной устойчивости к озельтамивиру [1–3].

Важную роль при заражении вирусом гриппа играет гемагглютинин (НА), который представляет собой гомотримерный гликопротеин, обеспечивающий слияние и проникновение вируса гриппа в клетку-мишень [4]. Рецепторами к НА являются остатки сиаловых кислот на поверхности чувствительных клеток. НА является одной из перспективных мишеней для противовирусных средств, поскольку такие препараты блокируют начальную стадию заражения, предотвращая проникновение вируса в клетку. В настоящее время на фармацевтическом рынке в качестве ингибитора НА представлен Арбидол™ (умифеновир, Umifenovirum, рис. 1) [5, 6]. Препарат не включен в “Рекомендации ВОЗ по фармакологическому лечению пандемического гриппа A/H1N1pdm09 и других вирусов гриппа” по причине “недостаточных данных об эффективности или безопасности, либо по обоим причинам” [7, 8].

Протонный канал M2 вируса гриппа А, относящийся к классу виropорин, является альтернативной, клинически доказанной противовирус-

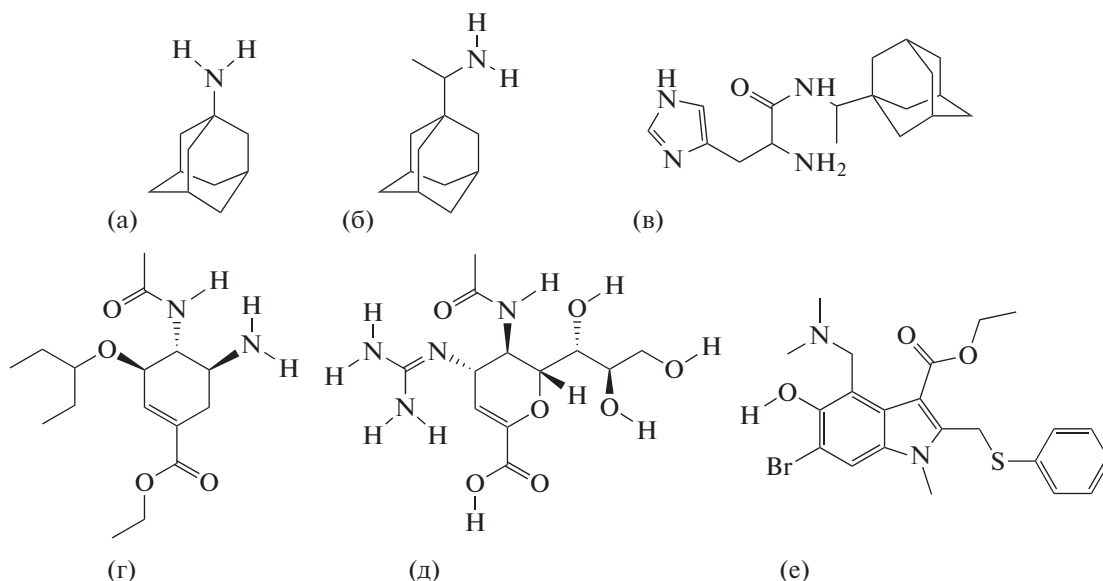


Рис. 1. Структурные формулы клинически используемых и экспериментальных противовирусных препаратов. Производные адамантана: а – амантадин, б – римантадин, в – гистидин-римантадин. Прочие препараты: г – озельтамивир, д – занамивир, е – умифеновир.

ной мишенью [9]. Однако почти все циркулирующие штаммы имеют точечную аминокислотную замену S31N в белке М2, которая вызывает устойчивость к препаратам адамантанового ряда: римантадину и амантадину (рис. 1) [10]. Ингибиторы, способные воздействовать на N31-содержащий М2 (М2-N31), крайне необходимы для биобезопасности населения. Настоящий обзор посвящен структурно-функциональным взаимодействиям, происходящим при воздействии лекарственных препаратов на белок-мишень: трансмембранный домен протонного канала М2 вируса гриппа.

1. ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ ФУНКЦИЙ И СТРУКТУРЫ М2-БЕЛКОВ

М2-белки вируса гриппа А являются трансмембранными белками, образующими протон-селективные каналы в липидной оболочке (рис. 2). Канал М2-белка (**М2-канал**) представляет собой гомотетрамерную структуру, собранную из четырех субъединиц М2-белка, полипептидная цепь которого длиной 97 аминокислотных остатков (**а.о.**) частично спирализованна в районе трансмембранного домена [11].

Протонная проводимость М2-каналов необходима для репликации вируса: они регулируют рН внутри вирусной частицы при проникновении вириона в эндосому клетки через мембрану аппарата Гольджи. Когда вирус проникает в клетку-хозяин с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза, происходит эндосомальное закисление. Избыток H^+ (низкое значение рН) активирует канал М2, который доставляет протоны в

ядро вириона вируса гриппа. При закислении внутреннего пространства вирусной частицы происходит ослабление электростатического взаимодействия и диссоциации связей между матричным М1-белком (рис. 2) и вирусными рибонуклеопротеиновыми комплексами. Последующее слияние мембран оболочки вируса высвобождает рибонуклеопротеины в цитоплазму клетки-хозяина, которые импортируются в ядро, для запуска процесса репликации вируса [12, 13].

Другая важная роль М2-белка проявляется во время сборки вирусной частицы, когда вновь синтезированные вирусные белки транспортируются к поверхности мембраны клетки-хозяина через транс-сеть аппарата Гольджи (**ТГН**), где присутствует избыток H^+ . Однако при низких значениях рН белки вируса, в частности НА, могут претерпевать преждевременную и нежелательную трансформацию. После синтеза в инфицированной клетке-хозяине М2-белок встраивается в эндоплазматический ретикулум и транспортируется на поверхность клетки через ТГН. В кислой среде аппарата Гольджи М2-канал транспортирует ионы H^+ из просвета ТГН и поддерживает метастабильную конфигурацию НА, предотвращая его нежелательную трансформацию [14, 15]. Кроме того, ионные каналы белка М2 эффективно активируют криопиринный путь воспаления (NLRP3) [16]. Другой важной функцией М2 является его роль в разрыве мембраны и высвобождении делящегося вириона. М2 стабилизирует место деления вируса, а мутации М2, препятствующие его связыванию с М1, могут нарушать образование филаментов в месте деления [17].

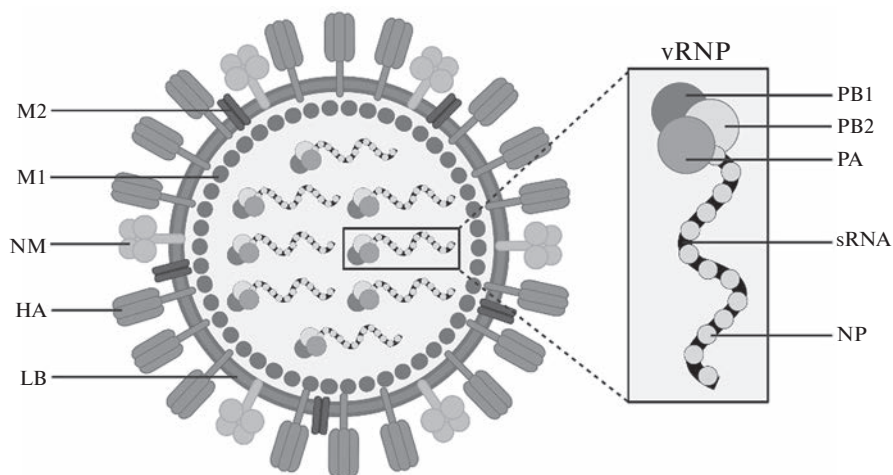


Рис. 2. Строение вирусной частицы вируса гриппа А: M1 — матриксный белок, M2 — протонный M2-канал, NM — нейроминидаза, HA — гемагглютинин, LP — липидный бислой, vRNP — вирусный рибонуклеопротеиновый комплекс, PA, PB1, PB2 — вирусные полимеразы, sRNA — сегментированная РНК, NP — нуклеопротеин.

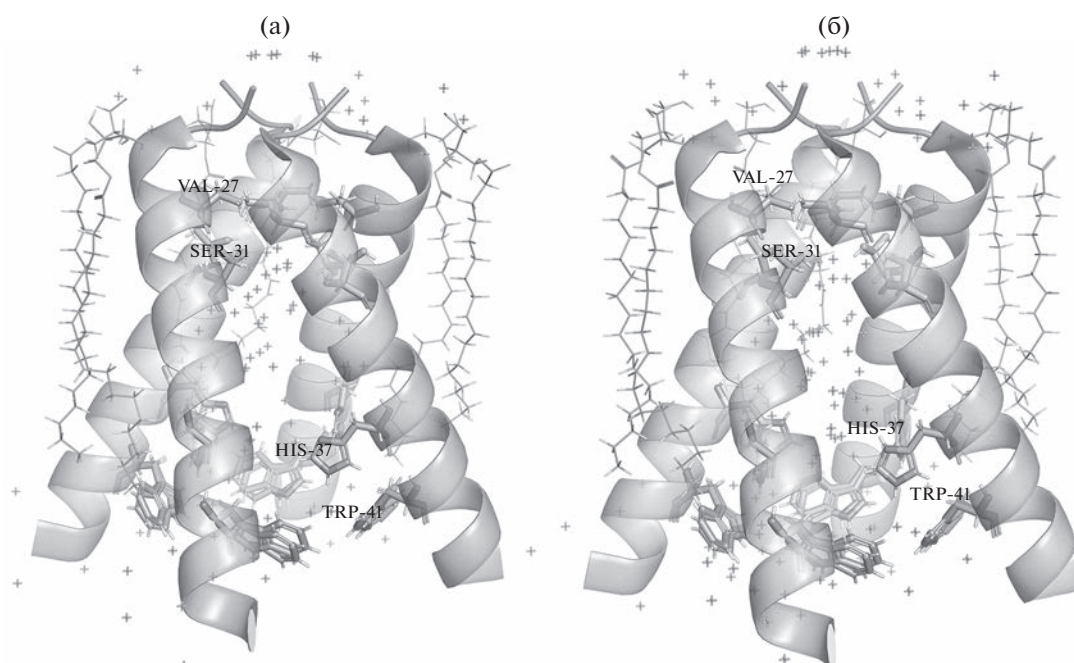


Рис. 3. Пространственная структура трансмембранной части M2-канала вируса гриппа А при высоком значении pH (PDB ID: 4QK7) (а) и низком (4QKC) (б). Структуры установлены методом рентгеновского анализа синтетического фрагмента канала в липидной кубической фазе [17]. Указаны функционально значимые аминокислотные остатки.

В вирусе гриппа А M2-белок состоит из трех доменов:

- внеклеточный N-концевой домен (а.о. 1–23);
- трансмембранный сегмент (ТМС) (а.о. 24–46, рис. 3);
- внутриклеточный C-концевой домен (а.о. 47–97).

Канал M2 активируется низким значением pH и имеет низкую проводимость для других ионов [18]. Функция протонной помпы сосредоточена в ТМС, который образует пору ионного канала (рис. 3). Важными функциональными группами являются имидазольная группа His37 (датчик pH)

и индольная Trp41 (ворота) [19] (рис. 3). Четыре His37 (по одному от каждой субъединицы) образуют имидазольное сопряжение. Источником протонов служат ионы гидроксония (H_3O^+) [20]. Trp41 в трансмембранной области закрывают пору канала с внутренней части.

Когда три или все четыре имидазольные группы His37 протонированы, электростатическое отталкивание между ними нарушает винтовую упаковку цепей тетрамерного канала M2 и открывает ворота, состоящие из индольных групп Trp41, для прохода протонов внутрь вирусной частицы. Ис-

кусственное нарушение этого механизма позволяет создать эффективный препарат против гриппа, даже тех его штаммов, которые приобрели устойчивость к воздействию существующих препаратов [21].

Если His37 заменяется глицином, аланином, глутаминовой кислотой, серином или треонином, протон-селективная активность теряется, и мутант приобретает возможность транспортировать ионы Na^+ и K^+ . При добавлении имидазольного буфера к клеткам, экспрессирующим мутантные белки, ионная селективность частично восстанавливается [22].

В [23] предполагалось, что механизм проводимости включает в себя обмен протонами между имидазольными фрагментами His37 M2 и водой, ограниченной внутренней частью канала M2. Молекулы воды внутри поры образуют сети водородных связей (“водяные провода”) от входа в канал до His37. Карбоксильные группы а.о., выстилающие стенки поры, стабилизируют ионы гидроксония посредством взаимодействия их второй гидратной оболочки с мостиковыми молекулами воды. Коллективное переключение ориентации водородных связей может способствовать направленности потока протонов, поскольку His37 динамически протонируется и депротонируется в цикле проводимости H^+ [24]. Остатки His37 образуют структуру “коробки” (рис. 3), ограниченную с обеих сторон кластерами воды с хорошо упорядоченными атомами кислорода рядом. Конформация белка, которая является промежуточной между структурами (ID PDB: 4QK7, 4QKC [24]), ранее решенными при более высоком и более низком pH (рис. 3), указывает на механизм, с помощью которого конформационные изменения могут способствовать асимметричной диффузии H^+ через канал в присутствии протонного градиента. Более того, протоны, диффундирующие через канал, не должны быть локализованы около одного имидазола His37, вместо этого они могут быть делокализованы по всему His-боксу и ассоциированным кластерам воды.

С-концевой фрагмент канала переходит в петлю (а.о. 47–50), соединяющую трансмембранный домен с С-концевой амфипатической спиралью (а.о. 46–62). Первые 17 а.о. цитоплазматического хвоста M2 образуют высококонсервативную амфипатическую спираль. [25], ее а.о. 46–62 внутри цитоплазматического хвоста играют роль в делении и сборке вируса путем изменения кривизны билипидных мембран [26]. А.о. 70–77 цитоплазматического хвоста важны для связывания с M1-белком и для эффективного производства инфекционных вирусных частиц. Эта область также содержит кавеолинсвязывающий домен (КСД).

Известны две различные структуры укороченных форм M2 с высоким разрешением: кристаллическая структура мутантной формы трансмембранной области M2 (а.о. 22–46) [27] и более

длинная версия белка (а.о. 18–60), содержащая трансмембранную область и сегмент С-концевого домена по данным ЯМР [28].

У вирусов гриппа В и С имеются белки с аналогичной функцией: VM2 и CM2 соответственно. Они негомологичны M2 по аминокислотной последовательности, несмотря на похожую трехмерную структуру и механизм действия [29].

2. СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ M2

Вирусный белковый канал M2 является мишенью для противовирусных терапевтических препаратов — производных адамантана: амантадина и римантадина. Соединения адамантанового ряда, а именно, аминокислоты адамантана, использовались для лечения и профилактики гриппа А с 70-х гг. прошлого века [30]. Из-за синтетической доступности и низкой стоимости производства препараты широко применялись для борьбы с сезонными эпидемиями гриппа во всем мире.

Сайт связывания канала M2 с амантадином или римантадином в настоящее время является предметом интенсивных дискуссий. Считается, что римантадин блокирует активность гриппа, связываясь с аминокислотами в трансмембранном канале M2 и блокируя транспорт протонов через канал M2 [27, 31] (рис. 4б). Группа аммония (с соседними молекулами воды) расположена ближе к С-концу ТМС, а группа адамантана расположена ближе к N-концу ТМС, когда они связаны внутри поры M2. Так как в препарате римантадина присутствуют оба энантиомера, были проведены дополнительные исследования ЯМР, показавшие, что R-энантиомер имеет более сильное связывание с порой канала M2, чем S-энантиомер римантадина. Однако анализ противовирусной активности препаратов и электрофизиологические исследования показывают, что нет существенной разницы между энантиомерами R и S в связывании с аминокислотами в канале M2 [32]. Поскольку энантиомеры имеют схожую аффинность связывания, они также обладают аналогичной способностью блокировать поры канала и работать как эффективное противовирусное средство.

Так же действует амантадин [33] (рис. 4а). Согласно кристаллической структуре при низком значении pH одна молекула амантадина связывается в середине поры, окруженная остатками Val27, Ala30, Ser31 и Gly34. Напротив, ЯМР-структура показала, что четыре молекулы римантадина связываются с липидом, обращенным к внешней поверхности поры, взаимодействуя с остатками Asp44 и Arg45. Однако недавно полученная структура твердотельного ЯМР показывает, что канал M2 имеет два сайта связывания амантадина, один, с высоким сродством, находится в просвете

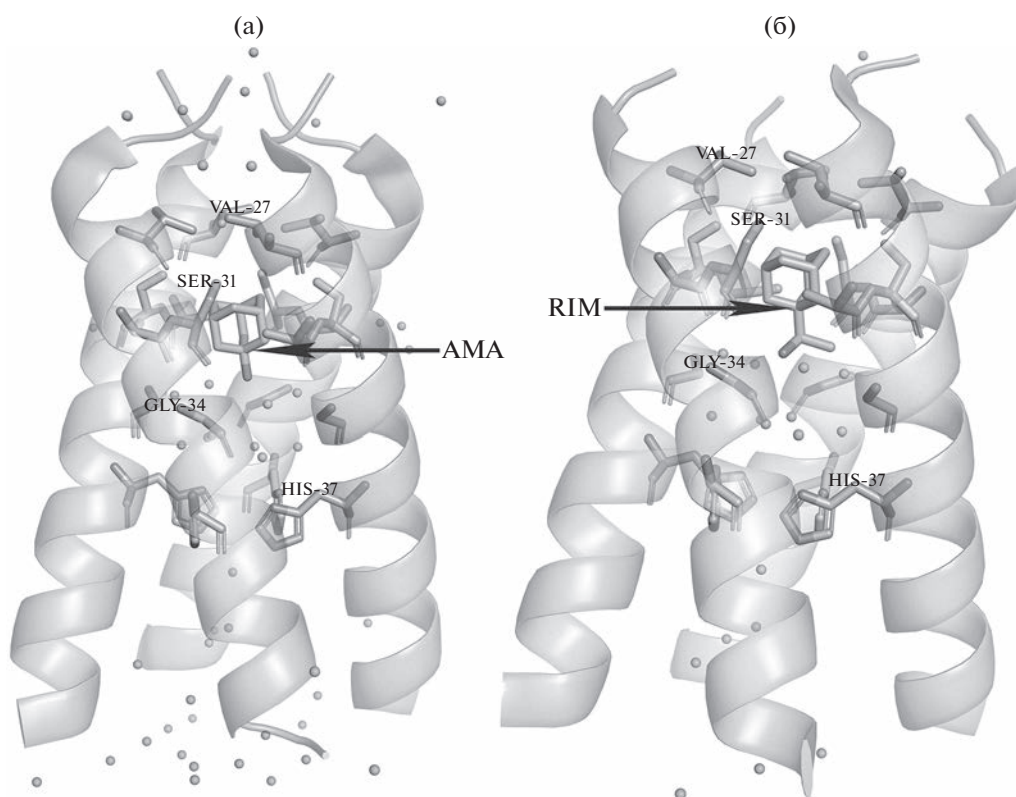


Рис. 4. Пространственная структура трансмембранной части M2-канала вируса гриппа А в комплексе с амантадином (PDB ID: 6BKK, AMA) (а) и римантадином (6BKL, RIM) (б). Структуры установлены методом рентгеновского анализа синтетического фрагмента канала в липидной кубической фазе [38].

N-конца, а второй, с низким сродством, находится на поверхности С-конца белка.

Механизм ингибирования адамантановых препаратов был спорным в течение последних двух десятилетий, до появления кристаллографических структур высокого разрешения (рис. 4, табл. 1). Сайт связывания лекарственных препаратов был предсказан с помощью анализа сайтно-направленного мутагенеза резистентных штаммов вируса гриппа А. Мутации, отвечающие за устойчивость к препаратам амантадина или римантадина, встречаются в позициях аминокислотной последовательности M2, таких как 26, 27, 30, 31, 34 и 38 [34, 35]. Большинство этих позиций, включая а.о. 27, 30, 31 и 34 (рис. 4), расположены на внутренней поверхности канала M2, что и привело к гипотезе о том, что препараты проникают внутрь канала.

В [36] проведены исследования молекулярного докинга амантадина путем перемещения ингибитора вдоль поры канала и обнаружен энергетический минимум вокруг позиций 27 и 31. Предполагалось, что гидрофобный адамантильный остов препарата взаимодействует с боковыми цепями Val27, тогда как аминокислота соединения образует электростатические взаимодействия (водородную связь) с гидроксилами остатка Ser31.

В [36] амантадин был помещен возле остатка 27 на основе компьютерного моделирования, но аминокислота лекарственного средства образовывала одну или несколько чередующихся водородных связей с гидроксильными группами Ser31 и карбонилем ($-C=O$) основной цепи Ala30. Экспериментальным подтверждением, согласующимся с сайтом Val27, стало исследование дифракции нейтронов, с помощью которого было выявлено, что молекула амантадина расположена на расстоянии ~ 6 Å от центра мембраны [37], однако также сообщалось, что препарат связывается с наружной поверхностью канала с остатками Asp44 вблизи С-конца канала.

В [38] признали важность His37 в протонной проводимости и поэтому предположили, что аминокислота амантадина может взаимодействовать с имидазолами His37, тогда как гидрофобный остов молекулы лекарственного препарата расположен в самой широкой области поры около Gly34.

Однако положение этого сайта связывания не согласуется с данными нейтронной дифракции. В [39] на основе изменений химического сдвига, измеренных с помощью твердотельного ЯМР, предположили, что амантадин связывается с еще одним сайтом внутри канала. В этом сайте связывания аминокислота препарата направлена к N-концевому участку канала M2 и расположена

Таблица 1. Рентгеновские структуры, депонированные в RCSB PDB

ID PDB	Литера- тура	Разреше- ние, Å	Лиганд	Мутации (а.о.)	Штамм	Длина цепи ¹	Метод ²	pH	Год	
3BKD	[27]	2.05	амантадин	2: 10, 23	udorn/1972(H3N2)	26	ДП : СК	7.3	2008	
3C9J	[27]	3.50				25	ДП : СК	5.3	2008	
3LBW	[23]	1.65				23	ДП : СК	6,5	2010	
4QK7	[24]	1.1				27	ЛКФ	8	2015	
4QKC	[24]	1.1				27	ЛКФ	5.5	2015	
5JOO	[48]	1.4	адамантан	2: 1, 27	Hickox/1940(H1N1)	27	ЛКФ	5,5	2017	
5TTC	[48]	1.4		2: 1, 27	Hickox/1940(H1N1)	27	ЛКФ	8	2017	
6BKK	[46]	2.0		2: 1 и 27	pigeon/Jiangsu/K23/2013 (H9N2)	27	ЛКФ	4.5	2018	
6BKL	[46]	2.0		2: 1, 27		27	ЛКФ	5.6	2018	
6BMZ	[46]	2.63				27	ЛКФ	7	2018	
6BOC	[46]	2.25				27	ЛКФ	3.5	2018	
6MJH	[49]	2.06				27	ЛКФ	5	2019	
6NV1	[47]	2.5		спироадаман- тил-амин	2: 1 и 27	Indonesia/CDC1031RE2/ 2007(H5N1)	27	ЛКФ		2020
6OUG	[47]	3.0		спироадаман- тил-амин	2: 7 и 30	Memphis/1/1971(H3N2)	41	ЛКФ	8	2019

¹ Длина полипептидной цепи мономера.

² Метод кристаллизации: ДП:СК — диффузия в парах в варианте сидячей капли, ЛКФ — липидная кубическая фаза.

вблизи Ser31. Но в [39] отмечено, что для образования водородных связей аминокетонная группа препарата находится слишком далеко от гидроксильных групп остатков Ser31 (~4.5 Å, рис. 4а).

Хотя экспериментальные исследования, прежде всего молекулярное моделирование, указывали на взаимодействие между амантадином и М2, ни одно из исследований не показало точного места связывания внутри поры. Интересно, что исследование методом сайт-направленного мутагенеза показало, что мутация в положении Ser31 влияет на связывание амантадина с М2. Поэтому Ser31 был предложен в качестве мишени для образования полярных связей с поверхностью канала [40]. Наиболее прямое доказательство места связывания препарата в поре М2 было получено путем кристаллографического исследования ТМС пептида М2 в присутствии амантадина [27]. Эта структура определялась при относительно низком разрешении (3.5 Å), недостаточном для однозначной идентификации малых молекул, таких как амантадин (максимальный диаметр сферического адамантового остова составляет ~3.4 Å). Предложенная модель связывания лекарственного средства в поре канала М2 характеризуется очень необычным взаимодействием гидрофобных и гидрофильных групп, при котором четыре гидроксильные группы остатков Ser31 координируют неполярный адамантовый остов.

Главным аспектом этого механизма связывания является то, что аминокетонная группа амантадина,

имеющая решающее значение для ингибирования [27], не взаимодействует ни с одной из полярных групп в поре канала М2. С другой стороны, мутант S31A был чувствительным к действию римантадина [40], что указывает на то, что Ser31 не играет решающей роли в связывании с препаратом.

Таким образом, исследования, представленные выше, показывают, что образование классических водородных связей между лигандом и белком не является обязательным условием ингибирующего действия аминокетонных остатков на протонную проводимость. Внутренняя поверхность канала М2 составлена в основном из неполярных а. о., и для возникновения противовирусной активности достаточно образования надежного гидрофобного взаимодействия с лигандом. Этот факт следует учитывать при разработке лекарственных препаратов, преодолевающих вирусную резистентность к аминокетонным остаткам.

В табл. 1 представлена информация о пространственных структурах, решенных методом рентгеноструктурного анализа, как нативных форм трансмембранной части канала М2 вируса гриппа, так и в комплексах с противовирусными препаратами аминокетонного ряда. Во всех случаях использовался либо метод получения липидной кубической фазы, либо более классическая методика кристаллизации диффузии в парах в варианте висючей капли с использованием детергентов. В целом метод кубической фазы может

дать более высокое разрешение. Однако для локализации лиганда в канале определено достаточно разрешения $\sim 2 \text{ \AA}$.

3. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГИСТИДИН-РИМАНТАДИНА

В результате широкого использования аминокислотных препаратов вирус гриппа А, обладающий высокой частотой мутаций, подвергался генетическим перестройкам и поэтому стал нечувствителен к действию данных препаратов [41]. В лабораторных штаммах ученые наблюдали различные мутации в трансмембранном домене канала М2, но для дикого типа вируса характерны три основные аминокислотные замены, из них аминокислотная замена Ser на Asp в позиции 31 белка М2 считалась критической для способности аминокислотных препаратов блокировать функции канала. Центры по контролю и борьбе с вирусными инфекциями совместно с ВОЗ [7, 8] не рекомендуют использовать препараты римантадин и амантадин для лечения гриппа, так как резистентность к ним достигла уже более 90%.

С целью преодоления лекарственной устойчивости вируса гриппа А к препаратам аминокислотного ряда и их биодоступности было создано аминокислотное производное римантадина — гистидин-римантадин (**His-Rim**) и исследованы его биологические свойства [42–44]. Значения эффективных концентраций для соединения $2\text{HCl} \times \text{H-His-Rim}$ в отношении высокопатогенного штамма вируса гриппа А/Н5N1 были несколько меньше, чем для известного лекарственного препарата Арбидол.

Соединение $2\text{HCl} \times \text{H-His-Rim}$ ввиду его достаточно высокой эффективности, а также экономической и синтетической доступности может быть рекомендовано в качестве кандидата на доклинические и клинические испытания для получения этиотропного противовирусного препарата на его основе.

4. МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСА His-Rim С М2-КАНАЛОМ

В [45] описаны исследования *in vivo* биологического действия гистидин-римантадина на несколько мутантных форм вируса гриппа и молекулярное моделирование новых форм с протонным каналом М2. Для исследования устойчивости связывания $\text{HCl} \times \text{H-His-Rim}$ в конформациях, отобранных из решений молекулярного докинга с М2 S31N и М2 S31N_A30T, проводилось молекулярно-динамическое (МД) моделирование.

Решения докинга выявили явно выраженные кластеры по положению лиганда в канале с учетом того, что структура канала симметрична в направлении, перпендикулярном плоскости бислоя (ось четвертого порядка) (рис. 5).

Первый вариант (сайт) возможного связывания лиганда с каналом (**surface**) характеризуется поверхностным расположением лиганда. Адамантановый остов немного погружен в канал и находится на уровне Val27. Гистидиновая часть лиганда примыкает к боковой цепи Asp24 и взаимодействует с ней посредством водородных связей и электростатических взаимодействий. Также эта часть лиганда образует водородные связи с водой, окружающей вход в канал.

Второй вариант (**middle**) характеризуется тем, что адамантановый остов находится между 27 и 30 а.о., а аминокислотная часть лиганда взаимодействует с боковой группой Asn31 и основной цепью 30 а.о.

Третий вариант — глубокое расположение лиганда в канале (**deep**). Имидазольное кольцо гистидиновой части лиганда расположено почти поперек канала и находится на уровне 30–31 а.о. В то же время адамантановая часть лиганда находится на 3.5–4 Å выше плоскости имидазольных колец His37, имеющих принципиально большое значение в функционировании протонного насоса.

В поверхностном случае закрепления $\text{HCl} \times \text{H-His-Rim}$ как в референсе, так и в мутанте А30Т плотность молекул воды в канале велика по обе стороны от His37. По-видимому, лиганд в этом сайте связывания плохо блокирует ток воды и, как следствие, активность протонного насоса.

Значительно меньшая плотность молекул воды наблюдается, когда лиганд находится в middle-сайте связывания конформации. В случае длительного МД-моделирования молекулы воды проникают с внутриклеточной стороны канала, проходят через His37 и сольватируют гистидиновую часть лиганда, устанавливая сеть водородных связей между лигандом и стенкой канала. Значительно меньшая диффузия воды в эту область происходит из внеклеточной части канала, так как диффузии препятствует адамантовый гидрофобный фрагмент лиганда. Поэтому ток воды в канале в случае middle-сайта связывания отсутствует или незначителен.

В случае глубокого связывания лиганда сверху молекулы воды в канал не проникают далее 30 а.о. Из внутриклеточной части канала тока воды также не наблюдается на протяжении всей траектории МД-моделирования [45]. Поэтому лиганд, находясь в этом сайте связывания, полностью блокирует ток воды в канале как референсной структуры, так и мутанта А30Т.

В [45] представлены значения свободной энергии связывания (аффинности) соединения $\text{HCl} \times \text{H-His-Rim}$ с каналом М2. В поверхностном сайте связывание лиганда энергетически не очень выгодно, причем аффинность к $\text{HCl} \times \text{H-His-Rim}$ одинакова как для мутантного канала, так и для референсной структуры, что объясняется отдаленностью положения точечной мутации А30Т от места связывания лиганда.

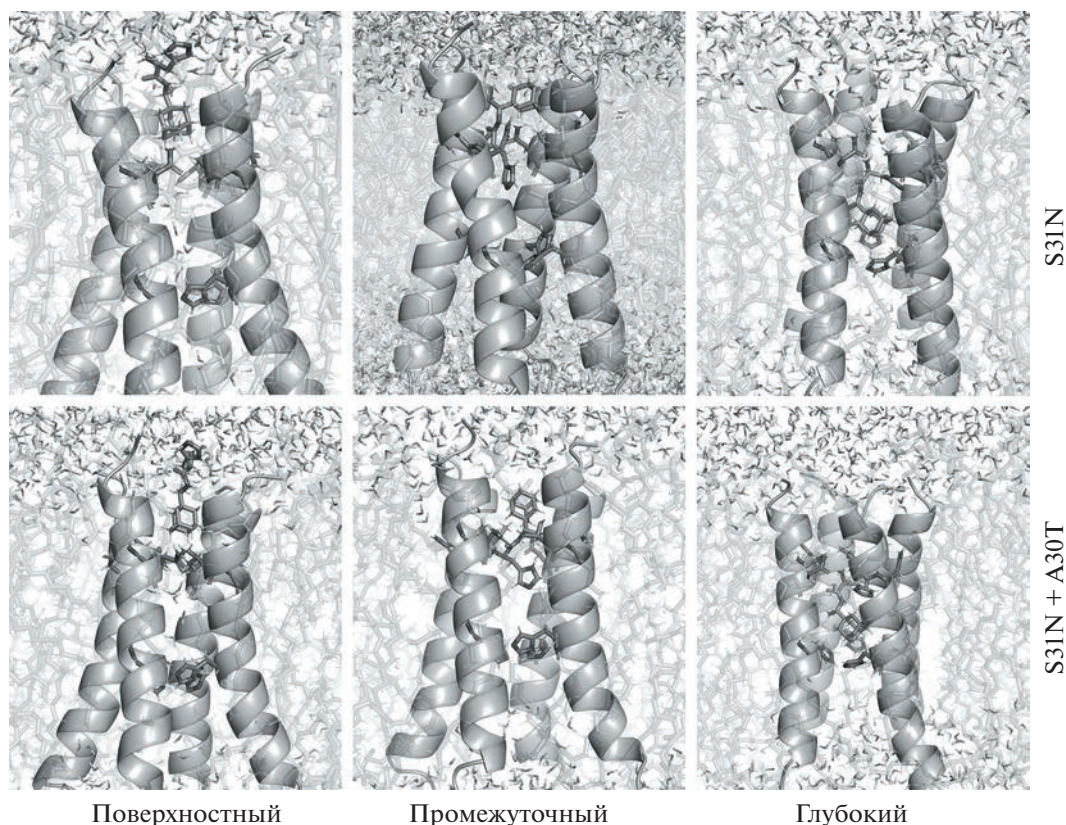


Рис. 5. Строение наружной (верхней) части протонного насоса в комплексе с гистидин-римантадином [37].

В случае middle-сайта связывание лиганда без учета сольватирования его аминокислотной части энергетически не выгодно. В то же время при сольватировании аминокислотной части $\text{HCl} \times \text{H-His-Rim}$ происходит уменьшение свободной энергии связывания лиганда как с референсным, так и мутантным белком, но даже с учетом сольватирования лиганда связывание его с middle-сайтом оказывается менее выгодно энергетически, чем с поверхностным.

Связывание лиганда с глубоким сайтом является согласно расчетам свободной энергии самым энергетически выгодным. Кроме того, в случае глубокой конформации связывание лиганда с референсом значительно выгоднее, чем с A30T, что согласуется с результатом эксперимента *in vitro*. Эта разница может быть связана с увеличением объема бокового радикала Thr30 в сравнении с Ala.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ экспериментальных и модельных структурных данных, находящихся в открытом доступе, комплекса экспериментальных лекарственных препаратов с белком-мишенью: трансмембранным доменом протонного канала M2 вируса гриппа. Структурная формула соответствует перспективному препарату адамантанового ряда с повышенной биодоступностью, способ-

ного преодолеть лекарственную устойчивость, — гистидин-римантадину.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 годы (Соглашение № 075-15-2021-1355 от 12 октября 2021 года; обзор литературы по структурам и функциям протонного насоса вируса гриппа A) и в рамках Государственного задания ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН (анализ структурной информации из баз данных RSCB PDB и PubChem).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thorlund K., Awad T., Boivin G. et al. // BMC Infect. Dis. 2011. V. 134.
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-134>
2. Singh A., Soliman M. // Drug Des. Devel. Ther. 2015. V. 9. P. 4137.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S81934>
3. Lampejo T. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2020. V. 39 (7). P. 1201.
<https://doi.org/10.1007/s10096-020-03840-9>
4. Sriwilaijaroen N., Suzuki Y. // Proc. Jpn. Acad. B. Phys. Biol. Sci. 2012. V. 88 (6). P. 226.
5. Ленева И.А., Гуськова Т.А. // Русский медицинский журнал. 2008. Т. 29 (16). С. 3.

6. *Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S. et al.* // Antiviral Res. 2009. V. 81 (2). P. 132.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.009>
7. WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 and other Influenza Viruses. WHO Geneva, 2010. Part I.
8. Centers for Disease Control and Prevention Recommendations. CS HCVG-15-FLU-107. 2018.
9. *Scott C., Griffin S.* // J. Gen. Virol. 2015. V. 96 (8). P. 2000.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.000201>
10. *Wang J., Wu Y., Ma C. et al.* // PNAS. 2013. V. 110 (4). P. 1315.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1216526110>
11. *Nieto-Torres J.L., Verdia-Baguena C., Castano-Rodriguez C. et al.* // Viruses. 2015. V. 7. P. 3552.
<https://doi.org/10.3390/v7072786>
12. *Liang R., Swanson J.M.J., Madsen J.J. et al.* // PNAS. 2016. V. 113 (45). P. 6955.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1615471113>
13. *Duong-Ly K.C., Nanda V., Degrad W.F. et al.* // Protein Sci. 2005. V. 14 (4). P. 856.
<https://doi.org/10.1110/ps.041185805>
14. *Krejcová L., Michalek P., Hynek D. et al.* // J. Metalomics Nanotechnol. 2015. V. 1. P. 13.
15. *Sakaguchi T., Leser G.P., Lamb R.A.* // J. Cell. Biol. 1996. V. 133 (4). P. 733.
<https://doi.org/10.1083/jcb.133.4.733>
16. *Ichinohe T., Pang I.K., Iwasaki A.* // Nat. Immunol. 2010. V. 11 (5). P. 404.
<https://doi.org/10.1038/ni.1861>
17. *Rossman J.S., Lamb R.A.* // Virology. 2011. V. 411 (2). P. 229.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.003>
18. *Mould J.A., Li H.C., Dudlak C.S. et al.* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275 (12). P. 8592.
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8592>
19. *Tang Y., Zaitseva F., Lamb R.A. et al.* // J. Biol. Chem. 2002. V. 277 (42). P. 39880.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M206582200>
20. *Miao Y., Fu R., Zhou H.X. et al.* // Structure. 2015. V. 23 (12). P. 2300.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2015.09.011>
21. *Hu F., Luo W., Hong M.* // Science. 2010. V. 330 (6003). P. 505.
<https://doi.org/10.1126/science.1191714>
22. *Venkataraman P., Lamb R.A., Pinto L.H.* // J. Biol. Chem. 2005. V. 280 (22). P. 21463.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M412406200>
23. *Acharya R., Carnevale V., Fiorin G. et al.* // PNAS. 2010. V. 107 (34). P. 15075.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1007071107>
24. *Thomaston J.L., Alfonso-Prieto M., Woldeyes R.A. et al.* // PNAS. 2015. V. 112 (46). P. 14260.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1518493112>
25. *Holsinger L.J., Nichani D., Pinto L.H. et al.* // J. Virol. 1994. V. 68 (3). P. 1551.
<https://doi.org/10.1128/JVI.68.3.1551-1563.1994>
26. *Rossman J.S., Jing X., Leser G.P. et al.* // Cell. 2010. V. 142 (6). P. 902.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.029>
27. *Stouffer A.L., Acharya R., Salom D. et al.* // Nature. 2008. V. 451. P. 596.
<https://doi.org/10.1038/nature06528>
28. *Schnell J.R., Chou J.J.* // Nature. 2008. V. 451. P. 591.
<https://doi.org/10.1038/nature06531>
29. *Pielak R.M., Chou J.J.* // Biomembranes. 2011. V. 1808 (2). P. 522.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.04.15>
30. *Arroyo M., Beare A.S., Reed S.E. et al.* // J. Antimicrob. Chemother. 1975. V. 1 (4 Suppl). P. 87.
https://doi.org/10.1093/jac/1.suppl_4.87
31. *Vorobjev Y.N.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2020. V. 39 (7). P. 2352.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1747550>
32. *Dobson J., Whitley R.J., Pocock S. et al.* // Lancet. 2015. V. 385 (9979). P. 1729.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62449-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62449-1)
33. *Golan D.E., Armstrong E.J., Armstrong A.W.* // Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2017. P. 142, 199, 205t, 224t, 608, 698.
34. *Hay A.J., Wolstenholme A.J., Skehel J.J. et al.* // EMBO J. 1985. V. 4. P. 3021.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1985.tb04038.x>
35. *Wang C., Takeuchi K., Pinto L.H. et al.* // J. Virol. 1993. V. 67 (9). P. 5585.
<https://doi.org/10.1128/jvi.67.9.5585-5594.1993>
36. *Sansom M.S., Kerr I.D.* // Protein Eng. 1993. V. 6 (1). P. 65.
<https://doi.org/10.1093/protein/6.1.65>
37. *Duff K.C., Gilchrist P.J., Saxena A.M. et al.* // Virology. 1994. V. 202 (1). P. 287.
<https://doi.org/10.1006/viro.1994.1345>
38. *Gandhi C.S., Shuck K., Lear J.D. et al.* // J. Biol. Chem. 1999. V. 274 (9). P. 5474.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5474>
39. *Cady S.D., Mishanina T.V., Hong M.* // J. Mol. Biol. 2009. V. 385 (4). P. 1127.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.11.022>
40. *Pielak R.M., Schnell J.R., Chou J.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2009. V. 106. P. 7379.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0902548106>
41. *Bright R.A., Medina M.J., Xu X. et al.* // Lancet. 2005. V. 366 (9492). P. 1175.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67338-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67338-2)
42. *Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогенова М.П. и др.* // Вопросы вирусологии. 2019. Т. 64. Вып. 6. С. 268.
43. *Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогенова М.П. и др.* // Химико-фармацевтический журнал. 2012. Т. 46. Вып. 1. С. 36.
44. *Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогенова М.П. и др.* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т. 157 (1). С. 73.
45. *Garaev T.M., Odnovorov A.I., Lashkov A.A. et al.* // Adv. Pharm. Bull. 2021. V. 11 (4). P. 700.
<https://doi.org/10.34172/apb.2021.079>
46. *Thomaston J.L., Polizzi N.F., Konstantinidi A. et al.* // J. Am. Chem. Soc. 2018. V. 140 (45). P. 15219.
<https://doi.org/10.1021/jacs.8b06741>
47. *Thomaston J.L., Konstantinidi A., Liu L. et al.* // Biochemistry. 2020. V. 59 (4). P. 627.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00971>
48. *Thomaston J.L., Woldeyes R.A., Nakane T. et al.* // PNAS. 2017. V. 114 (51). P. 13357.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1705624114>
49. *Thomaston J.L., Wu Y., Polizzi N. et al.* // J. Am. Chem. Soc. 2019. V. 141 (29). P. 11481.
<https://doi.org/10.1021/jacs.9b02196>

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ РЕНТГЕНОВСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КРИСТАЛЛОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ СОКРИСТАЛЛИЗАЦИИ ГИПОКСАНТИН-ГУАНИНФОСФОРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ *Escherichia coli* И ПРОИЗВОДНЫХ ПИРАЗИН-2-КАРБОКСАМИДА

© 2023 г. Ю. А. Абрамчик^{1,2,*}, Е. А. Заяц¹, В. И. Тимофеев^{2,3}, М. Б. Шевцов⁴, М. А. Костромина¹,
И. В. Фатеев¹, Д. О. Юровская¹, А. А. Каранов¹, И. Д. Константинова¹,
И. П. Куранова^{2,3}, Р. С. Есипов¹

¹Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁴Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

*E-mail: ugata@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.04.2023 г.

После доработки 24.04.2023 г.

Принята к публикации 22.05.2023 г.

Создан высокоэффективный штамм-продуцент *Escherichia coli* C3030/pET23d⁺-EcHGPRT, позволяющий получать рекомбинантную гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу из *E. coli* (EcHGPRT) в растворимой форме. Разработана методика выделения и очистки рекомбинантного белка. Определена удельная активность в отношении природного субстрата и производных пиразин-2-карбоксамида. Методом встречной диффузии в капилляре выращены кристаллы комплексов EcHGPRT с 3-гидроксипиразин-2-карбоксамидом (Т-1105) и с 6-фтор-3-гидроксипиразин-2-карбоксамидом (Т-705), пригодные для рентгеноструктурного исследования. Дифракционные наборы до разрешения соответственно 2.4 и 2.5 Å собраны на синхротроне ESRF (Франция, станция ID23-1) при температуре 100 К. Кристаллы относятся к пр. гр. P3(1)21, в независимой части ячейки содержатся две молекулы фермента.

DOI: 10.31857/S002347612360012X, EDN: ZZVSQF

ВВЕДЕНИЕ

Разработка и исследование механизма действия противовирусных препаратов — крайне актуальная задача, особенно в контексте пандемии COVID-19. Одним из классов соединений, представители которых проявляют активность против широкого круга вирусных инфекций, в том числе SARS-CoV-2, являются производные пиразин-2-карбоксамида. К данным соединениям относится 3-гидроксипиразин-2-карбоксамид (Т-1105), показавший активность против гриппа, вируса Эбола, желтой лихорадки и множества других инфекций [1–9]. Другим значимым соединением из этого класса является 6-фтор-3-гидроксипиразин-2-карбоксамид (Т-705), известный и широко применяемый в лечении COVID-19 под торговым наименованием фавипиравир [10–13].

Вещества Т-705 и Т-1105 представляют собой пролекарства — миметики пуринов, активация которых происходит в клетках человека посредством конверсии в нуклеотид при действии фер-

мента гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (HGPRT, КФ2.4.2.8) [14]. Природная функция HGPRT — фосфорилирование гипоксантина и гуанина с образованием инозин-5'-фосфата и гуанозин-5'-фосфата. При фосфорилировании веществ Т-705 и Т-1105 продуктами являются соответствующие мононуклеотиды — 6-фтор-3-гидроксипиразин-2-карбоксамид-рибоза-5'-монофосфат (Т-705-RMP) и 3-гидроксипиразин-2-карбоксамид-рибоза-5'-монофосфат (Т-1105-RMP). Эти нуклеотиды подвергаются фосфорилированию до ди- и трифосфатов, проявляющих противовирусную активность [14–16].

Данные о взаимодействии производных пиразин-2-карбоксамида с фосфорилирующей ферментативной активностью представляют интерес как для разработки новых противовирусных препаратов с повышенной эффективностью, так и для дизайна ферментов, предназначенных для синтеза фосфорилированных производных пиразин-2-карбоксамида. Пространственные структуры для HGPRT

установлены в [17–23]. Несмотря на это, единственная известная структура HGPRT в комплексе с производным пиразин-2-карбоксамида — это фермент человека в комплексе с продуктом-нуклеотидом T-705-RMP (PDB 4KN6), в то время как структуры HGPRT со свободными азотистыми основаниями данного класса соединений отсутствуют [14].

В настоящей работе представлены результаты предварительного рентгеновского исследования кристаллов, полученных при сокристаллизации *EcHGPRT* и двух противовирусных производных пиразин-2-карбоксамида: веществ T-705 и T-1105. *EcHGPRT* — один из перспективных кандидатов для использования в биотехнологических процессах. Аминокислотные последовательности *EcHGPRT* и HGPRT человека идентичны на 33%. Пространственная структура *EcHGPRT* известна как для свободного фермента, так и для комплексов фермента с инозином и гуанозином [19]. В настоящей работе описано получение рекомбинантного препарата *EcHGPRT*, получение кристаллов комплексов *EcHGPRT* с соединениями T-705 и T-1105 и их предварительное рентгеновское исследование.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание штамма-продуцента. Ген *hpt* (Genbank ID AIF91732) амплифицировали на матрице геномной ДНК *E. coli* и клонировали в вектор pET23a+ по сайтам узнавания рестриктаз NcoI и XhoI. Созданный экспрессионный вектор содержал ген, кодирующий *EcHGPRT* с С-концевым 6xHis-tag. Создан штамм-продуцент *E. coli* C3030/pET23d⁺-*EcHGPRT*, при культивировании которого целевой фермент синтезируется преимущественно в растворимой форме.

Выделение и очистка *EcHGPRT* включали в себя следующие стадии: разрушение клеточной биомассы в буферном растворе 20 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, металл-хелатную аффинную хроматографию на сорбенте Protino Ni-NTA (Macherey-Nagel) с элюцией в ступенчатом градиенте 500 mM имидазола, концентрирование на ультрафильтрационной мембране из регенерированной целлюлозы Ultracel 30 кДа (PLTK06210, Millipore) до концентрации 10 мг/мл, гель-фильтрационную хроматографию на колонке HiLoad 16/60 Superdex 75 (GE Healthcare) в буферном растворе, содержащем 50 mM Трис-НCl, pH 7.4, 10 mM MgCl, 5% глицерина, 0.04% NaN₃, концентрирование до 17 мг/мл.

Определение удельной активности. Активность *EcHGPRT* в отношении гипоксантина и производных пиразин-2-карбоксамида исследовали посредством детекции (обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография,

ОФ ВЭЖХ) конверсии азотистого основания в нуклеотид. Состав реакционной смеси: 0.5 mM исследуемого азотистого основания, 0.5 mM 5-фосфорибозил- α -1-пирофосфата (PRPP), 1 mM MgCl₂, 20 mM Трис-НCl, pH 8.0. Инкубацию проводили в течение 2 мин при 10–70°C для смесей с гипоксантином и при 44°C — с T-705 и T-1105. Концентрации субстратов и продуктов определяли при помощи ОФ ВЭЖХ в изократическом методе элюирования 0.1%-ным водным раствором трифторуксусной кислоты на системах Waters с колонкой Nova-Pak C18, 4 мкм, 150 × 4.6 мм, скорость потока 1 мл/мин, УФ-детектирование при 254 нм в случае гипоксантина и 350 нм — для веществ T-705 и T-1105 (детектор Waters 2489).

Кристаллизация. Для получения кристаллов *EcHGPRT* к 2 мкл раствора белка в 50 mM Трис-НCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 5% глицерина, 0.04% NaN₃, с концентрацией белка 17 мг/мл добавляли равный объем раствора осадителя. В качестве осадителя использовали раствор, содержащий 0.15 М цитрата натрия, 0.1 М HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), pH 6.8. Каплю раствора помещали на поверхность силиконированной стеклянной пластинки, которой накрывали кювету, содержащую 1 мл раствора осадителя. Кристаллы появлялись в течение двух недель. Для улучшения качества кристаллов условия кристаллизации *EcHGPRT* адаптированы и оптимизированы применительно к методу встречной диффузии в капилляре [24]. Для получения комплексов *EcHGPRT* с T-705 и T-1105 методом встречной диффузии в капилляре к 7 мкл раствора белка в 50 mM Трис-НCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 5% глицерина, 0.04% NaN₃, с концентрацией белка 17 мг/мл добавляли соответствующие лиганды до концентрации 5 mM. В качестве осадителя использовали раствор, содержащий 0.15 М цитрата натрия, 0.1 М HEPES, pH 6.8. Кристаллы появлялись в течение двух недель.

Рентгеновское исследование кристаллов. Получение и обработка дифракционных наборов. Дифракционные наборы для T-705 и T-1105 до разрешения соответственно 2.4 и 2.5 Å собраны на синхротроне ESRF (Франция, станция ID23-1) при температуре 100 К. В качестве детектора использовали Pilatus6MF. Дифракционные данные получали от одного кристалла методом вращения–качания при расстоянии между кристаллом и детектором 400 мм и длине волны 0.96772 Å; углы качания и вращения — 0.1° и 360° соответственно. Для регистрации отражений использовали детектор прямого действия — Pilatus6MF. Обработку набора экспериментальных интенсивностей отражений проводили с помощью программы iMosflm [25]. Статистические характеристики дифракционных данных приведены в табл. 1. Кристаллы относятся к пр. гр. P3(1)21. В незави-

Таблица 1. Статистические характеристики дифракционных наборов

Статистические характеристики	<i>Ec</i> HGPRT с T-1105	<i>Ec</i> HGPRT с T-705
Пр. гр.	<i>P</i> 3(1)21	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , Å; α, β, γ, град	84.65, 54.65, 167.24; 90, 90, 120	83.92, 167.02; 90, 90, 120
Разрешение, Å	2.40	2.55
Количество независимых рефлексов	27430	23319
Полнота набора, %	98.81	98.43
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	2.97	2.85
<i>R</i> _{merge} -F, %	23.5	19.1

симой части ячейки содержатся две молекулы фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Провели клонирование гена, кодирующего *Ec*HGPRT, создали высокоэффективный штамм-продуцент, подобрали условия культивирования и разработали методику выделения и очистки фермента, включающую в себя две хроматографические стадии. Всего было наработано 78.5 мг *Ec*HGPRT с концентрацией 17 мг/мл и чистотой 98.6%.

Для полученного препарата *Ec*HGPRT выявлена активность в отношении природного субстрата, определен температурный оптимум и исследована активность в отношении веществ T-705 и T-1105.

Как видно на рис. 1а, температурный оптимум *Ec*HGPRT – 44°C, при этой температуре активность фермента в отношении природного субстрата гипоксантина составила 290 мкМ/(мин·мг). В условиях температурного оптимума удалось

подтвердить активность *Ec*HGPRT в отношении противовирусных веществ T-705 и T-1105 (рис. 1б). При этом активность фермента в отношении обоих неприродных субстратов оказалась на порядки ниже по сравнению с гипоксантином. Активность *Ec*HGPRT в отношении вещества T-1105 в 2 раза выше по сравнению с его фторированным производным T-705. Таким образом, подтвердили, что *Ec*HGPRT обладает сродством к производным пиразин-2-карбоксамида и что для этого фермента характерна субстратная специфичность, схожая с HGPRT человека [14].

Исследование пространственной структуры комплексов *Ec*HGPRT с T-1105 и T-705 может показать, какие аминокислотные остатки принимают участие в связывании этих соединений и играют определяющую роль в субстратной специфичности фермента. При подборе условий кристаллизации рекомбинантной *Ec*HGPRT с лигандами за основу были взяты условия кристаллизации гипоксантинфосфорибозил трансферазы *E. coli* (pdb ID 1GRV). Согласно [26] у 6-фторпроизводных пиразин-2-карбоксамида,

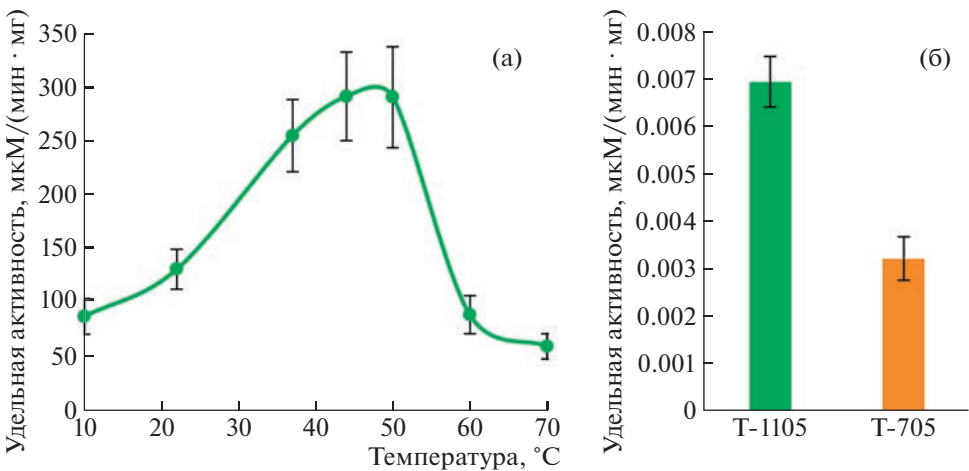


Рис. 1. Удельная активность *Ec*HGPRT в отношении природных и неприродных субстратов: а – температурная зависимость активности в отношении гипоксантина, б – активность в отношении производных пиразин-2-карбоксамида. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения.

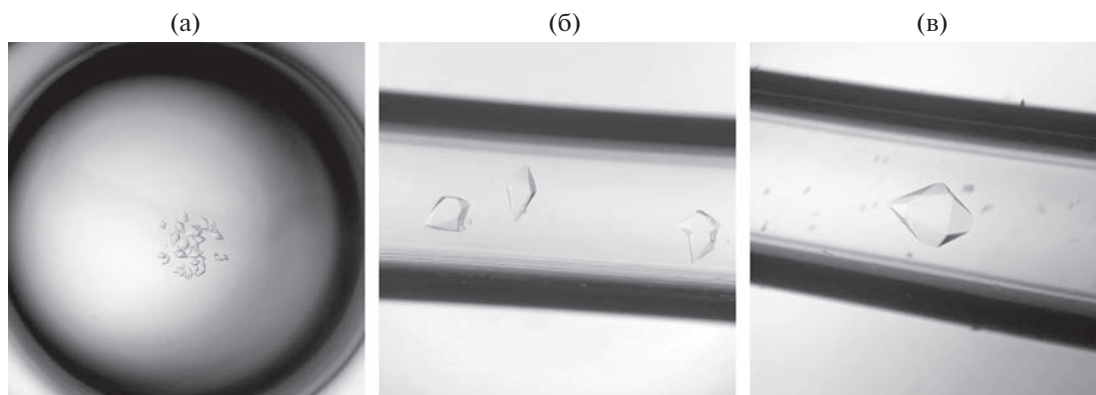


Рис. 2. Кристаллы *EeHGPRT*, полученные методом диффузии паров осадителя в висячей капле (а), методом встречной диффузии в капилляре при сокристаллизации с веществом Т-705 (б), методом встречной диффузии в капилляре при сокристаллизации с веществом Т-1105 (в).

Т-705 и Т-705-RMP при $\text{pH} > 7$ происходит гидролиз гетероциклического основания. В связи с этим условия кристаллизации были скорректированы изменением значения pH с 7.5 до 6.8. При выращивании кристаллов методом диффузии паров растворителя в висячей капле не удалось получить монокристаллы, пригодные для рентгеновского исследования, из-за образования сростков кристаллов (рис. 2а). При адаптации условий кристаллизации применительно к методу встречной диффузии в капилляре удалось решить проблему образования друз и увеличить размер монокристаллов на порядок. Кристаллы относятся к пр. гр. $P3(1)21$. В независимой части ячейки содержатся две молекулы фермента. С кристаллов, полученных сокристаллизацией с Т-705 и Т-1105, собраны дифракционные наборы (рис. 2б, 2в). Дифракционные наборы комплексов *EeHGPRT* с Т-1105 и Т-705 собраны до разрешения 2.4 и 2.55 Å соответственно.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-13-00429) в части получения и исследования кинетических параметров рекомбинантного фермента, а также при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части кристаллизации и сбора дифракционных данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hucke F.I.L., Bestehorn-Willmann M., Bassetto M. et al.* // *Virus Genes*. 2022. V. 58 (3). P. 188. <https://doi.org/10.1007/s11262-022-01892-x>
2. *De Vleeschauwer A.R., Lefebvre D.J., Willems T. et al.* // *Transbound. Emerg. Dis*. 2016. V. 63 (2). P. e205. <https://doi.org/10.1111/tbed.12255>
3. *Hayden F.G., Shindo N.* // *Curr. Opin. Infect. Dis*. 2019. V. 32 (2). P. 176. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000532>
4. *Delang L., Abdelnabi R., Neyts J.* // *Antiviral Res*. 2018. V. 153. P. 85. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.03.003>
5. *De Clercq E., Li G.* // *Clin. Microbiol. Rev*. 2016. V. 29 (3). P. 695. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>
6. *Furuta Y., Takahashi K., Shiraki K. et al.* // *Antiviral Res*. 2009. V. 82 (3). P. 95. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.02.198>
7. *Furuta Y., Komeno T., Nakamura T.* // *Proc. Jpn. Acad. B. Phys. Biol. Sci*. 2017. V. 93 (7). P. 449. <https://doi.org/10.2183/pjab.93.027>
8. *Lu J.W., Chen Y.C., Huang C.K. et al.* // *Antiviral Res*. 2021. V. 195 P. 105188. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105188>
9. *Furuta Y., Takahashi K., Fukuda Y. et al.* // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2002. V. 46 (4). P. 977. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.4.977-981.2002>
10. *Konstantinova I.D., Andronova V.L., Fateev I.V., Esipov R.S.* // *Acta Naturae*. 2022. V. 14 (2). P. 16. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11652>
11. *Negru P.A., Radu A.F., Vesa C.M. et al.* // *Biomed. Pharmacother*. 2022. V. 147. P. 112700. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112700>
12. *Hung D.T., Ghula S., Aziz J.M.A. et al.* // *Int. J. Infect. Dis*. 2022. V. 120. P. 217. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.04.035>
13. *Garcia-Lledo A., Gomez-Pavon J., Gonzalez Del Castillo J. et al.* // *Rev. Esp. Quimioter*. 2022. V. 35 (2). P. 115. <https://doi.org/10.37201/req/158.2021>
14. *Naesens L., Guddat L.W., Keough D.T. et al.* // *Mol. Pharmacol*. 2013. V. 84 (4). P. 615. <https://doi.org/10.1124/mol.113.087247>
15. *Sangawa H., Komeno T., Nishikawa H. et al.* // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2013. V. 57 (11). P. 5202. <https://doi.org/10.1128/AAC.00649-13>

16. *Shannon A., Selisko B., Le N.T. et al.* // Nat. Commun. 2020. V. 11 (1). P. 4682.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-18463-z>
17. *Eads J.C., Scapin G., Xu Y. et al.* // Cell. 1994. V. 78 (2). P. 325.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90301-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90301-8)
18. *Schumacher M.A., Carter D., Roos D.S. et al.* // Nat. Struct. Biol. 1996. V. 3 (10). P. 881.
<https://doi.org/10.1038/nsb1096-881>
19. *Guddat L.W., Vos S., Martin J.L. et al.* // Protein Sci. 2002. V. 11 (7). P. 1626.
<https://doi.org/10.1110/ps.0201002>
20. *Shi W., Li C.M., Tyler P.C. et al.* // Biochemistry. 1999. V. 38 (31). P. 9872.
<https://doi.org/10.1021/bi990664p>
21. *Focia P.J., Craig 3rd S.P., Nieves-Alicea R. et al.* // Biochemistry. 1998. V. 37 (43). P. 15066.
<https://doi.org/10.1021/bi981052s>
22. *Shi W., Munagala N.R., Wang C.C. et al.* // Biochemistry. 2000. V. 39 (23). P. 6781.
<https://doi.org/10.1021/bi000128t>
23. *Monzani P.S., Trapani S., Thiemann O.H., Oliva G.* // BMC Struct. Biol. 2007. V. 7 (59).
<https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-59>
24. *Takahashi S., Tsurumura T., Aritake K. et al.* // Acta Cryst. F. 2010. V. 66 (7). P. 846.
<https://doi.org/10.1107/S1744309110020828>
25. *Battye T.G., Kontogiannis L., Johnson O. et al.* // Acta Cryst. D. 2011. V. 67 (4). P. 271.
<https://doi.org/10.1107/S0907444910048675>
26. *Huchting J., Winkler M., Nasser H., Meier C.* // ChemMedChem. 2017. V. 12 (9). P. 652.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201700116>

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.55

ВЛИЯНИЕ ВОЗВРАЩЕНИЯ CYS11 НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ S11C CYS-FREE NT.BSPD6I

© 2023 г. Р. И. Артюх^{1,*}, Б. Ф. Фатхуллин², В. Н. Антипова¹, Т. А. Перевязова¹,
Г. С. Качалова¹, А. К. Юнусова¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

²Институт белка РАН, Пушкино, Россия

*E-mail: rimmaartukh@gmail.com

Поступила в редакцию 30.06.2023 г.

После доработки 20.07.2023 г.

Принята к публикации 20.07.2023 г.

Пространственная структура рекомбинантной никующей эндонуклеазы S11C Cys-free Nt.BspD6I определена с разрешением 1.85 Å. Никаза S11C Cys-free Nt.BspD6I получена в результате возвращения Cys11 в Cys-free Nt.BspD6I методом сайт-направленного мутагенеза. Анализ кристаллической структуры никазы S11C Cys-free Nt.BspD6I показал, что возвращение Cys11 индуцирует заметные конформационные изменения в узнающем домене никазы, которые сопровождаются изменениями в ее функции: уменьшением сродства к ДНК, потерей образования олигомерных форм и высокой активностью эндонуклеазы рестрикции S11C Cys-free R.BspD6I.

DOI: 10.31857/S0023476123600702, EDN: YEJZJU

ВВЕДЕНИЕ

Цистеиновые аминокислотные остатки (а. о.) редко встречаются (1.9%) в молекулах белка, за исключением случаев, когда они определяют основную функцию белков, например металлопротеин-подобные белки [1]. Присутствие цистеинов в активном центре белков определяется высокой реакционной активностью их тиольных групп. Согласно данным “Mechanism and Catalytic Site Atlas” (M-CSA) количество ферментов с а. о. цистеина, задействованных в каталитической функции, составляет 189 из 648 ферментов [2, 3].

Цистеины участвуют в окислительно-восстановительных реакциях. Окисление цистеина ведет к образованию связи между двумя атомами серы от двух разных а. о. цистеинов. Дисульфидные мостики поддерживают стабильную структуру молекулы белка [4].

В связи с этим возникает интерес определить роль остатков цистеина в структуре и функции никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I (никазы).

Никаза Nt.BspD6I принадлежит к классу уникальных ферментов, которые связываются со специфической последовательностью в ДНК и гидролизуют только одну цепь. Никаза узнает асимметричный короткий сайт 5'-GAGTC-3' в двухцепочечной ДНК (дцДНК) и вносит ник в верхнюю цепь дцДНК на расстоянии четырех нуклеотидов от узнающего сайта в сторону 3'-конца.

Гетеродимерная эндонуклеаза рестрикции R.BspD6I состоит из двух разных субъединиц (никаза и малая субъединица BspD6I) и расщепляет обе цепи дцДНК. Структуры никазы (PDB ID: 2EWF) и малой субъединицы BspD6I (PDB ID: 2P14) определены с высоким разрешением в [5].

Молекула никазы имеет доменную структуру: N-концевой узнающий домен, состоящий из двух субдоменов D1 и D2, линкерный домен и C-концевой расщепляющий домен (рис. 1). Механизм функционирования никазы Nt.BspD6I до настоящего времени не известен. Для изучения механизма функционирования ферментов используют метод сайт-направленного мутагенеза индивидуальных а. о. в структуре белка.

Пространственное расположение цистеиновых остатков в молекуле никазы позволяет определить их влияние как на связывание, так и на гидролиз ДНК, так как два цистеиновых остатка (11 и 160) локализованы в D1- и D2-субдоменах узнающего домена соответственно, и два других цистеиновых остатка (508 и 578) расположены в расщепляющем домене.

В [6] определена кристаллическая структура никазы Cys-free Nt.BspD6I, в которой четыре цистеиновых остатка (11, 160, 508 и 578) заменены на серин. Анализ структуры и функциональной активности Cys-free-никазы показал, что замещение цистеинов на серин не влияет на никующую функцию, тогда как имеет значительное воздей-

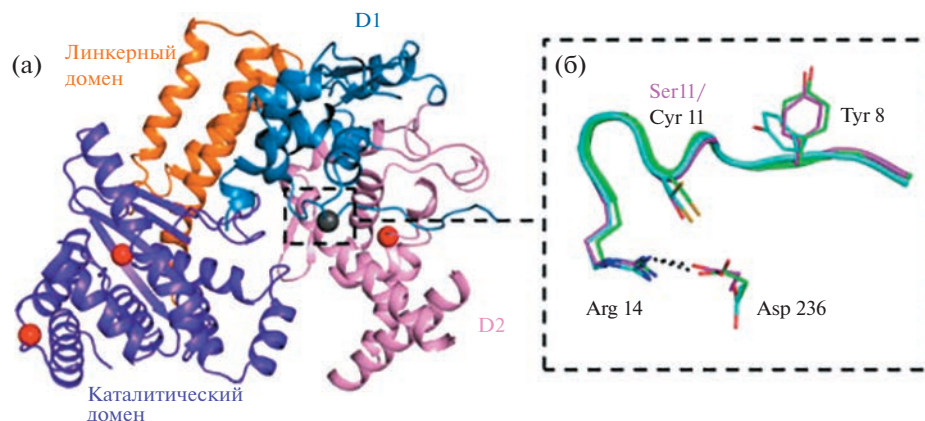


Рис. 1. Структура А-цепи S11C-никазы и влияние мутации: а – организация доменов S11C-никазы. Положения мутированных аминокислот показаны красными сферами, Cys11 – серой сферой; б – наложение трех структур никазы: wt-никаза (зеленый), Cys-free-никаза (пурпурный) и А-цепь S11C-никазы (голубой) в области остатка Cys11. Водородные связи показаны черными точками. Показаны две альтернативные конформации Cys11 (голубой) для S11C-никазы.

ствие на рестрикционную активность мутантной рестриктазы R.BspD6I. Поэтому важно определить, один или более из четырех остатков цистеина являются важными для активности рестриктазы R.BspD6I. С этой целью получена S11C-никаза Cys-free Nt.BspD6I (**S11C-никаза**) методом сайт-направленного мутагенеза, в которой один остаток цистеина (Cys11) “возвращен” (обратно мутирован), а три цистеиновых остатка (160, 508 и 578) заменены на серин. Цель данной работы – изучить структуру и функцию S11C-никазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Никаза Nt.BspD6I и малая субъединица (ss) BspD6I получены ранее [7, 8].

Получение и выделение S11C-никазы. S11C-никазу получали методом сайт-направленного мутагенеза на плазмиде pET28b/Cys-free Nt.BspD6I [6] с использованием праймеров:

S11C-f: 5'-TGTTCACCTAGAAGTCCAGA-3' и S11C-r: 5'-AGAAACATACCAATTAACCTTTT-3' (Синтол, Россия). Замена серина на цистеин в гене никазы была подтверждена секвенированием.

Белок S11C-никазы получали, как описано в [9]. Биомассу выращивали на среде LB с антибиотиками (40 мкг/мл канамицина и 10 мкг/мл хлорамфеникола) в течение 3 ч при 37° С до оптической плотности $D_{590} = 0.68$ О.Е. и охлаждали до комнатной температуры. Целевой белок индуцировали 1 мМ изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом. Клетки инкубировали в течение ночи при интенсивной аэрации при температуре 20°С. Затем клетки осаждали на центрифуге CR 22GIII (Hitachi, Япония) при 18000 g в течение 30 мин при 4°С и ресуспендировали в буфере А (20 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7.5, 7 мМ β -меркаптоэтанол, 1 мМ этилендиаминтетрауксусная кис-

лота), содержащем 1 мМ фенилметилсульфонил-фторида, при 4°С. Клетки разрушали ультразвуком до снижения оптической плотности в 10 раз на дезинтеграторе УЗД-1 У4.2 (СССР) и центрифугировали при 18 000 g 30 мин (4°С). Полученный лизат очищали в две стадии с помощью хроматографии с использованием системы BioLogic LP (Bio-Rad). Первичную очистку проводили на Ni-NTA-агарозе (QIAGEN, Германия), уравновешенной буфером А с добавлением 10 мМ имидазола. Разделение проводили в ступенчатом градиенте имидазола (30, 50 и 100 мМ) в буфере А со скоростью 0.5 мл/мин. Фракции анализировали на наличие целевого белка методом электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле по Лэммли [10]. Целевой продукт обнаружен во фракциях, элюированных 100 мМ имидазола. Для очистки от примесей фракции, содержащие максимальное количество мутантной никазы, объединяли, диализовали против буфера В (10 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7.5, 100 мМ KCl, 10% глицерина) и наносили на колонку с фосфоцеллюлозой P11 (Whatman, Великобритания), уравновешенную буфером В, со скоростью 0.3 мл/мин. Разделение проводили в ступенчатом градиенте KCl (200, 500 и 800 мМ) в буфере В со скоростью 0.5 мл/мин. Целевой белок обнаруживали во фракциях, элюированных 500 мМ KCl. Для последующей кристаллизации отбирали фракции с наибольшей концентрацией белка.

Определение активности S11C-никазы. Активность S11C-никазы определяли гидролизом 1 мкг ДНК фага T7 (“СибЭнзим”, Россия) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 150 мМ KCl и 1 мМ β -меркаптоэтанол, в течение 1 ч при 55°С. Продукты расщепления ДНК разделяли электрофорезом в 0.8%-ном агарозном геле с использованием трис-ацетатного

буфера. ДНК окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-трансиллюминаторе.

Связывание S11C-никазы с ДНК дуплексом. Комплементарные 26-мерные олигонуклеотиды А и В (5'-CTGATGAAGAGTCCTTAGTTACACT G-3' и 5'-CAGTGTAACCTAAGGACTCTTCATCA G-3') смешивали в эквимольных количествах в буфере (20 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 50 мМ NaCl и 1 мМ β -меркаптоэтанол), нагревали на водяной бане до 90°C и медленно охлаждали до комнатной температуры.

Комплекс дуплекса АВ (1 мкМ) с никазой получали в буфере для связывания (10 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 10 мМ CaCl₂, 1 мМ дитиотреитол) при варьировании концентрации белка в течение 15 мин при 55°C. Эксперименты проводили не менее трех раз. Продукты комплексообразования разделяли электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле при постоянном токе 20 мА в трис-ацетатном буфере, pH 8.0 [11]. Положение АВ-дуплекса и комплекса в геле определяли бромистым этидием.

Кристаллизация S11C-никазы. Очищенный белок S11C-никазы (36.5 мг/мл) в буфере (20 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 200 мМ KCl и 10% глицерина) кристаллизовали при 293 К методом диффузии паров в варианте сидячей капли. Кристаллизационную каплю, которая состояла из 2 мкл белка и 1 мкл резервуарного раствора, уравнивали 100 мкл резервуарного раствора, содержащего 0.04 М K₂HPO₄, 16 мас. % ПЭГ 8000 и 20% глицерина, pH 5.5. Через 24 ч образовались игольчатые кристаллы. На четвертые сутки размеры кристаллов достигали 950–750 × 100 × 50 мкм.

Сбор и обработка данных рентгеноструктурного анализа (РСА) монокристалла S11C-никазы. Данные РСА монокристалла S11C-никазы получены на станции ID23-1 в Европейском центре синхротронного излучения (ESRF; Гренобль, Франция) при 100 К с использованием CCD-детектора ADSC QUANTUM 315г с монохроматическим излучением с длиной волны 0.97623 Å. Полный угол поворота кристалла составлял 100° с шагом осцилляции 0.1°. Кристалл в нейлоновой петле замораживали без добавления криораствора. Полный набор данных получен при разрешении 1.85 Å. Индексацию и интегрирование экспериментальных данных проводили с помощью программ XDS [12, 13] и iMosflm [14]. Масштабирование интенсивности и расчет структурных факторов проводили с помощью программы Scala [15]. Уточнение структуры выполнено в REFMAC [16]. Данные и статистика уточнения приведены в табл. 1.

Атомные координаты модели и структурные факторы S11C-никазы депонированы в PDB ID: 5LIQ.

Таблица 1. Статистические характеристики дифракционного набора и кристаллографического уточнения

Статистика набора	
Пр. гр.	$P2_1$
a, b, c , Å	76.20, 92.48, 113.81
α, β, γ , град	90.00, 105.67, 90.00
Разрешение, Å	109.6–1.85 (1.92–1.85)*
R_{merge}	0.03 (0.66)
Среднее $I/\sigma(I)$	18.7 (2.0)*
Полнота набора, %	99.6 (99.6)*
Избыточность	3.8 (3.6)*
Число отражений на независимую часть элементарной ячейки	129040 (12820)
Уточнение структуры	
Разрешение, Å	19.58–1.85
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.21/0.25 (0.33/0.34)
В-фактор Вильсона, Å ²	39.2
Число атомов	
Неводородные атомы	10 168
Белковые атомы	9671
Атомы лигандов	83
Атомы растворителя	295
Карта Рамачандрана	
предпочтительные, %	97.49
разрешенные, %	2.34
запрещенные, %	0.17
R.M.S.D.	
Связи, Å	0.07
Углы, град	0.08
В-фактор, Å ²	
Средний	48.4
Белка	48.29
Лигандов	60.42
Растворителя	47.95
Выбросы по ротамерам (%)	1.57

* Данные в скобках соответствуют зоне высокого разрешения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Структурное исследование. Собран набор данных с монокристалла и определена структура S11C-никазы с высоким разрешением (1.85 Å) (рис. 2). Кристаллы S11C-никазы относятся к пр. гр. $P2_1$ и содержат две молекулы никазы (цепи А и В) в асимметричной ячейке. Кристаллы никазы дикого типа (wt) [5] и Cys-free-никазы [6] относятся к одной и той же пространственной группе.

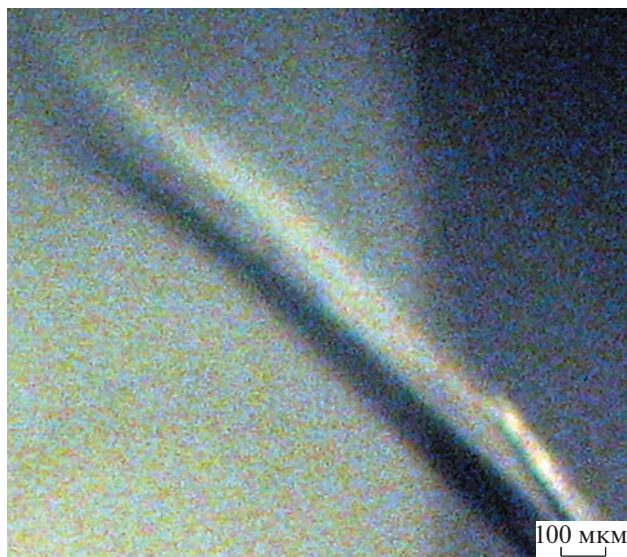


Рис. 2. Фото кристалла S11C Cys-free Nt.BspD6I.

Наложение структуры А-цепи S11C-никазы дает следующие значения среднеквадратичного отклонения координат (**RMSD**) C_{α} -атомов: с В-цепью — 0.573 Å, с Cys-free-никазой — 0.773 Å, с wt-никазой — 0.429 Å. Эти значения указывают на незначительные различия в положении атомов C_{α} в сравниваемых структурах никаза.

Сравнение структур никаза S11C, wt и Cys-free выявило а. о., конформация боковых групп которых изменилась в результате возврата Cys11 в Cys-free-никазу. Например, положения Cys11 в wt-никазе и Ser11 в Cys-free-никазе совпадают, а тиольная группа возвращенного Cys11 занимает два альтернативных положения: А и В. Положение А совпадает с положением Cys11 в wt-никазе и Ser11 в Cys-free-никазе.

В положении В SH-группа Cys11 повернута на 120° вокруг связи C_{α} — C_{β} в сторону Tyr8, гидроксильная группа которого сближается с SH-группой Cys11 на 4.6 Å в результате поворота фенольного кольца Tyr8 на 85° относительно его положения в wt- и Cys-free-никазах (рис. 3). Как видно из рис. 3, Cys11 в wt-никазе и Ser11 в Cys-free-никазе расположены на расстоянии 10 Å от фенольного кольца Tyr8. Возвращение Cys11 также вызывает изменение положения карбоксильной группы Asp236 по отношению к ее положению в никазах wt и Cys-free. Карбоксильная группа повернута вокруг связи C_{α} — C_{β} на угол 67.4°, а атом C_{γ} смещен на 1.8 Å, что приводит к потере водородной связи (2.8 Å) с Arg14.

Изменения в электростатических взаимодействиях наблюдаются также в области Lys106, связанного водородной связью в Cys-free-никазе с OE2/Glu442 (3.09 Å) и с OE2/Glu364 (3.29 Å), тогда

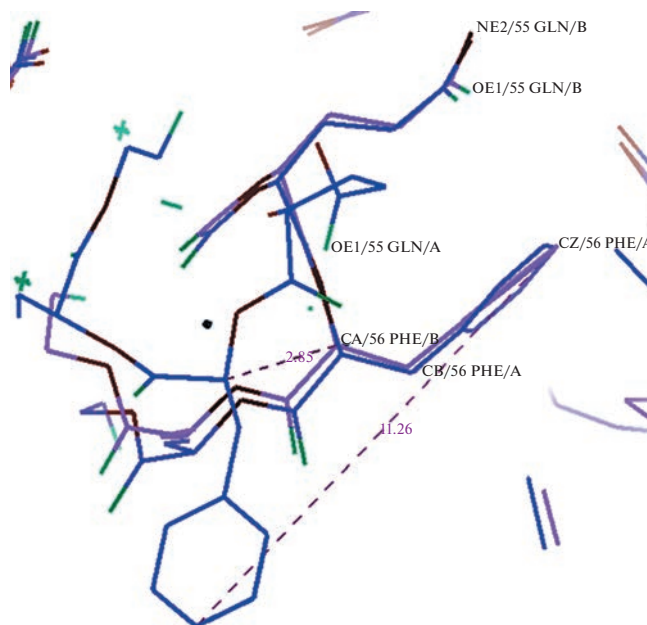


Рис. 3. Наложение фрагмента петли L1 в молекулах Cys-free (желтый) и А- и В-цепей (зеленый и голубой) S11C-никаза.

как в S11C- и wt-никазе этих взаимодействий не происходит. Таким образом, Lys106 субдомена D1 образует связь как с линкерным доменом, так и с С-доменом в Cys-free-никазе, что, вероятно, важно для поддержания конформации молекулы никаза, необходимой для ее функционирования.

Возврат Cys11 вызывает значительные изменения положения некоторых боковых групп гидрофобных остатков в субдоме D1 узнающего домена. Наложение структур Cys-free- и S11C-никаза (рис. 3) демонстрирует заметные конформационные изменения, которым подвергается боковая цепь Phe56.

Как видно из рис. 3, C_{α} -атом полипептидной цепи в этом районе смещен на 2.85 Å, а фенольное кольцо Phe56 развернуто вокруг связи C_{α} — C_{β} , что приводит к смещению C_{γ} -атома фенольного кольца в двух никазах на 11.26 Å друг относительно друга. На рис. 3 также хорошо видно изменение положения боковой группы Gln55. Аминокислотные остатки, боковые группы которых изменяют свою конформацию в результате возвращения Cys11, занимают такое же положение в wt-никазе, также содержащей Cys11.

Таким образом, сравнительный структурный анализ никаза S11C, Cys-free и wt показал, что возвращение Cys11 сопровождается конформационными изменениями в N-концевом узнающем домене (рис. 1, 3).

Функциональное исследование. В связи с изложенным выше интерес заключался в том, чтобы определить возможное влияние возврата Cys11 на

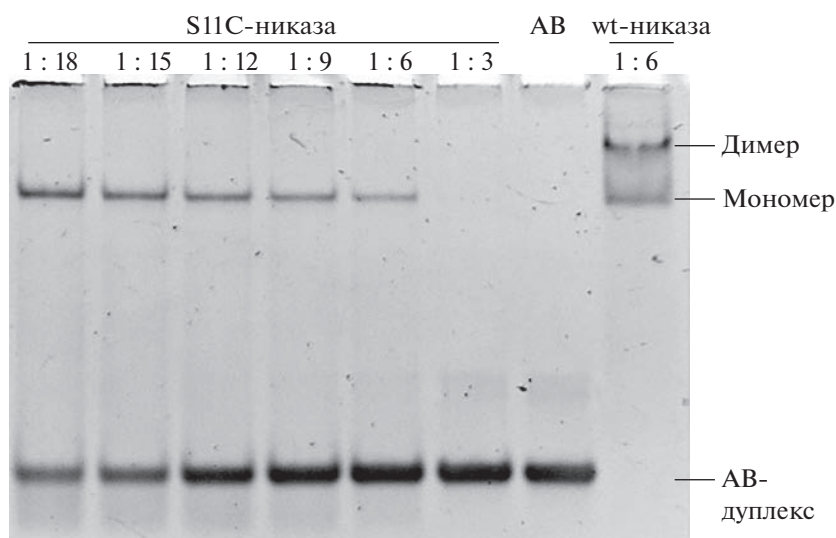


Рис. 4. Образование комплексов ДНК-дуплекса с никазами wt и S11C. Отношение концентрации дуплекса АВ (1 мкМ) к концентрации никаз wt и S11C обозначено цифрами сверху (мкМ).

связывание S11C-никазы с ДНК. Для этого сравнили связывание ДНК-дуплекса с wt-никазой в концентрации, соответствующей полному связыванию 1 мкМ дуплекса [6], и S11C-никазы в концентрации от 3 до 18 мкМ (рис. 4).

Используемый АВ-дуплекс состоит из 26 последовательностей нуклеотидов (п. н.) и содержит сайт узнавания 5'-GAGTC. В [6] показано, что полное связывание АВ-дуплекса Cys-free-никазой происходит при концентрации 9 мкМ. Эта концентрация никазы указывает на то, что полная замена всех цистеиновых остатков на серин в никазе немного снижает ее способность связывать дуплекс по сравнению с wt-никазой, полное связывание которой происходит при 6 мкМ. Как видно из рис. 4, возврат Cys11 не приводит к полному связыванию дуплекса даже при концентрации 18 мкМ. Следовательно, возврат Cys11 значительно снижает родство S11C-никазы к ДНК.

В [17] было показано, что цистеиновые а. о. 11 и 160 узнающего домена или один из них образуют ковалентную связь с ДНК-дуплексом, имеющим в сайте узнавания реактивную группу, специфически взаимодействующую с тиоловой группой цистеинов. Эти данные указывают на близкое расположение а. о. цистеина 11 или 160 к ДНК при образовании комплекса с никазой. Данные, полученные при анализе структуры S11C-никазы (рис. 1) и в эксперименте по связыванию этого белка с ДНК (рис. 4), позволяют предположить, что именно Cys11 находится вблизи сайта узнавания и поэтому конформационное изменение в области Cys11 оказывает такое сильное влияние на связывание S11C-никазы с ДНК.

Отметим, что Cys160 локализован в глубине субдомена D2, а Cys11 расположен на поверхно-

сти щели, в которую, согласно модели комплекса никаза-ДНК, встраивается ДНК [5]; поэтому весьма вероятно, что Cys11 взаимодействует с ДНК. На взаимодействие S11C-никазы с ДНК могут влиять и другие а. о., расположенные в щели (Tyr8, Asp236, Cys11, петля L1 с Phe56), боковые группы которых, как показано выше, претерпевают конформационные изменения в результате возвращения Cys11.

Особо отметим, что с увеличением концентрации S11C-никазы (рис. 4) увеличивается концентрация мономерного комплекса никазы с дуплексом, а олигомерные формы белка не образуются даже при концентрации 18 мкМ. Никаза дикого типа в концентрации 6 мкМ образует большое количество димерных комплексов с дуплексом, а в случае Cys-free-никазы количество димерных комплексов с дуплексом превышает количество мономерных даже при концентрации 3 мкМ [6]. Способность белка образовывать олигомерные формы при увеличении его концентрации является свойством многих белков [18, 19]. Возможно, конформационные изменения, обнаруженные в узнающем домене S11C-никазы, происходят в областях, участвующих в межмолекулярных взаимодействиях [20].

Представляло интерес определить, влияет ли возвращение Cys11 на способность никазы гидролизовать фосфодиэфирную связь в ДНК. Как правило, активность никазы определяется ее способностью расщеплять ДНК фага T7. Активность wt- и S11C-никаз определяли по полноте специфического гидролиза 1 мкг нативной ДНК фага T7 в течение 1 ч в оптимальных для фермента условиях. Узнаваемая никазой последовательность 5-GAGTC встречается в этой ДНК 115 раз,

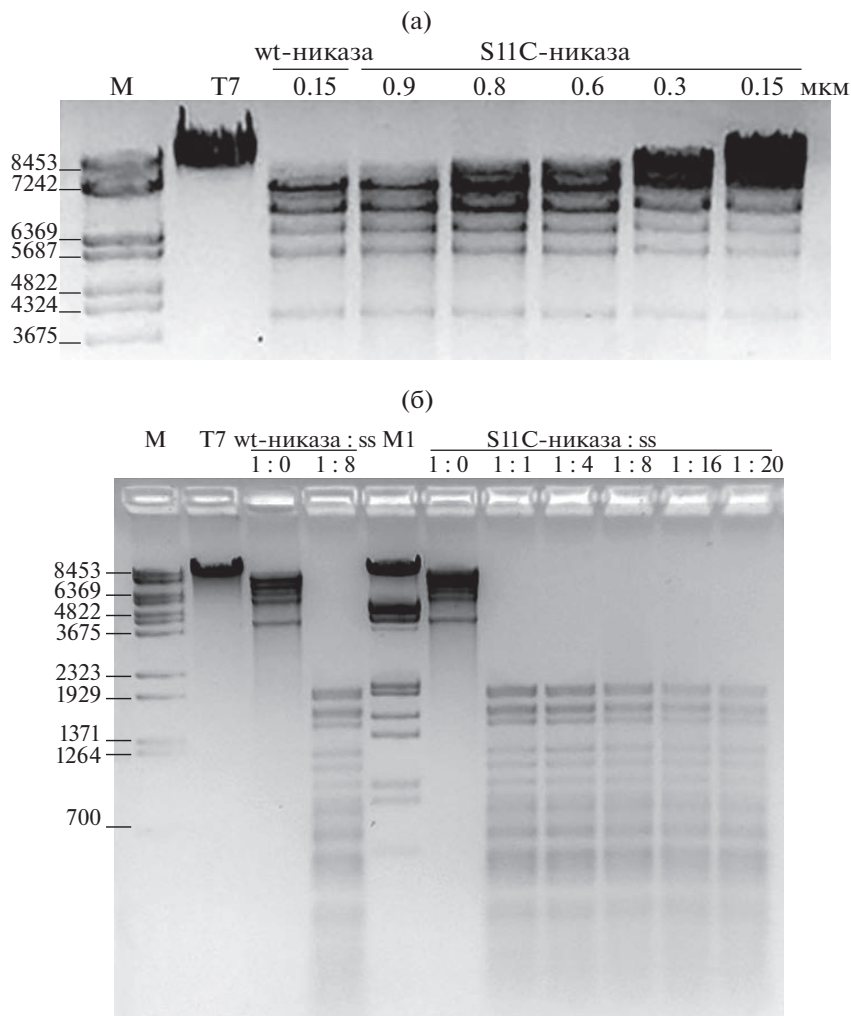


Рис. 5. Продукты гидролиза ДНК фага T7 никазами wt и S11C Nt.BspD6I (а) и эндонуклеазами рестрикции wt и S11C R.BspD6I (б); М – маркер ДНК (Lambda/Eco911) (Fermentas, Thermo Fisher), M1 – маркер ДНК (Lambda: EcoRI + HindIII; Thermo Fisher Scientific), T7 – необработанная ДНК фага T7. Размеры маркеров в п. н. указаны слева. Концентрация никаз wt и S11C (мкМ) и отношение концентрации никазы к концентрации малой субъединицы (ss) обозначены сверху.

но никаза гидролизует ДНК на фрагменты только в том случае, если два инвертированных сайта расположены на расстоянии ~7–17 п. н. друг от друга. В ДНК фага T7 таких последовательностей четыре. Таким образом, никование ДНК фага T7 приводит к образованию пяти фрагментов. На рис. 5а представлены продукты гидролиза ДНК wt- и S11C-никазами. На рис. 5а показан полный гидролиз ДНК фага T7 wt- и S11C-никазами в концентрации 0.15 и 0.9 мкМ соответственно. Эти данные указывают на то, что возвращение Cys11 значительно снижает никующую активность S11C-никазы по сравнению с wt- и Cys-free-никазами, обладающими одинаковой активностью [6]. Наиболее вероятной причиной низкой активности S11C-никазы является низкое сродство к ДНК (рис. 4).

Никаза вместе с малой субъединицей образуют гетеродимерную эндонуклеазу рестрикции R.BspD6I, которая гидролизует обе цепи ДНК. Ранее было показано, что активность R.BspD6I, состоящей из большой субъединицы Cys-free-никазы и малой субъединицы BspD6I, в 2 раза ниже активности wt R.BspD6I [6].

В связи с этими данными представляло интерес выяснить, влияет ли возвращение Cys11 на рестрикционную активность R.BspD6I. Поскольку 100%-ное никование ДНК wt- и S11C-никазами происходит при концентрациях 0.15 и 0.9 мкМ соответственно (рис. 5а), эти концентрации использованы при гидролизе ДНК рестриктазой S11C R.BspD6I. На рис. 5б показаны продукты рестрикции ДНК фага T7 рестриктазой R.BspD6I,

состоящей из большой субъединицы S11C-никазы и малой субъединицы BspD6I.

О полной рестрикции ДНК судили по образованию набора фрагментов длиной менее 2000 п.н. Как видно из рис. 5б, полный гидролиз ДНК рестриктазой S11C R.BspD6I наблюдается уже при соотношении концентраций большой и малой субъединиц 1 : 1, в то время как wt R.BspD6I осуществляет полную рестрикцию ДНК только при соотношении 1 : 8. Рестриктаза R.BspD6I с S11C-никазой в мономерной форме проявляет в несколько раз выше активность относительно рестриктазы wt R.BspD6I и рестриктазы с Cys-free-никазой. Причиной различий в активности рестриктаз является то, что в условиях полной рестрикции ДНК большие субъединицы двух последних рестриктаз находятся в олигомерной форме [6]. Ранее мы предположили, что на активность рестриктазы влияет олигомеризация большой субъединицы. Это исследование подтверждает предположение и указывает на то, что лимитирующей стадией рестрикции является десорбция большой субъединицы от ДНК после ее гидролиза. По-видимому, олигомерные формы никазы диссоциируют медленнее, чем мономерные, вероятно, из-за большего числа контактов с ДНК. Следовательно, в случае олигомерных форм большой субъединицы требуется большее количество молекул малых субъединиц, чтобы облегчить диссоциацию никазы от ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, возвращение Cys11 в Cys-free-никазу привело к тому, что белок утратил способность образовывать олигомерные формы, его сродство к ДНК было снижено, а активность эндонуклеазы рестрикции R.BspD6I, образованной большой субъединицей S11C-никазы и малой субъединицей BspD6I, повысилась. Все структурные изменения происходят вдоль щели, образованной N-концом узнающего домена, петель L1 субдомена D1 и α 5-спиралью субдомена D2. Полагаем, что аминокислоты, расположенные в этой щели, непосредственно взаимодействуют с ДНК и ответственны за функциональную активность никазы.

Авторы выражают благодарность А.Н. Попову и Европейскому центру синхротронного излучения (ESRF) (Гренобль, Франция).

Работа выполнена при финансовой поддержке ИТЭБ РАН (госзадание № 075-01025-23-01).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang W.-C., Mao H., Ma D.-D., Yang W.-X. // Front. Mar. Sci. 2014. V. 1. <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00034>
2. Holliday G.L., Mitchell J.B., Thornton J.M. // J. Mol. Biol. 2009. V. 390. P. 560. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.05.015>
3. Ribeiro A.J.M., Tyzack J.D., Borkakoti N. et al. // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. P. 314. <https://doi.org/10.1074/jbcREV119.006289>
4. Leichert L.I., Jakob U. // Antioxid. Redox Signal. 2006. V. 8 (5–6). P. 763. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.763>
5. Kachalova G.S., Rogulin E.A., Yunusova A.K. et al. // J. Mol. Biol. 2008. V. 384 (2). P. 489. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.033>
6. Artyukh R.I., Fatkhullin B.F., Kachalova G.S. et al. // Biochim. Biophys. Acta — Proteins Proteom. 2022. V. 1870 (3). P. 140756. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2022.140756>
7. Zheleznyaya L.A., Perevyazova T.A., Alzhanova D.V., Matvienko N.I. // Biochemistry. 2001. V. 66. P. 989.
8. Yunusova A.K., Rogulin E.A., Artyukh R.I. et al. // Biochemistry. 2006. V. 71. P. 815.
9. Rogulin E.A., Perevyazova T.A., Zheleznyaya L.A., Matvienko N.I. // Biochemistry. 2004. V. 69 (10). P. 1123. <https://doi.org/10.1023/b:biry.0000046886.19428.d5>
10. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227 (5259). P. 680. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
11. Hellman L.M., Fried M.G. // Nat. Protoc. 2007. V. 2 (8). P. 1849. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.249>
12. Kabsch W. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. Pt. 2. P. 125. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
13. Kabsch W. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. Pt. 2. P. 133. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047374>
14. Battye T.G., Kontogiannis L., Johnson O. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. Pt. 4. P. 271. <https://doi.org/10.1107/S0907444910048675>
15. Evans P. // Acta Cryst. D. 2006. V. 62. Pt. 1. P. 72. <https://doi.org/10.1107/S0907444905036693>
16. Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. // Acta Cryst. D. 1997. V. 53. Pt. 3. P. 240. <https://doi.org/10.1107/S0907444996012255>
17. Abrosimova L.A., Samsonova A.R., Perevyazova T.A. // Mol. Biol. (Rus). 2020. V. 54. (4). P. 667. <https://doi.org/10.31857/S0026898420040023>
18. Goodsell D.S., Olson A.J. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2020. V. 29. P. 105. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.105>
19. Santos J., Pujols J., Pallarès I. et al. // Comput. Struct. Biotechnol. J. 2020. V. 18. P. 1403. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.05.026>
20. Sekerina S.A., Grishin A.V., Riazanova A.I. et al. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2012. V. 38 (4). P. 431. <https://doi.org/10.1134/s1068162012040127>

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

ПОЛУЧЕНИЕ И КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОМПЛЕКСА РЕЦЕПТОРСВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА SARS-CoV-2 И ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО НАНОАНТИТЕЛА

© 2023 г. К. М. Бойко^{1,*}, Л. А. Варфоломеева¹, Н. А. Егоркин¹, М. Е. Миняев², И. А. Алексеева³,
И. А. Фаворская³, Е. И. Рябова³, В. В. Прокофьев³, И. Б. Есмагамбетов³, Д. В. Щепляков³,
Д. Ю. Логунов³, А. Л. Гинцбург³, В. О. Попов¹, Н. Н. Случанко^{1,3,**}

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

²Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

³НИЦЭМ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия

*E-mail: kmb@inbi.ras.ru

**E-mail: nikolai.sluchanko@mail.ru

Поступила в редакцию 13.06.2023 г.

После доработки 13.06.2023 г.

Принята к публикации 27.06.2023 г.

Коронавирус SARS-CoV-2 стал причиной глобальной пандемии COVID-19, унесшей миллионы жизней по всему миру. Одним из подходов к терапии тяжелых форм этого заболевания является использование препаратов вируснейтрализующих антител к рецепторсвязывающему домену (RBD) спайкового белка (S) вируса. Детальная структурная информация о конкретных эпитопах, узнаваемых такими вируснейтрализующими антителами, является важным аспектом усовершенствования существующих антител с целью расширения спектра узнаваемых вирусных штаммов. Получен стехиометрический комплекс вируснейтрализующего однодоменного антитела P2C5 и гликозилированной формы RBD S-белка SARS-CoV-2. Несмотря на большое количество условий, при которых наблюдается рост кристаллов комплекса, последние не дифрагируют предположительно ввиду гетерогенности, связанной с гликозилированием RBD. С целью повышения качества кристаллов в бактериальной системе экспрессии получена дегликозилаза PNGase F и проведено дегликозилирование RBD. Несмотря на сниженную растворимость дегликозилированной формы RBD, она сохраняет способность связываться с нанокристаллом P2C5, что приводит к формированию прочного гетеродимерного комплекса при гель-фильтрации. Получены кристаллы такого комплекса, дифрагирующие на лабораторном и синхротронном источниках до сходного разрешения ~4 Å. Установлены пространственная группа симметрии, параметры кристаллической ячейки и ее белковый состав.

DOI: 10.31857/S0023476123600830, EDN: XOAIEU

ВВЕДЕНИЕ

Пандемии и сезонные эпидемии, связанные с вирусными заболеваниями, являются причиной серьезных негативных социально-экономических последствий. В настоящее время нейтрализующие антитела успешно применяются для терапии ряда инфекционных заболеваний [1–4]. В то же время продолжающиеся эпидемии вирусных инфекций способствуют появлению новых вариантов вируса, которые способны избегать как иммунитета, так и действия лекарственных препаратов. Некоторые наиболее эффективные клоны антител против одних вариантов вируса неизбежно теряют свое действие по отношению к новым штаммовым вариантам за счет накопления мутаций в последних. Наличие детальной

структурной информации о конкретных эпитопах, узнаваемых вируснейтрализующими антителами, позволит усовершенствовать имеющиеся антитела с помощью методов белковой инженерии и расширит эффективность стратегий борьбы с соответствующими инфекционными заболеваниями.

Инфекция COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, в период с 2019 до середины 2023 г. унесла почти 7 млн жизней по всему миру (<https://covid19.who.int>). С начала пандемии во всем мире проводится направленное получение моноклональных антител, обладающих высокой вируснейтрализующей активностью, для терапии тяжелого течения заболевания COVID-19 [1, 5]. В качестве основной мишени для таких антител

используется поверхностный гликопротеин (S-белок) вируса SARS-CoV-2, поскольку моноклональные антитела, специфично взаимодействующие с эпитопами S-белка, могут блокировать его взаимодействие с клеточным рецептором ACE-2 и тем самым препятствовать проникновению вируса в клетки человека [6].

В ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ был разработан препарат на основе нейтрализующих однодоменных антител (клон P2C5), который продемонстрировал эффективность на модели летальной инфекции ACE-2 трансгенных мышей различными вариантами вируса SARS-CoV-2, в том числе против актуальных вариантов Omicron BA.1, BA.2, BA.5. В результате изучения вируснейтрализующей активности препарата *in vitro* с использованием нативного вируса SARS-CoV-2 вариантов Omicron BA.1, BA.2, BA.5 была показана минимальная эффективная концентрация препарата менее 1.2 мкг/мл [7, 8].

В настоящей работе получены комплексы вируснейтрализующего антитела P2C5 с гликозилированной и дегликозилированной формами рецепторсвязывающего домена (RBD) вируса SARS-CoV-2 и оптимизированы условия получения кристаллов одного из комплексов, дифрагирующих до 3.7 Å. Установлены пространственная группа симметрии и параметры кристаллической ячейки. Согласно оценке коэффициента Мэтьюса и с учетом известной стехиометрии комплекса предполагается наличие пяти гетеродимеров RBD-P2C5 в независимой части элементарной ячейки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение комплекса RBD–наноантитело. Ген белка RBD изолята SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (инвентарный номер Генбанка MN908947, от 319 до 545 аминокислотного остатка) синтезирован (Евроген, Россия) и клонирован в вектор для экспрессии pCEP4 в клетках млекопитающих (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве сигнального пептида, обеспечивающего секрецию белка, использовали последовательность из гена щелочной фосфатазы SEAP. Для очистки белка использовали His-метку на С-концевом участке последовательности гена RBD. Полученный рекомбинантный вектор трансфицировали в клетки CHO-S, очистку белка проводили из культурального супернатанта через 10 дней после трансфекции. Рекомбинантный белок RBD очищали методом металл-хелатной аффинной хроматографии, а также гель-фильтрации [9]. Экспрессию и чистоту белка подтверждали с помощью SDS-PAGE. Однодоменное антитело P2C5 (VHH фрагмент) [7], несущее С-концевой гексагистидиновый таг, было получено в клетках Rosetta (DE3) путем экстракции белков периплазмы и дальнейшей

очистки на Ni-сефарозе и гель-фильтрации. Комплекс наноантитела P2C5 и RBD получали путем титрования RBD увеличивающимися количествами P2C5 и анализа полученного комплекса, эмпирически подбирая соотношение, при котором образовывался стехиометрически насыщенный комплекс и детектировался избыток антитела с помощью аналитической гель-фильтрации на колонке Superdex 200 Increase 5/150 (GE Healthcare) при скорости потока 0.45 мл/мин на хроматографической системе Prostar 335 (Varian, Австралия), регистрируя профили элюции по поглощению при 280 нм.

Получение дегликозилазы PNGase F в бактериальной системе экспрессии. Кодированная ДНК дегликозилазы Peptide-N(4)-(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl)asparagine amidase F (PNGase F) из *Flavobacterium meningosepticum* была синтезирована в Клонинг Фасилити (Россия, <https://cloning.tech>) и клонирована в вектор pEXPR_001 (устойчивость к ампициллину, T7-промотор) таким образом, что на N-конце конструкции располагался сигнальный пептид OmpA3 для направления в периплазму (MKKTAIAIAVALAGFATVAQA—), а на С-конце — гексагистидиновый таг, отщепляемый TEV-протеазой (последовательность —ENLYFQ/GSDP-His6). Корректность последовательности была подтверждена ДНК-секвенированием по Сэнгеру. Плазмида была использована для трансформации химически компетентных клеток *E. coli* штамма BL21(DE3). Оптимизированные условия экспрессии белка включали в себя индукцию добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом до конечной концентрации 0.3 мМ и культивирование в течение ночи при 19°C. Экстракцию белка проводили с помощью ультразвука в лизис-буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазола. Очистка фермента включала в себя две стадии металлохелатной хроматографии на Ni-NTA-сефарозе, между которыми гис-таг был отщеплен при диализе под действием TEV-протеазы. Полученный электрофоретически гомогенный препарат PNGase F (0.5 мг/мл) с кажущейся молекулярной массой 36 кДа был переведен в буфер хранения, содержащий 10 мМ Трис-HCl, pH 7.6, 75 мМ NaCl, 1.5 мМ меркаптоэтанол, 0.5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты. Для измерения концентрации PNGase F спектрофотометрическим методом брали массовый коэффициент экстинкции, равный $1.91 \text{ (мг/мл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (фермент с тагом) или $1.97 \text{ (мг/мл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (фермент без тага).

Реакция дегликозилирования проходила в гель-фильтрационном буфере (20 мМ Трис-HCl, pH 7.6, 150 мМ NaCl, 3 мМ азида натрия) при 37°C.

Кристаллизация комплекса RBD–антитела P2C5. Скрининг условий кристаллизации комплекса вируснейтрализующего антитела P2C5 и гликозилированной и дегликозилированной форм рецепторсвязывающего домена S-белка SARS-CoV-2 проводили с использованием роботизированной системы Огук 4 (Douglas Instruments, UK) и кристаллизационных китов Hampton Research (USA). Стержнеобразные кристаллы с длиной наибольшей грани ~100 мкм достигали максимального размера за 7 дней и росли в ряде условий кита PEG/Ion HT (Hampton Research, USA). Наилучшей дифракцией обладали кристаллы, выросшие в следующих условиях: 8% v/v Tacsimate, pH 6.0, 20% w/v PEG3350. Во избежание разрушения кристаллов непосредственно перед рентгеноструктурным экспериментом их на несколько секунд обмакивали в криораствор, содержащий помимо противораствора 10% этиленгликоля, после чего замораживали в парах жидкого азота.

Рентгеноструктурный анализ. Тестирование выросших кристаллов и сбор дифракционных данных проводили при температуре 100 К на рентгеновском дифрактометре Rigaku XtaLAB Synergy-S (Rigaku, США), а также на станции XRD2 синхротронного источника Elettra (Италия). В первом случае дифракционная картина фиксировалась детектором HyPix-3000. Обработку данных проводили при помощи программы CrysAlisPro (CrysAlisPRO, Oxford Diffraction/Agilent Technologies UK Ltd, Yarnton, England), а шкалирование – в Aimless [10] (табл. 1). В случае данных, собранных на синхротронном источнике, дифракционная картина фиксировалась детектором Dectris Pilatus 6М, а обработку и шкалирование проводили с помощью программ Dials [11] и Aimless соответственно (табл. 1). Оценку содержания белка в независимой части элементарной ячейки проводили в программном пакете CCP4 [12].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Получение комплекса наноантитела P2C5 с гликозилированной формой RBD. Выбранные методики позволили получить гидродинамически гомогенные препараты наноантитела P2C5 и RBD, которые элюировались при аналитической гелефильтрации в виде одиночных симметричных пиков и не содержали фракции агрегатов (рис. 1). Положение пиков на профиле элюции совпадало с ожидаемым для более крупных частиц RBD (масса, рассчитанная по последовательности, равна 27 кДа) по сравнению с P2C5 (16 кДа), поэтому для получения комплекса этих белков фиксированную концентрацию RBD титровали увеличивающимися количествами P2C5 так, чтобы избыток антитела элюировался в виде пика с наи-

Таблица 1. Условия кристаллизации комплекса вируснейтрализующего антитела P2C5 и дегликозилированной формы рецепторсвязывающего домена SARS-CoV-2

Условие	Состав противораствора
1	8% v/v Tacsimate, pH 6.0, 20% PEG 3350
2	0.1 М ацетат натрия, pH 4.6, 2.0 М формиат натрия
3	0.1 М HEPES, pH 7.5, 0.8 М калия-натрия тетрагидрат тартрата
4	10% PEG 1000, 10% PEG 8000
5	0.1 М MES моногидрат, pH 6.5, 1.6 М гептагидрат сульфата магния
6	0.1 М MES моногидрат, pH 6.5, 12% PEG 20000
7	0.1 М HEPES, pH 7.5, 10% PEG 8000, 8% этиленгликоль
8	0.1 М БИЦИН, pH 9.0, 2% 1,4-диоксан, 10% PEG 20000
9	0.1 М HEPES, pH 7.5. 10% v/v 2-пропанол, 20% PEG 4000

Примечание. Нумерация условий соответствует нумерации на рис. 5а Условие, в котором росли дифрагирующие кристаллы, отмечено на рис. 5а белым контуром.

меньшим перекрыванием с пиком комплекса (рис. 1). Так было подобрано соотношение антитела и RBD, приводящее к образованию насыщенного, стехиометрического гетеродимерного комплекса, который далее очищали при помощи препаративной геле-фильтрации и подвергали кристаллизационному скринингу. Полученный комплекс хорошо концентрировался и давал кристаллы в большом числе различных условий (данные не приведены). Кристаллы, полученные на этом этапе, были протестированы на лабораторном источнике с различным сочетанием криопротекторов (глицерин, этиленгликоль, PEG400 и паратовое масло) и показали полное отсутствие дифракции, что можно было объяснить наличием в кристаллах неупорядоченных контактов, формируемых остатками сахаров.

Получение PNGase F и ее применение для дегликозилирования RBD. Поскольку получаемый из эукариотических клеток RBD является гликопротеином, предположили, что гликозилирование мешает образованию упорядоченной кристаллической решетки, как это показано для некоторых других белков [13]. Для дегликозилирования получаемого RBD была клонирована и получена в бактериальной системе экспрессии дегликозилаза PNGase F, несущая на C-конце отщепляемый гис-таг. Электрофоретически гомогенный фермент был получен при проведении двух повторов экстракции и вычитающей металлохелатной хроматографии (рис. 2). От-

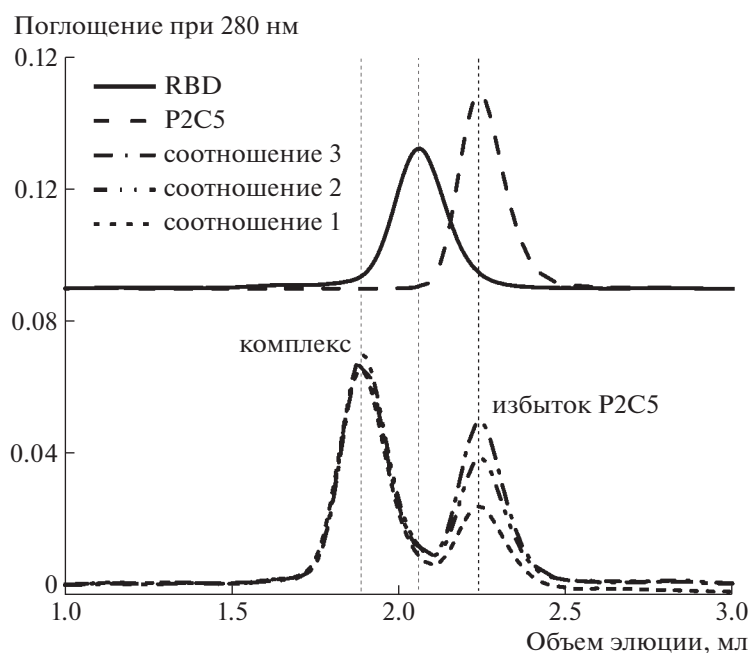


Рис. 1. Наноантитело P2C5 формирует с RBD спайк-белка SARS-CoV-2 прочный стехиометрический комплекс. Приведены профили элюции, полученные на колонке Superdex 200 Increase 5/150 (GE Healthcare) при нанесении свободного P2C5, свободного RBD или его смесей с избытком P2C5 в трех разных соотношениях. Скорость потока — 0.45 мл/мин. Пунктирными линиями показаны положения на профиле элюции для свободного антитела, RBD, а также их комплекса.

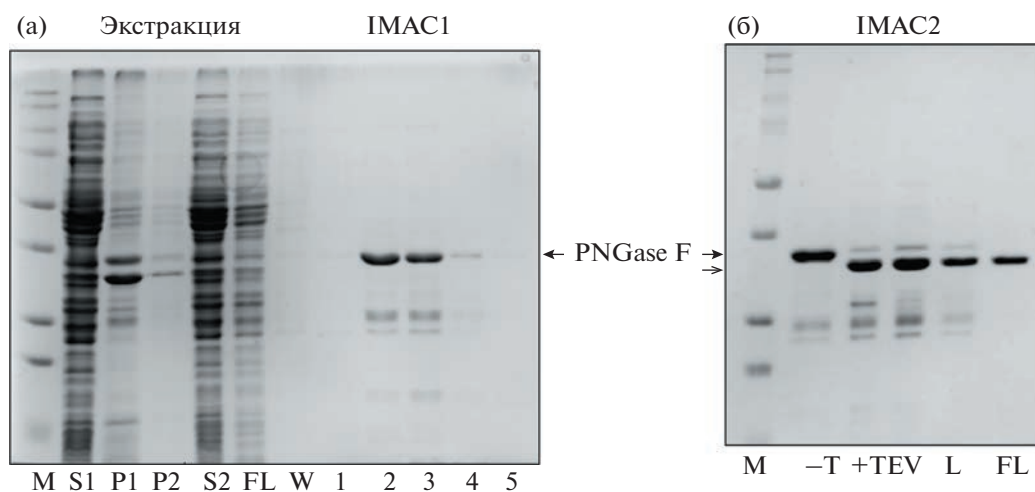


Рис. 2. Получение PNGase F в бактериях: а — экстракция (S1 и P1 — супернатант и осадок после первой ультразвуковой обработки и центрифугирования, S2 и P2 — супернатант и осадок после второй ультразвуковой обработки и центрифугирования) и первая металлохелатная хроматография (IMAC1: S2 — нанесение, FL — проскок, W — промывка, 1–5 — фракции элюции имидазолом); б — вторая металлохелатная хроматография (IMAC2) после отщепления гис-тага TEV-протеазой. –T — до добавления TEV, +TEV — после добавления, L — нанесение, FL — фракция целевого белка, не связавшегося с Ni-NTA-сефарозой. М — маркеры молекулярных масс 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 кДа (нижние маркеры вышли из геля). Закрытая стрелка показывает подвижность PNGase F с тагом, открытая — без тага.

щепление гис-тага под действием высокоспецифичной TEV-протеазы привело к заметному сдвигу электрофоретической подвижности и существенно увеличило чистоту препарата на стадии второй

металлоаффинной хроматографии (рис. 2б). После смены буфера был проведен анализ активности PNGase F по дегликозилированию RBD (рис. 3). Удалось подобрать соотношение субстрат–фер-

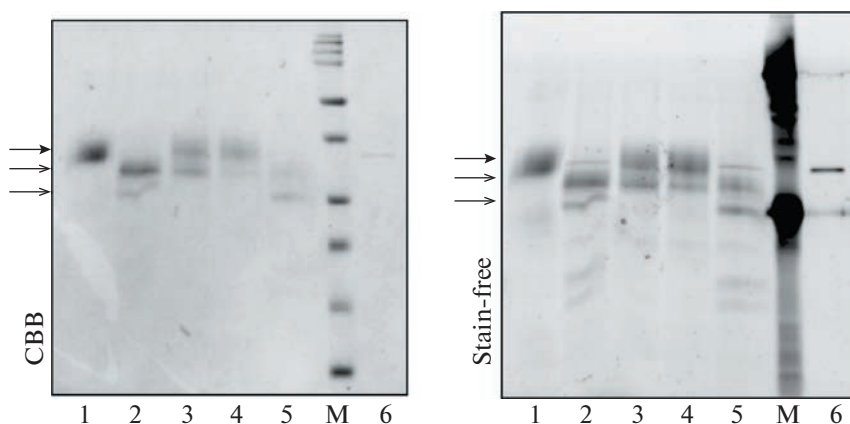


Рис. 3. Дегликозилирование RBD под действием PNGase F. Результаты дегликозилирования RBD *in vitro* анализировали с помощью гель-электрофореза по Лэммли с визуализацией с помощью окрашивания Кумасси G250 (CBB, слева) или по технологии Stain-free® (Bio-Rad) (справа). Схема нанесения: исходный нативный RBD (1) или нативный RBD, проинкубированный с PNGase F в соотношении 100 : 1 (2), 500 : 1 (3), 1000:1 (4). В контроле дегликозилировали RBD, предварительно прогретый при 95°C, в соотношении с PNGase F 100:1 (5). М — маркеры молекулярных масс 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 кДа. На дорожке 6 нанесена PNGase F в качестве дополнительного контроля. Закрытой стрелкой показано положение исходного RBD, а открытыми стрелками показано положение его дегликозилированных форм.

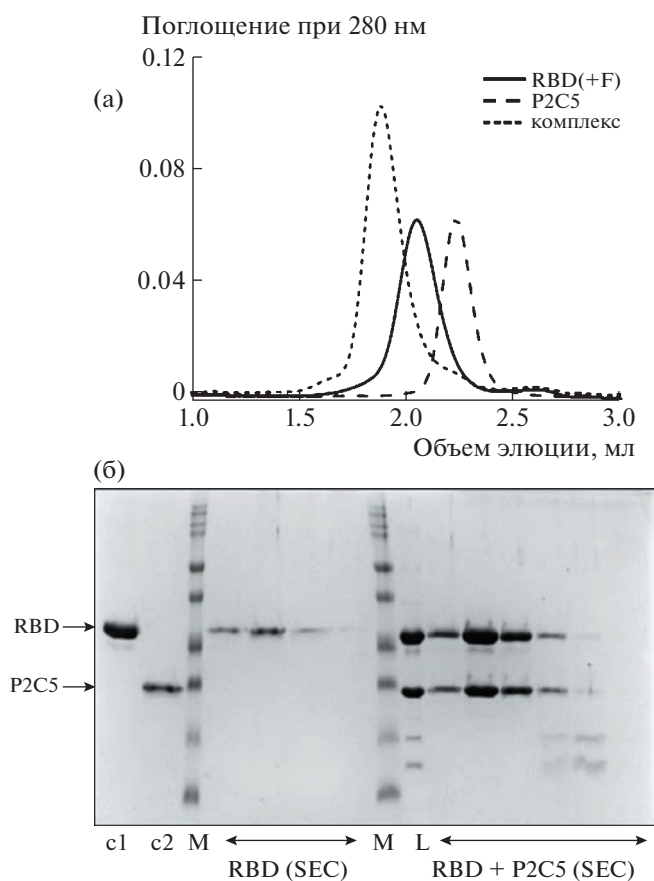


Рис. 4. Получение гетеродимерного комплекса нанокантата P2C5 с дегликозилированной формой RBD: а — профили аналитической гель-фильтрации на колонке Superdex 200 Increase 5/150 (GE Healthcare), показывающие образование прочного комплекса (короткая штриховая линия) между антителом (длинная штриховая линия) и RBD (сплошная линия). Скорость потока — 0.45 мл/мин; б — электрофоретический анализ фракций, полученных при полупрепаративной гель-фильтрации свободного RBD или его комплекса с P2C5 на колонке Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare) при скорости потока 1 мл/мин (объем фракций — по 1 мл). На контрольные дорожки c1 и c2 нанесены свободные RBD и P2C5 соответственно. Подвижность RBD и P2C5 в геле показана стрелками.

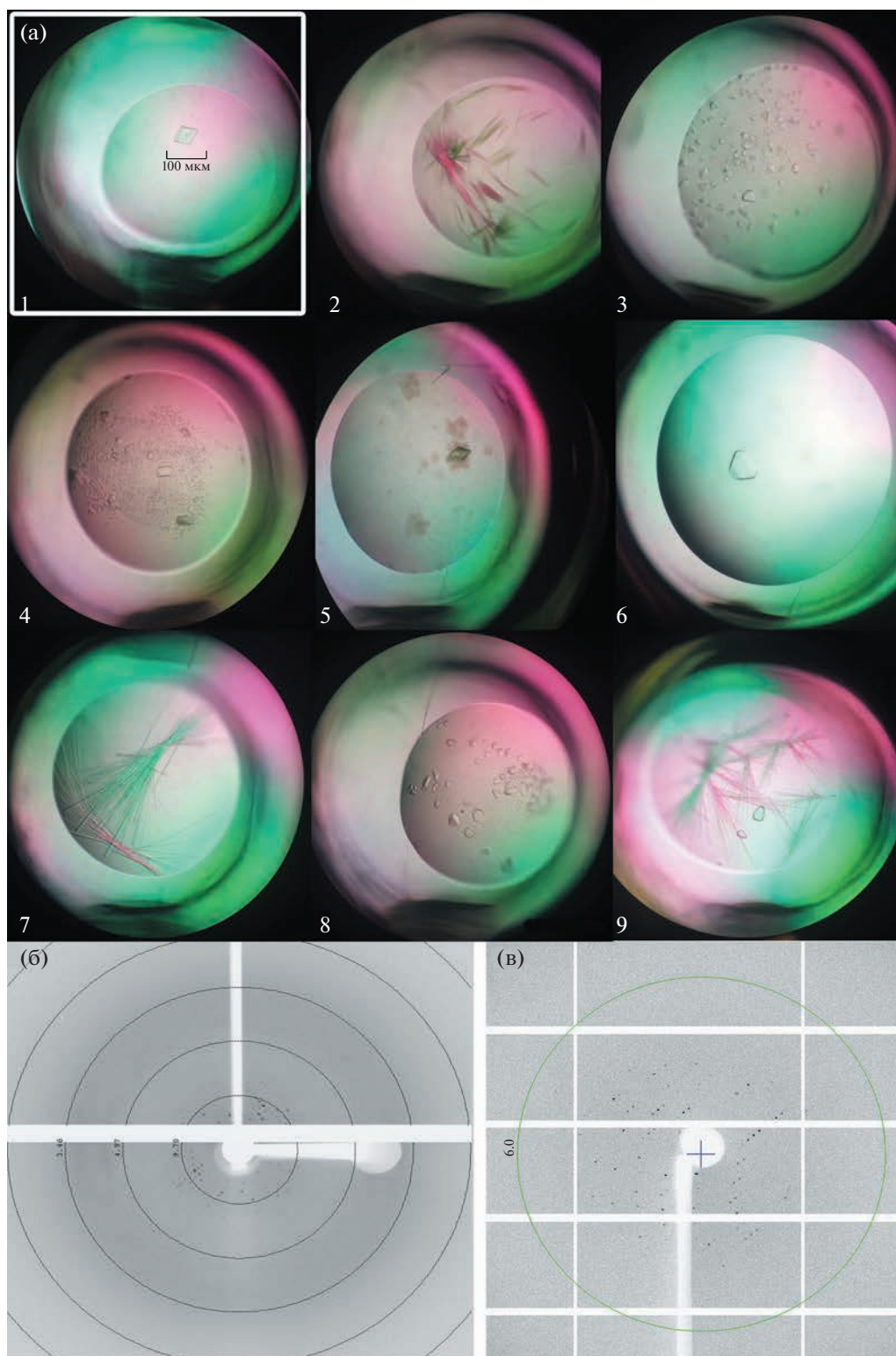


Рис. 5. Кристаллы (а) и дифракционные картины для кристаллов комплекса вируснейтрализующего антитела P2C5 и дегликозилированного рецепторсвязывающего домена S-белка SARS-CoV-2, полученные на лабораторном (б) и синхротронном источнике (в). Цифрами отмечены кристаллизационные условия из табл. 1. Белым контуром отмечено условие, в котором росли дифрагирующие кристаллы, использованные для сбора данных. На панелях (б) и (в) окружностями ограничены пределы разрешения.

Таблица 2. Кристаллографические данные и параметры съемки кристаллов комплекса вируснейтрализующего антитела P2C5 и дегликозилированной формы рецепторсвязывающего домена SARS-CoV-2

	Лабораторный источник	Станция XRD2 Elettra
Пр. гр.	$I222/I2_12_1$	$I222/I2_12_1$
$a, b, c, \text{\AA}$	119.78, 175.56, 279.27	122.73, 171.38, 280.78
$\alpha = \beta = \gamma, \text{град}$	90.00	90.00
$T, \text{К}$	100	100
$\lambda, \text{\AA}$	1.54	1.0
Разрешение, $\text{\AA}$	23.29–3.70 (3.90–3.70)*	146.29–4.10 (4.43–4.10)
Число независимых рефлексов	31 653 (4623)	23 640 (4771)
Полнота набора, %	99.5 (100)	100 (100)
$I/\sigma(I)$	4.1 (1.0)	8.5 (1.0)
$R_{\text{rim}}, \%$	31.1 (95.1)	6.9 (98.3)
$CC_{1/2}, \%$	89.8 (49.1)	99.5 (64.4)

* В скобках приведены значения для последнего слоя.

мент, при котором за счет сдвига электрофоретической подвижности происходило полное исчезновение исходной гликозилированной формы RBD, что указывало на значительное дегликозилирование белка. Наличие нескольких полос продуктов реакции дегликозилирования указывало на гетерогенный паттерн гликозилирования исходного препарата RBD. При выбранном соотношении было проведено препаративное дегликозилирование RBD, а затем — его дополнительная очистка гель-фильтрацией. При концентрировании фракций после гель-фильтрации дегликозилированного RBD обнаружили его меньшую растворимость, поскольку при концентрациях больше 3 мг/мл наблюдалось образование хлопьев белка. С учетом этого обстоятельства было решено формировать комплекс с антителом при относительно низких концентрациях белка (ниже 3 мг/мл) с последующей гель-фильтрацией и концентрированием фракций комплекса.

Получение комплекса наноантитела P2C5 с дегликозилированной формой RBD. Далее проверили способность P2C5 узнавать дегликозилированную форму RBD. При проведении гель-фильтрации наблюдали картину, принципиально сходную с таковой для исходного гликозилированного RBD — смесь белков давала единственный пик на профиле элюции, сильно смещенный в сторону меньших объемов элюции относительно пиков свободного дегликозилированного RBD и антитела (рис. 4а). При эквимоллярных концентрациях P2C5 и RBD практически не наблюдали пика свободных компонентов, что подтверждало образование стехиометрического гетеродимерного комплекса между белками. Кроме того, фракции комплекса, проанализированные с помощью электрофореза по Лэммли и денситометрии, содержали практически одинаковое соотношение

интенсивности полос P2C5 и RBD (рис. 4б), что однозначно подтверждало вывод о том, что их стехиометрический комплекс представляет собой гетеродимер.

Анализ кристаллов комплекса P2C5 с дегликозилированным RBD. Отметим, что дегликозилирование RBD под действием PNGase F привело к существенному уменьшению количества условий, в которых росли кристаллы. При этом появились новые условия, которые отсутствовали для комплекса с гликозилированным вариантом RBD (табл. 1). Кристаллы из этих условий протестировали на лабораторном источнике и обнаружили, что кристаллы из условий, содержащих 8% v/v Tacsimate pH 6.0, 20% w/v PEG 3350 (рис. 5а), визуально дифрагировали примерно до 6 $\text{\AA}$ (рис. 5б).

На лабораторном источнике (разд. Методы) был собран дифракционный набор до разрешения 3.7 $\text{\AA}$ (после обработки). Кристаллы относились к пр. гр. $I222$ (табл. 2), так как на основании полученных дифракционных данных сделать однозначный вывод о наличии винтовых осей не представлялось возможным. С учетом установленной стехиометрии комплекса (RBD : антитело — 1 : 1) оценка коэффициента Мэтьюса позволила предположить в независимой части элементарной ячейки наличие пяти белковых гетеродимеров. Попытки решения структуры методом молекулярного замещения в пр. гр. $I222$ и $I2_12_1$ с использованием в качестве моделей установленных структур RBD, а также модели антитела, рассчитанной программой AlphaFOLD [14], не привели к успеху. Это можно объяснить одновременным влиянием нескольких факторов: относительно низким разрешением полученных данных, большим количеством белковых молекул в независимой части, а также некоторым сходством (по размеру и наличию β -слоев) структур RBD и антите-

ла, которые к тому же должны быть расположены близко друг к другу, обеспечивая высокую аффинность (по данным плазмонного резонанса константа диссоциации комплекса составляет 3.97 нМ [7]).

Для проверки гипотезы о том, что мощности лабораторного источника недостаточно для сбора с полученных кристаллов дифракционных данных более высокого разрешения, был проведен дифракционный эксперимент на синхротронном источнике Elettra (Триест, Италия), для которого использовались кристаллы, полученные по ранее определенным условиям (рис. 5а, табл. 1). Дифракционный набор был собран до разрешения 4.1 Å (табл. 2), что с учетом большей яркости синхротронного источника демонстрирует предел разрешения кристаллов, ограниченный их внутренней структурой. Последующая обработка полученного набора данных в пр. гр. $I222$ и $I2_12_1$ также не позволила провести фазирование структуры методом молекулярного замещения. Тем не менее полученные результаты предоставляют дополнительную информацию для дальнейшей оптимизации генетической конструкции RBD и условий кристаллизации комплекса с целью получения кристаллов, пригодных для расшифровки структуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-30004).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meo S.A., Bukhari I.A., Akram J. et al. // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2021. V. 25 (3). P. 1663. https://doi.org/10.26355/eurrev_202102_24877
2. Kevinkumar K., Parmar D., Mendiratta S.K. et al. // Clin Infect Dis. 2021. V. 73 (9). P. e2722. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa779>
3. Hammit L.L., Dagan R., Yuan Y. et al. // N. Engl. J. Med. 2022. V. 386 (9). P. 837. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2110275>
4. Mulangu S., Dodd L.E., Davey R.T.Jr. et al. // N. Engl. J. Med. 2019. V. 381 (24). P. 2293. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910993>
5. Komori M., Nogimori T., Morey A.L. et al. // Nat. Commun. 2023. V. 14 (1). P. 2810. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38457-x>
6. Piccoli L., Park Y.-J., Tortorici M.A. et al. // Cell. 2020. V. 183 (4). P. 1024. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.037>
7. Favorskaya I.A., Shcheblyakov D.V., Esmagambetov I.B. et al. // Front. Immunol. 2022. V. 13. P. 822159. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.822159>
8. Esmagambetov I.B., Ryabova E.I., Derkaev A.A. et al. // Front. Immunol. 2023. V. 14. P. 1129245. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1129245>
9. Деркаев А.А., Рябова Е.И., Прокофьев В.В. и др. // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2023. Т. 23 (1). С. 76. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-450>
10. Evans P.R., Murshudov G.N. // Acta Cryst. D. 2013. V. 69 (Pt 7). P. 1204. <https://doi.org/10.1107/S0907444913000061>
11. Winter G., Waterman D.G., Parkhurst J.M. et al. // Acta Cryst. D. 2018. V. 74 (Pt 2). P. 85. <https://doi.org/10.1107/S2059798317017235>
12. Winn M.D., Ballard C.C., Cowtan K.D. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 235. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>
13. Mesters J.R., Hilgenfeld R. // Cryst. Growth Des. 2007. V. 7 (11). P. 2251. <https://doi.org/10.1021/cg7006843>
14. Jumper J., Evans R., Pritzel A. et al. // Nature. 2021. V. 596 (7873). P. 583. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 577.32

ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ПРИОНА SUP35 ИЗ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae* МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2023 г. А. Д. Бурцева¹, А. В. Моисеенко², Т. Н. Баймухаметов³, А. А. Дергалев¹,
К. М. Бойко^{1,*}, В. В. Кушников¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: boiko_konstantin@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 06.06.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 06.06.2023 г.

Прионы являются инфекционным вариантом амилоидов, участвующих в патогенезе ряда нейродегенеративных заболеваний человека, в том числе болезней Альцгеймера и Паркинсона. Прионы дрожжей, в частности белок Sup35, представляют собой эффективную модель для изучения базовых свойств амилоидов. Штаммовые варианты прионной формы Sup35 лежат в основе конформационного разнообразия образованных им амилоидных структур, обладающих различающимися биологическими свойствами. Пространственная организация приона Sup35 до сих пор не установлена. Методом просвечивающей электронной микроскопии проведено исследование структуры штаммового варианта W прионного белка Sup35, выделенного *ex vivo* из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Проведены оценка параметров фибриллы и реконструкция ее структуры с низким разрешением.

DOI: 10.31857/S0023476123600817, EDN: HAMYDW

ВВЕДЕНИЕ

Прионы способны катализировать конформационное превращение нормального клеточного белка в амилоидные структуры и являются инфекционным подклассом амилоидов, представляющих собой фибриллярные агрегаты некоторых растворимых в норме белков, центральная часть которых — амилоидный “кор” — обладает регулярной кросс-β-структурой [1]. Образование амилоидов наблюдается при ряде нейродегенеративных заболеваний человека и животных, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, диабет II типа и др. [2], широко распространенных у людей старшего возраста и на данный момент являющихся неизлечимыми.

Все известные прионные заболевания млекопитающих вызываются эндогенным белком PrP [3], имеющим сходие с прионными белками дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* механизмы существования наследуемых вариантов с различными биологическими свойствами, агрегации в амилоидные структуры и устойчивости к протеазам [4]. Таким образом, прионы дрожжей, в частности наиболее изученный дрожжевой белок Sup35, являются удобными моделями для изучения общих

структурно-функциональных свойств прионов и амилоидов благодаря относительной простоте культивирования дрожжей и получения белка, а также разработанным системам детекции прионных фенотипов, позволяющих отслеживать биологические эффекты от присутствия в клетках тех или иных прионных конформаций.

Фундаментальным свойством амилоидов, включая Sup35, является существование “штаммовых” вариантов, существенно различающихся биологическими свойствами. По эффективности связывания мономерного белка в амилоидную фибриллу штаммовые варианты приона Sup35 разделяются на две категории: сильные (S) и слабые (W) [5]. Сильные варианты полимеризуют Sup35 более эффективно, эффективнее фрагментируются клеточными шаперонами и имеют меньший размер амилоидных полимеров в клетках дрожжей [6]. Из имеющихся косвенных данных о пространственной организации “сильных” и “слабых” вариантов приона Sup35 следует, что в основе различий в фенотипических проявлениях этих вариантов лежат разные пространственные укладки белка Sup35 в составе соответствующих амилоидных фибрилл.

На данный момент полноатомная структура ни одного штаммового варианта Sup35 не установлена, а имеющиеся косвенные данные о пространственной организации амилоидных фибрилл белка Sup35 “сильного” и “слабого” типа противоречивы [7–10]. Также было показано, что данные, полученные на моделях *in vitro* (т.е. амилоидные фибриллы Sup35, возникшие *de novo* в препарате выделенного рекомбинантного белка) и *ex vivo* (амилоиды, выделенные из клеток дрожжей с прионом), значительно различаются [10, 11]. Это может быть объяснено тем, что, хотя *in vitro* Sup35 самодостаточен для амилоидного превращения, в клетках дрожжей поддержание и наследование приона происходит в тесном взаимодействии с многочисленными клеточными факторами — прежде всего шаперонами, такими как Hsp104, Ssa1 и Sis1, которые участвуют в его фрагментации [12]. Такое взаимодействие приводит к селекции из всех амилоидных укладок, которые могут возникать в бесклеточной среде, только тех, которые могут стабильно поддерживаться в клетках аналогично тому, как это было описано для прионных и прионоподобных амилоидов млекопитающих [13].

В настоящей работе описаны структурные исследования методом электронной микроскопии (ЭМ) пространственной организации амилоидных фибрилл “слабого” (W) штаммового варианта прионного белка Sup35, выделенного *ex vivo* из дрожжей *S. cerevisiae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение амилоидных фибрилл прионного белка Sup35 из клеток дрожжей. Клетки данного штамма были трансформированы плазмидой pYES2-Sup35NM-eGFP, кодирующей белковую конструкцию, в которой нативно-неупорядоченный регион белка Sup35 (Sup35NM, аминокислотные остатки (а.о.) 1–239 белка Sup35) слит с зеленым флуоресцентным белком, необходимым для упрощения процедуры выделения целевого белка, и помещен под контроль сильного индуцибельного промотора GAL1. Кроме того, эта плазмида содержала ген функционального С-домена белка Sup35 (а.о. 254–685) под контролем промотора гена SUP35 для уменьшения токсического эффекта, который обычно наблюдается при сверхпродукции белка Sup35NM-eGFP в дрожжах с прионом. Трансформанты выращены в 400 мл синтетической среды с 2% глюкозы до состояния стационарной культуры (OD₆₀₀ > 10), после этого к ним было добавлено 600 мл синтетической среды с 2.4% галактозы (которая индуцирует продукцию белка Sup35NM-eGFP под контролем промотора GAL1). Спустя 18 ч клетки осаждали 30 мин при 2200 g, клеточные осадки собрали, за-

морозили в жидком азоте и хранили при температуре –70°C.

Выделение и очистку амилоидных фибрилл провели по ранее отработанному протоколу [10] с некоторыми модификациями. Так, в новом протоколе отказались от соницирования амилоидных макроагрегатов Sup35NM-eGFP (цитоплазматические образования, состоящие из множества скрепленных друг с другом фибрилл этого белка), выделенных из клеточного лизата путем низкоскоростного центрифугирования, так как эта процедура приводила к измельчению амилоидных фибрилл до фрагментов, размер которых был несовместим с их дальнейшим изучением методом ЭМ. В качестве альтернативы для солиubilизации амилоидных макроагрегатов и их разделения на отдельные амилоидные фибриллы обрабатывали фракцию макроагрегатов 4%-ным раствором додецилсульфат натрия (SDS) в течение 30 мин при температуре ~10°C. После этого амилоидные фибриллы отделяли ультрацентрифугированием (268 000 g, 4 ч) в градиенте сахарозы (20–65%), приготовленном на основе трис-солевого буфера (TBS) с 0.1%-ным лаурилсаркозинатом натрия. Фракцию, содержащую наибольшую концентрацию амилоидных фибрилл (~400 мкл), отбирали как фракцию с наиболее интенсивным флуоресцентным сигналом зеленого флуоресцентного белка (GFP). На заключительной стадии очистки полученный препарат фибрилл очищали от сахарозы и избытка детергента путем диализа против 1 л буфера TBS при температуре 4°C в течение ~16 ч (диализный мешок Spectra/Por (Spectrum Medical Industries, США) с пределом отсечения молекулярной массы = 12000 Да). Препарат очищенных фибрилл разделили на аликвоты по 50 мкл, заморозили в жидком азоте и хранили при температуре –70°C.

Негативное окрашивание. Для негативного окрашивания образца использовали сетки для электронной микроскопии Lacey C only 300 mesh (Ted Pella, США), которые были гидрофилизированы с помощью системы очистки тлеющим разрядом PELCO easiGlow (Ted Pella, США) в течение 30 с при 25 мА. 3 мкл суспензии белка наносили на углеродную подложку сетки и адсорбировали в течение 60 с. Далее сетку поочередно промакивали в двух каплях 1%-ного уранилацетата в течение 10 с. Излишки жидкости убирали фильтровальной бумагой.

Для сбора изображений использовали просвечивающий электронный микроскоп (ПЭМ) Jeol JEM-2100 (Центр коллективного пользования Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия) с ускоряющим напряжением 200 кВ (JEOL Ltd., Япония), оснащенный камерой Direct Electron DE-20. Получены 354 снимка

образца при номинальном увеличении в 62000 раз с результирующим размером пикселя 2.5 Å. Доза облучения составила 80 э/Å², сферическая абберация — 1.4 мм. Сбор изображений проводили с помощью программы SerialEM [14]. Основные параметры ЭМ-съемки приведены в табл. 1.

Обработка данных негативного окрашивания. Обработку изображений, полученных после негативного окрашивания, проводили с помощью программного пакета CryoSPARC v3.2 [15]. Была сделана коррекция функции передачи контраста (CTF) 354 изображений со стандартными параметрами. Поиск филаментов без заданного шаблона проведен с помощью Filament tracer в режиме Template-free tracing со следующими параметрами: минимальный диаметр филаментов — 80 Å, максимальный диаметр филаментов — 120 Å, расстояние между сегментами — 0.2 диаметра, минимальная длина филаментов — 3 диаметра. Визуальная оценка 286 000 выбранных частиц была осуществлена с помощью Inspect particle picks. Отбор частиц провели согласно гистограмме NCC Score/Power Score с учетом следующих параметров отсечки: NCC Score > 0.300, 22358 < Local Power < 35065, Curvature < 0.0011 1/Å, Sinuosity < 1.06. 19000 отобранных таким образом проекций частиц, экстрагированных в боксе размером 300 × 300 Å, классифицировали в режиме выравнивания двумерных классов по вертикали со стандартными параметрами. Из 20 полученных двумерных классов выбрали четыре класса с характерными очертаниями фибриллярных структур, содержащих 9000 проекций частиц, на основе которых сделана трехмерная спиральная реконструкция структуры с помощью Helical Refinement с параметрами по умолчанию.

Витрификация. Подготовку образцов для крио-ЭМ-эксперимента провели с помощью оборудования Ресурсного центра зондовой и электронной микроскопии “Нанозонд” (НИЦ “Курчатовский институт”, Россия). Сетки Quantifoil R 2/2300 mesh гидрофилизировали с помощью системы очистки тлеющим разрядом PELCO easiGlow (TedPella, США) в течение 20 с при 15 мА. 3 мкл препарата варианта W белка Sup35 были нанесены на сетки при температуре 4°C и 100%-ной влажности. Сетки промакивали в течение 3 с, а затем быстро погружали в жидкий этан с помощью автоматизированной установки для витрификации Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США). Экспериментальные данные получены на просвечивающем криоэлектронном микроскопе Titan Krios 60–300 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенном детектором прямого детектирования электронов Falcon 2. Основные параметры крио-ЭМ-эксперимента приведены в табл. 2.

Таблица 1. Основные параметры ЭМ-эксперимента штаммового варианта W2 белка Sup35NM-eGFP, выделенного *ex vivo* из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Ускоряющее напряжение, кВ	200
Номинальное увеличение	×62000
Пиксель, Å	2.5
Доза облучения, э ⁻ /Å ²	80
Сферическая абберация, мм	1.4
Количество изображений	354

Таблица 2. Основные параметры крио-ЭМ-эксперимента штаммового варианта W2 белка Sup35NM-eGFP, выделенного *ex vivo* из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Ускоряющее напряжение, кВ	300
Номинальное увеличение	×59 000
Пиксель, Å	1.15
Суммарная доза облучения на стек, э ⁻ /Å ²	77
Изображений в стек	30
Доза облучения на стек, э ⁻ /Å ²	2.57
Время экспозиции, с	3
Диапазон дефокусировки, мкм	[−2.2, −1.0]
Шаг дефокусировки, мкм	0.1
Сферическая абберация, мм	0.01
Суммарно стеков изображений	1400

Обработка данных криоэлектронной микроскопии. Обработку полученных изображений проводили с помощью программного обеспечения CryoSPARC (v3.3.2) [15]. Для 1400 стеков изображений были проведены коррекция дрейфа и CTF со стандартными параметрами. Далее провели поиск филаментов при помощи Filament tracer в режиме Template-free tracing со следующими параметрами: минимальный диаметр филаментов — 80 Å, максимальный диаметр филаментов — 150 Å, расстояние между сегментами — 0.2 диаметра, минимальная длина филаментов — 2 диаметра, фильтр нижних частот — 10 Å. Визуальная оценка 1 318 000 выбранных частиц осуществлена с помощью работы Inspect particle picks. Отбор частиц провели согласно гистограмме NCC Score/Power Score с учетом следующих параметров отсечки: оценка NCC > 0.151649 < локальная мощность < 295541, кривизна < 0.0078 1/Å, синусоидальность < 1.264057. 1027 000 отобранных таким образом проекций частиц, экстрагированных в боксе размером 294.4 × 294.4 Å, классифицировали в режиме выравнивания двумерных классов по вертикали со стандартными параметрами. Из 20 полученных двумерных классов выбраны два класса, содержащие 71 000 проекций частиц и имеющие характерные очертания фибриллярных структур.

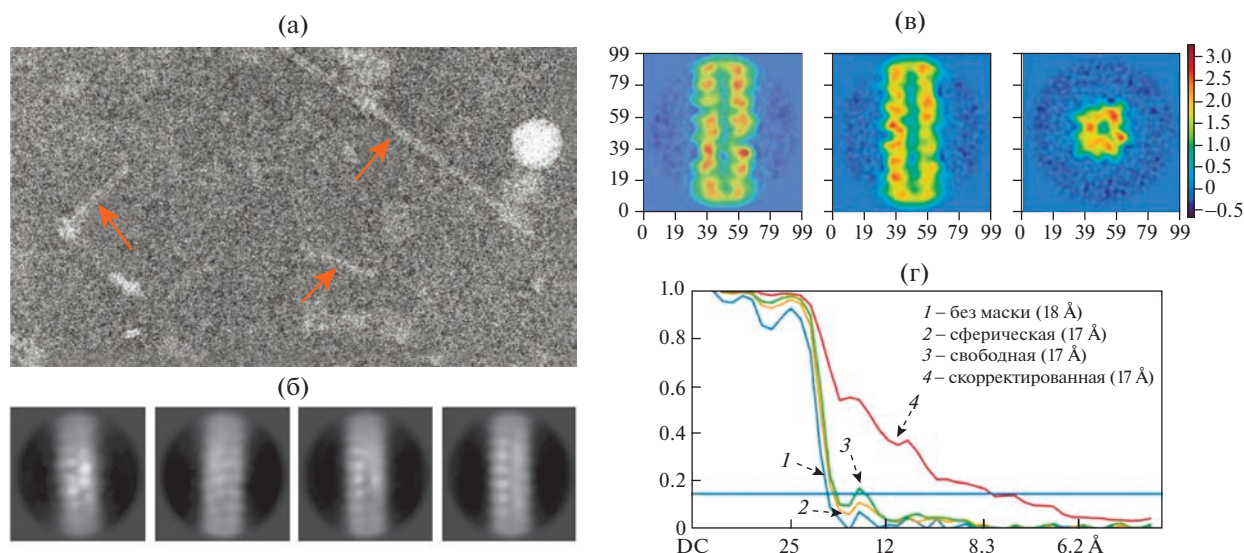


Рис. 1. Данные негативного окрашивания варианта W2 белка Sup35NM-eGFP, выделенного *ex vivo* из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: а – ЭМ-изображение амилоидных фибрилл Sup35NM-eGFP; б – двумерные классы сегментов амилоидных фибрилл Sup35NM-eGFP в квадратном боксе размером 300 Å, выбранные для реконструкции; в – проекции крио-ЭМ-карты структуры после спиральной реконструкции в различных плоскостях; г – оценка разрешения по графику GSFSC.

Далее выбранные частицы подвергли повторной двумерной классификации. Из десяти полученных двумерных классов выбрали пять классов с 70000 частиц, на основе которых была сделана трехмерная спиральная реконструкция с помощью Helical Refinement со стандартными параметрами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для структурных исследований выбран прионный вариант W2 белка Sup35 – один из типичных представителей “слабого” класса вариантов приона, охарактеризованный ранее методом протеазного картирования амилоидного “кора” [10]. Проведено негативное окрашивание варианта W2 белка Sup35NM-eGFP, выделенного *ex vivo* из дрожжей *S. cerevisiae*, с целью оценки пригодности образца для крио-ЭМ-экспериментов и получения трехмерной модели структуры с низким разрешением. Получили 354 изображения амилоидных фибрилл Sup35NM-eGFP, на которых присутствуют как длинные, так и короткие фибриллы, преимущественно прямые и имеющие одинаковый диаметр ~100 Å (рис. 1а, табл. 1). Оценка диаметра совпала с данными, полученными ранее и независимо в экспериментах по атомно-силовой микроскопии (данные не приведены), а также с результатами предыдущих исследований амилоидов Sup35 [16]. Полученные изображения свидетельствовали о том, что препарат белка гомогенен, частицы распределены достаточно равномерно, поверхностная концентра-

ция и размер частиц удовлетворяют требованиям для проведения крио-ЭМ-эксперимента.

Для спиральной реконструкции фибрилл провели обработку исходных данных негативного окрашивания, основные этапы которой представлены на рис. 2. После коррекции дрейфа и СТФ для полученных изображений был выполнен поиск филаментов с диаметром в диапазоне от 80 до 120 Å. Обнаружено 286000 частиц, из которых по данным визуального анализа отобрали 19000, лежащих в допустимых областях значений параметров NCC Score и Power Score. На основе выбранных проекций частиц провели 2D-классификацию в режиме выравнивания для спиральной структуры, при котором выравнивание всех средних значений класса происходило по вертикали, что позволяет оценить вращение в плоскости. В результате получили 20 двумерных классов проекций фибрилл в боксах размером 300 × 300 Å, из которых выбрали четыре класса с суммарным количеством частиц 9000, обладающих наиболее выраженными очертаниями спиральной структуры (рис. 1б). На основе этих классов была проведена 3D-реконструкция крио-ЭМ-карты со стандартными параметрами. Несмотря на низкое разрешение, полученная трехмерная карта крио-ЭМ демонстрирует характерные признаки спиральной структуры – обладает осевой симметрией и периодичностью (рис. 1в). В соответствии с золотым стандартом FSC = 0.143 [17, 18] реконструкция крио-ЭМ-карты фибриллы без использования маски имеет разрешение ~18 Å (рис. 1г), что



Рис. 2. Основные этапы обработки данных негативного окрашивания варианта W2 белка Sup35NM-eGFP.

соответствует максимальному разрешению для метода негативного контраста.

Известно, что дрожжевой прион Sup35 формирует амилоидные фибриллы с параллельными β -листами в так называемой “in-register”-укладке, в которой каждый остаток в одной молекуле выравнивается с тем же остатком в соседней молекуле, образуя линию идентичных остатков вдоль длинной оси филамента (рис. 3а) [8]. Для крио-ЭМ-реконструкции структур со спиральной симметрией, в частности амилоидных фибрилл, критически важно определить параметры симметрии, которые позволят провести корректное вы-

равнивание частиц. Такими параметрами являются связанные между собой винтовой шаг (pitch, p), винтовой подъем (rise, Δz) и поворот спирали (twist, $\Delta\phi$) (рис. 3б). Поиск параметров симметрии спиральных структур требует задания первого приближения винтового подъема или винтового шага и количества субъединиц на полный оборот спирали. В фибриллах с кросс- β -структурой расстояние между β -листами, называемое винтовым подъемом (Δz), в большинстве случаев соответствует 4.75 Å [19], в то время как остальные параметры, такие как винтовой шаг и поворот спирали, существенно различаются. Использование указанного значения винтового подъема для поиска остальных параметров симметрии фибриллы Sup35 не дало положительных результатов, что, по-видимому, является следствием низкого разрешения ЭМ-данных негативного окрашивания.

Далее провели крио-ЭМ-эксперимент, включавший в себя стадию витрификации и сбора данных на криогенном ПЭМ (табл. 2). Было получено 1400 стеков изображений амилоидных фибрилл с характерным диаметром 100 Å. Анализ полученных изображений (рис. 4а) свидетельствует о наличии вокруг фибрилл плотной “шубы”, образованной молекулами GFP, ковалентно пришитыми к Sup35NM для упрощения выделения белка. Была проведена обработка данных крио-ЭМ для спиральной реконструкции крио-ЭМ-карты амилоидных фибрилл, основные этапы которой показаны на рис. 5. Стеки изображений подвергли коррекции дрейфа и CTF со стандартными параметрами. Поиск филаментов с диаметром в диапазоне от 80 до 150 Å выявил 1318000 проекций сегментов фибрилл, из кото-

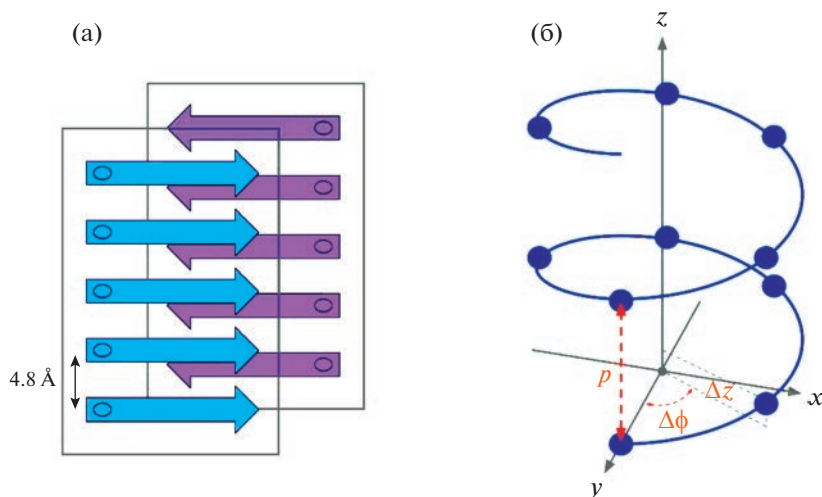


Рис. 3. Спиральная симметрия амилоидных фибрилл Sup35: а – in-register-укладка параллельных β -листов фибрилл Sup35; б – основные параметры спиральности – винтовой шаг (pitch, p), винтовой подъем (rise, Δz) и поворот спирали (twist, $\Delta\phi$).

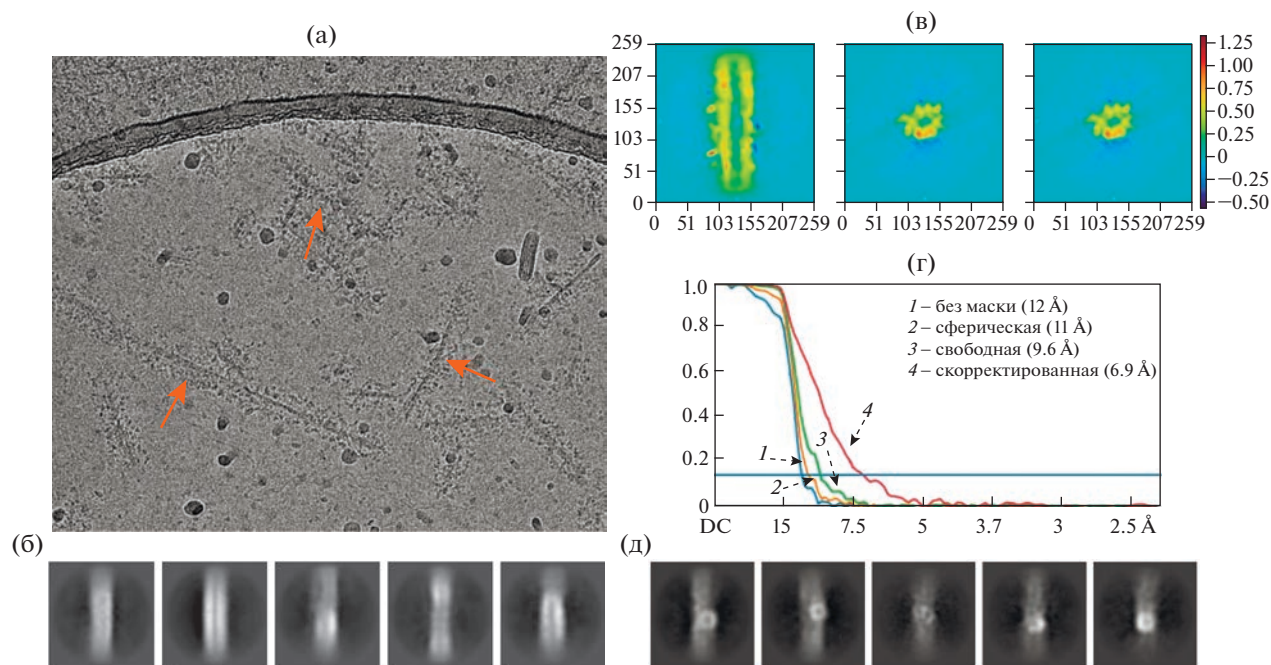


Рис. 4. Крио-ЭМ-данные амилоидных фибрилл варианта W2 белка Sup35NM-eGFP, выделенного *ex vivo* из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: а – крио-ЭМ-изображение фибрилл, окруженных “шубой” из GFP; б – двумерные классы проекций сегментов фибрилл Sup35NM-eGFP, использованные для реконструкции, размер бокса – 294.4 Å; в – проекции крио-ЭМ-карты фибрилл в разных плоскостях, полученные после спиральной реконструкции; г – оценка разрешения крио-ЭМ-карты на графике GSFSC; д – двумерные классы проекций сегментов фибрилл, демонстрирующие наличие GFP.

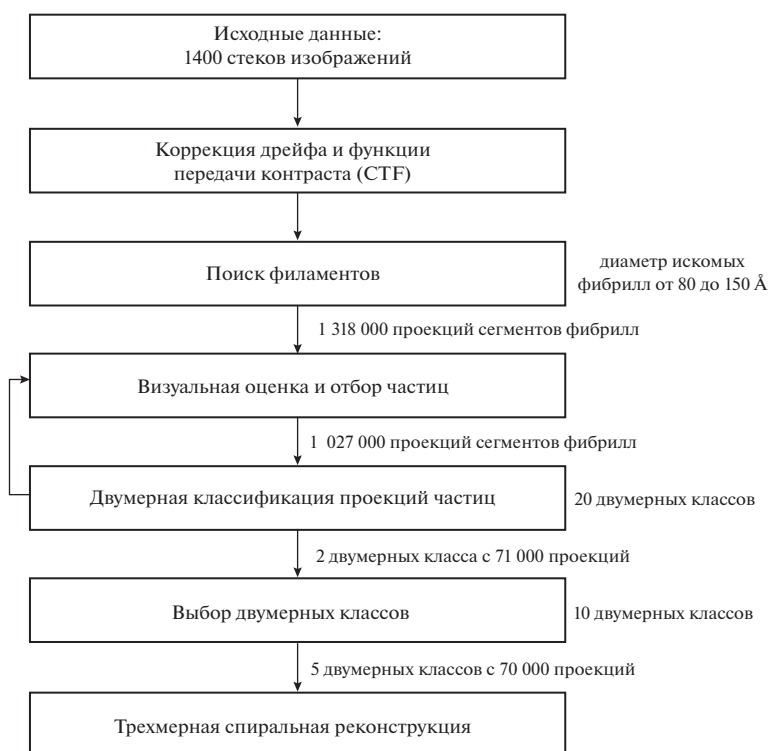


Рис. 5. Основные этапы обработки данных крио-ЭМ для варианта W2 белка Sup35NM-eGFP.

рых визуально инспектировали и отобрали 1027000 проекций для дальнейшей обработки. После нескольких повторов двумерной классификации, выбора и поиска частиц было получено 10 классов с характерными очертаниями фибриллярных структур. На основе пяти классов, содержащих 69 000 частиц (рис. 4б), провели спиральную реконструкцию крио-ЭМ-карты фибрилл без указания параметров спиральности (рис. 4в). Полученная карта структуры фибриллы согласно GSFSC имеет разрешение 12 Å (рис. 4г). Визуальный анализ двумерных классов показывает, что наличие молекул GFP мешает спиральной реконструкции фибрилл с высоким разрешением, препятствуя корректному выравниванию частиц (рис. 4д). В связи с этим не удалось определить, в частности, параметры спиральности полученной модели по известному значению винтового подъема.

Таким образом, методом электронной микроскопии были получены трехмерные крио-ЭМ-карты амилоидных фибрилл дрожжевого приона Sup35, демонстрирующие характерную архитектуру спиральных структур с диаметром 100 Å. Анализ данных показал, что для исследуемой генетической конструкции Sup35NM-eGFP наличие молекул GFP вокруг фибрилл не позволяет исследовать объект с высоким разрешением, что определяет необходимость ее оптимизации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00062).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tycko R., Wickner R.B. // *Acc. Chem. Res.* 2013. V. 46. P. 1487.
<https://doi.org/10.1021/ar300282r>
2. Sabate R. // *Prion.* 2014. V. 8. P. 233.
<https://doi.org/10.4161/19336896.2014.968464>
3. Prusiner S.B. // *Science.* 1982. V. 216. P. 136.
<https://doi.org/10.1126/science.6801762>
4. Paushkin S.V. et al. // *Science.* 1997. V. 277. P. 381.
<https://doi.org/10.1126/science.277.5324.381>
5. Uptain S.M. // *EMBO J.* 2001. V. 20. P. 6236.
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.22.6236>
6. Kushnirov V.V. et al. // *Prion.* 2007. V. 1. P. 179.
<https://doi.org/10.4161/pri.1.3.4840>
7. Krishnan R., Lindquist S.L. // *Nature.* 2005. V. 435. P. 765.
<https://doi.org/10.1038/nature03679>
8. Gorkovskiy A. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1417974111>
9. Toyama B.H. et al. // *Nature.* 2007. V. 449. P. 233.
<https://doi.org/10.1038/nature06108>
10. Dergalev A. et al. // *IJMS.* 2019. V. 20. P. 2633.
<https://doi.org/10.3390/ijms20112633>
11. Ohhashi Y. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. P. 2389.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1715483115>
12. Chernoff Y.O. et al. // *Science.* 1995. V. 268. P. 880.
<https://doi.org/10.1126/science.7754373>
13. Scialò C. et al. // *Viruses.* 2019. V. 11. P. 261.
<https://doi.org/10.3390/v11030261>
14. Mastronarde D.N. // *Microsc. Microanal.* 2003. V. 9. P. 1182.
<https://doi.org/10.1017/S1431927603445911>
15. Punjani A. et al. // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. P. 290.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4169>
16. Makin O.S., Serpell L.C. // *FEBS J.* 2005. V. 272. P. 5950.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05025.x>
17. Van Heel M., Schatz M. // *J. Struct. Biol.* 2005. V. 151. P. 250.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.05.009>
18. Rosenthal P.B., Henderson R. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 333. P. 721.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.07.013>
19. Eanes E.D., Glenner G.G. // *J. Histochem. Cytochem.* 1968. V. 16. P. 673.
<https://doi.org/10.1177/16.11.673>

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 577.32

ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ СВЕТОСОБИРАЮЩЕГО ПИГМЕНТ-БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА LH2 ИЗ ПУРПУРНОЙ СЕРНОЙ БАКТЕРИИ *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* МЕТОДОМ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2023 г. А. Д. Бурцева^{1,*}, Т. Н. Баймухаметов², И. О. Илясов¹, М. А. Большаков³,
А. А. Москаленко³, К. М. Бойко¹, А. А. Ашихмин³

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

³Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований” РАН, Пушкино, Россия

*E-mail: kmb@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 15.06.2023 г.

После доработки 15.06.2023 г.

Принята к публикации 29.06.2023 г.

Первичные процессы фотосинтеза у пурпурных фотосинтезирующих бактерий происходят в светособирающих комплексах (Light-Harvesting, LH). В состав комплекса LH2 входят полипептиды, бактериохлорофилл и в большинстве случаев каротиноиды. Известны три пространственные структуры комплексов LH2 из пурпурных несерных бактерий, однако для пурпурных серных бактерий структуры с высоким разрешением не установлены. Описываются структурные исследования двух светособирающих комплексов LH2 из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*, проведенные методом криоэлектронной микроскопии. Получены изображения каротиноидсодержащего (LH2+) и бескаротиноидного (LH2–) вариантов комплекса, демонстрирующие характерную архитектуру объектов данного типа. Проведена трехмерная реконструкция LH2+ с разрешением 4.5 Å, совпадающая с ранее установленной кристаллической структурой. Для LH2– показано наличие частиц различной морфологии.

DOI: 10.31857/S0023476123600829, EDN: GBGIUU

ВВЕДЕНИЕ

Ключевым процессом биосферы, обеспечивающим поддержание жизни на Земле, является фотосинтез, при котором происходит преобразование энергии солнечного света в энергию химических связей. Пурпурные фотосинтезирующие бактерии обладают одной из наиболее простых и стабильных систем для сбора и трансформации солнечной энергии, изучение свойств которых представляет актуальное направление современной биологии. Начальным этапом процесса фотосинтеза в таких бактериях является поглощение фотона светособирающими (Light-Harvesting, LH) комплексами, за которым следует быстрая и эффективная передача энергии на реакционный центр (RC), где происходит ее первичное преобразование [1]. Фотосинтетический аппарат пурпурных бактерий расположен во внутренней цитоплазматической мембране и, как правило, включает в себя два светособирающих комплекса, LH1 и LH2, а также RC. RC распо-

жен внутри комплекса LH1 и образует с ним “ядерный” (core) комплекс LH1–RC [2], вокруг которого в мембране располагаются комплексы LH2 [3]. Комплекс LH2 обычно преобладает в мембране, однако у некоторых пурпурных бактерий он вообще не обнаружен [4, 5]. LH2 представляет собой высокосимметричный пигмент-белковый комплекс с молекулярной массой 150 кДа, построенный по модульному принципу из одинаковых белковых субъединиц, содержащих низкомолекулярные полипептиды (α и β), бактериохлорофилл (БХл) и в большинстве случаев каротиноиды, выполняющие светособирающую, защитную и структурную функции [4, 6–11].

Установлены три пространственные структуры LH2 комплексов из пурпурных несерных бактерий [1, 12, 13], однако для пурпурных серных бактерий подобные структуры с высоким разрешением до сих пор не получены [14]. Отметим, что для пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* была получена кристалличе-

Таблица 1. Основные параметры крио-ЭМ-эксперимента для каротиноидсодержащих светособирающих комплексов LH2+ и LH2– из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*

	LH2+	LH2–
Ускоряющее напряжение, кВ	300	
Номинальное увеличение	×120000	
Размер пикселя, Å	0.55	
Суммарная доза облучения на стек изображений, э [–] /Å ²	100	
Изображений в стеке	40	
Доза облучения на одно изображение в стеке, э [–] /Å ²	2.5	
Время экспозиции, с	2	
Номинальный диапазон дефокусировки, мкм	[–2.0, –1.0]	
Шаг дефокусировки, мкм	0.1	
Сферическая аберрация, мм	0.01	
Суммарно стеков изображений	1005	2150

ская структура LH2 с разрешением 3.7 Å, а также показана возможность получения уникального бескаротиноидного комплекса (LH2–) [15, 16].

В настоящей работе проведено исследование методом криоэлектронной микроскопии (**крио-ЭМ**) структур светособирающих комплексов из пурпурной серной бактерии *E. haloalkaliphila*, содержащих и не содержащих каротиноиды – LH2+ и LH2– соответственно. Для LH2+ получены двумерные классы проекций в виде цилиндра с ожидаемой симметрией *c*8. Проведена трехмерная реконструкция крио-ЭМ-карты комплекса низкого разрешения. Для комплекса LH2– двумерные классы продемонстрировали существенно различную морфологию частиц, что предположительно является следствием высокой гидрофобности бескаротиноидного комплекса, приводящей к слипанию объектов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выращивание клеток и выделение мембран. Клетки *E. haloalkaliphila* выращивали на модифицированной среде Пфеннинга [17] при температуре 26 ± 2°С на свету интенсивностью ~10 Вт/м². Для получения бескаротиноидных клеток в среду для выращивания добавляли дифениламин в концентрации 12 мл/л [16]. Мембраны получали после разрушения клеток на ультразвуковом дезинтеграторе УЗГ13-0,1-0,063 (УЗВД, Россия) во льду по 45 с трижды с последующим охлаждением в течение 1 мин для предотвращения перегрева клеток. Неповрежденные клетки и фрагменты клеточных стенок удаляли центрифугированием на

центрифуге К24 (“Janetzki”, Германия) в течение 10 мин при 4500 об./мин.

Выделение и очистка белка. Для солюбилизации мембран использовали додецилмальтозид в концентрации 2.0–2.5%. Комплексы LH2 были выделены методом колоночной хроматографии с DEAE-TOYOPEARL 650 S в градиенте NaCl с использованием установки для высокоэффективной жидкостной хроматографии (**ВЭЖХ**) Agilent 1100 (Agilent Technologies, США) в режиме низкого давления. Полученные комплексы дважды промывали 0.05М Трис-НСl-буфером (pH = 8) и концентрировали с помощью центрифугирования в пробирках Amicon Ultra 50K (Millipore, США).

Витрификация. Подготовку образцов для крио-ЭМ провели с помощью оборудования Ресурсного центра зондовой и электронной микроскопии “Нанозонд” (НИЦ “Курчатовский институт”, Россия). Сетки Quantifoil R 1.2/1.3 300 mesh были гидрофилизированы в системе очистки тлеющим разрядом PELCO easiGlow (TedPella, США) в течение 30 с при 15 мА. Затем 3 мкл препарата каротиноидсодержащего комплекса LH2+ были нанесены на сетки при температуре 4°С и 100%-ной влажности. Сетки промакивали в течение 3 с, затем быстро погружали в жидкий этан с помощью автоматизированной установки для витрификации Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США). Экспериментальные данные были получены с помощью просвечивающего криоэлектронного микроскопа Titan Krios 60–300 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенного устройством прямого детектирования электронов Falcon 2 (Thermo Fisher Scientific, США). Основные параметры крио-ЭМ-эксперимента приведены в табл. 1. Аналогичным образом проведена витрификация бескаротиноидного варианта комплекса LH2 (LH2–). Основные параметры съемки приведены в табл. 1.

Обработка данных крио-ЭМ для LH2+. Обработку стеков изображений проводили с помощью программного обеспечения CryoSPARC (v3.3.2) [18]. Для 1005 стеков изображений провели коррекцию дрейфа [19] и оценку параметров функции передачи контраста (**CTF**) со стандартными параметрами. В результате предварительной обработки данных отобрали 938 стеков изображений с уровнем CTF fit < 9 Å, на которых было обнаружено 546 000 частиц с диаметром в диапазоне 60–120 Å. По результатам визуального анализа отобрали 442 000 частиц со следующими параметрами: NCC Score > 0 и –1612 < Local Power < 22979. Далее выбранные частицы экстрагировали в боксе размером 165 × 165 Å и подвергли 2D-классификации со стандартными параметрами. Из 20 полученных двумерных классов отобрали девять классов, содержащих 110 000 проекций частиц, с характерными изображениями проек-



Рис 1. Основные этапы обработки крио-ЭМ-данных каротиноидсодержащего светособирающего комплекса LH2+ из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*.

ций комплекса в различных ориентациях. На основе этих классов, выбранных в качестве шаблонов, провели поиск частиц с диаметром 120 Å. После двух повторов двумерной классификации отобрали 57000 частиц для трехмерной *ab initio*-реконструкции крио-ЭМ-карты. Полученную карту использовали для создания шаблонов, на основе которых в результате повторного поиска было найдено 602000 проекций. Далее полученные частицы экстрагировали в боксе размером 165×165 Å и подвергли пяти последовательным



Рис. 2. Основные этапы обработки крио-ЭМ-данных бескаротиноидного светособирающего комплекса LH2– из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*.

циклом 2D-классификации. Из полученных классов выбрали 10 классов, содержащих 44000 частиц, которые использовали для *ab initio* 3D-реконструкции крио-ЭМ-карты с учетом симметрии *c8*. Для уточнения крио-ЭМ-карты было применено неравномерное выравнивание [20] с указанием симметрии *c8*. Полученную крио-ЭМ-карту использовали для вписывания в нее известной ранее кристаллической структуры LH2+ (код PDB: 6Q53) в UCSF Chimera [21]. Основные этапы обработки данных представлены на рис. 1.

Обработка данных крио-ЭМ для LH2–. Обработку данных для комплекса LH2– провели аналогично обработке данных для комплекса LH2+. А именно, для 2150 стеков изображений провели коррекцию дрейфа и оценку параметров CTF. Поиск частиц провели в режиме “Circular blob” с диапазоном диаметров частиц 40–120 Å. Визуально инспектировали и отобрали 201000 проекций частиц со следующими параметрами: NCC Score >

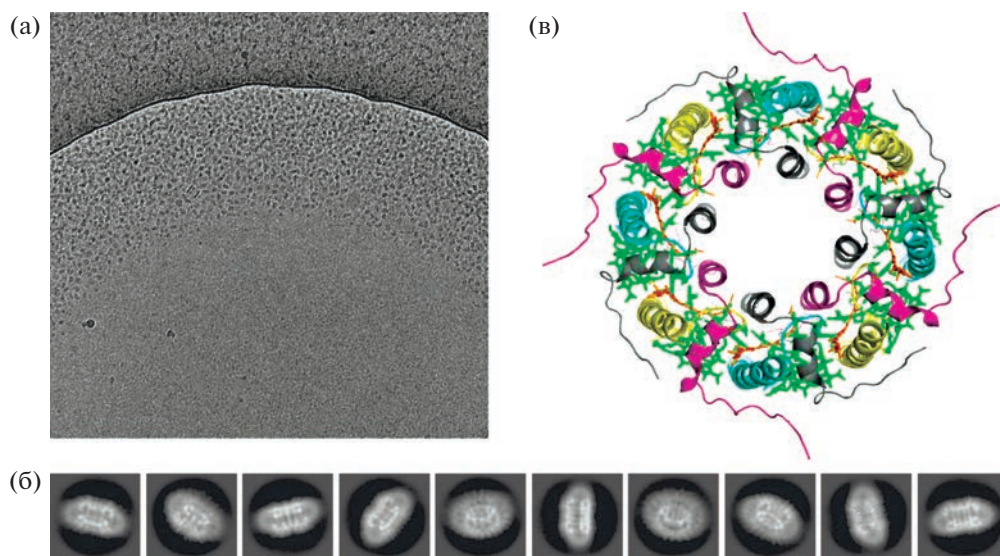


Рис. 3. Крио-ЭМ-данные комплекса LH2+ из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*: а – крио-ЭМ-изображение препарата LH2+ на сетке; б – изображения двумерных классов проекций комплекса LH2+ в различных ориентациях, размер бокса – $165 \times 165 \text{ \AA}$; в – кристаллическая структура комплекса LH2 с разрешением $3.7 \text{ \AA}$ (код PDB – 6Q53), α -пептиды показаны розовым и серым цветом, β -пептиды – желтым и голубым, БХл – зеленым, каротиноиды – оранжевым.

> 1 и $31\,188 < \text{Local Power} < 62\,389$. Далее выбранные частицы экстрагировали в боксе размером $220 \times 220 \text{ \AA}$ и подвергли двумерной классификации. На основе четырех двумерных классов, содержащих 15 000 частиц, с правильными очертаниями комплекса, выбранных в качестве шаблона, был проведен поиск частиц с диаметром $200 \text{ \AA}$. Отобрали 139 000 частиц с $\text{NCC Score} > 0.29$ и $113\,596 < \text{Local Power} < 159\,026$, которые затем экстрагировали в боксе размером $275 \times 275 \text{ \AA}$. Полученные таким образом частицы подвергли двумерной классификации. Далее следовали два аналогичных повтора поиска частиц и двумерной классификации, в результате чего получили 20 классов, содержащих 20 000 проекций комплекса различной морфологии. На основе трех двумерных классов с 5000 проекций с очертаниями длинных мицелл, использованных в качестве шаблонов, провели поиск частиц и 2D-классификацию. Таким образом, было получено 25 000 проекций частиц в 15 классах. Основные этапы обработки данных представлены на рис. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе предварительного крио-ЭМ-эксперимента для каротиноидсодержащего комплекса LH2+ получили 1005 стеков изображений, на которых различимы объекты эллипсовидной и круглой формы, расположенные исключительно у краев отверстий сетки (рис. 3а). Данный факт предположительно является следствием наличия у аморфного льда мениска с более толстым слоем

льда у краев и более тонким слоем по центру отверстий сетки, в результате чего образец “стягивается” к краям. Варьирование времени промывки (блоттинга) при витрификации, добавление 0.05% детергента DDM не привели к существенным изменениям распределения образца в слое аморфного льда. Аналогичная ситуация наблюдалась у комплекса LH2–.

При начальной обработке крио-ЭМ-данных для LH2+ провели коррекцию дрейфа стеков изображений с последующей оценкой параметров CTF и выбором изображений по значению параметра $\text{CTF fit} < 9 \text{ \AA}$ для достижения более высокого разрешения. Основные этапы обработки данных представлены на рис. 2. Поиск частиц проводили с заданными значениями минимального и максимального диаметра – 60 и $120 \text{ \AA}$ соответственно согласно данным предыдущих исследований комплекса LH2 из пурпурной бактерии *Marichromatium purpuratum* [22]. С помощью гистограммы (NCC Score , Power Score) и визуальной оценки найденных частиц отобрали 546 тысяч проекций для дальнейшей обработки. В результате нескольких повторов поиска частиц и 2D-классификации выявили 10 двумерных классов проекций LH2+, имеющих 44 тысячи частиц, с характерными очертаниями комплекса, заключенного в оболочку из детергента, в различных ориентациях (рис. 3б).

На основе проекций из упомянутых выше двумерных классов была проведена трехмерная *ab initio*-реконструкция комплекса с учетом симметрии $c8$ (рис. 4а). Карта крио-ЭМ обладает

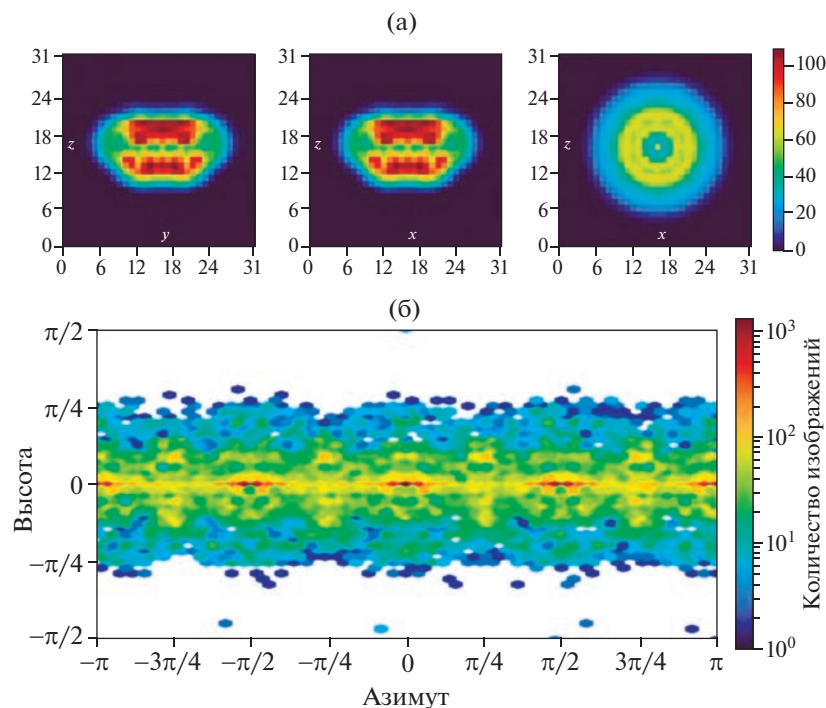


Рис. 4. Трехмерная реконструкция каротиноидсодержащего светособирающего комплекса LH2 из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*: а – проекции трехмерной *ab initio*-реконструкции крио-ЭМ-карты комплекса в различных плоскостях; б – угловое распределение ориентаций комплекса.

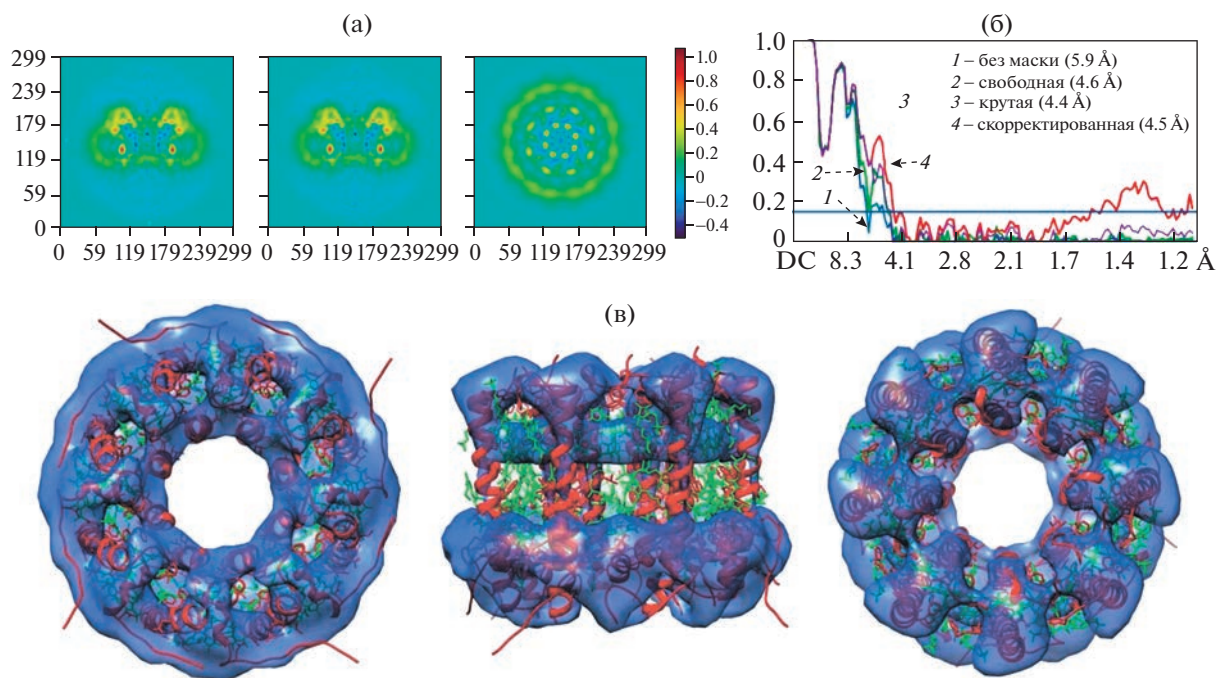


Рис. 5. Трехмерная реконструкция крио-ЭМ-карты каротиноидсодержащего светособирающего комплекса LH2+ из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* с учетом *c8*-симметрии: а – проекции крио-ЭМ-плотности комплекса после неравномерного уточнения в различных плоскостях; б – кривые FSC; в – кристаллическая структура LH2 (код PDB – 6Q53), вписанная в полученную крио-ЭМ-карту, α - и β -пептиды показаны красным цветом, молекулы БХл и каротиноидов – зеленым, крио-ЭМ-карта LH2+ – синим цветом, полупрозрачная.

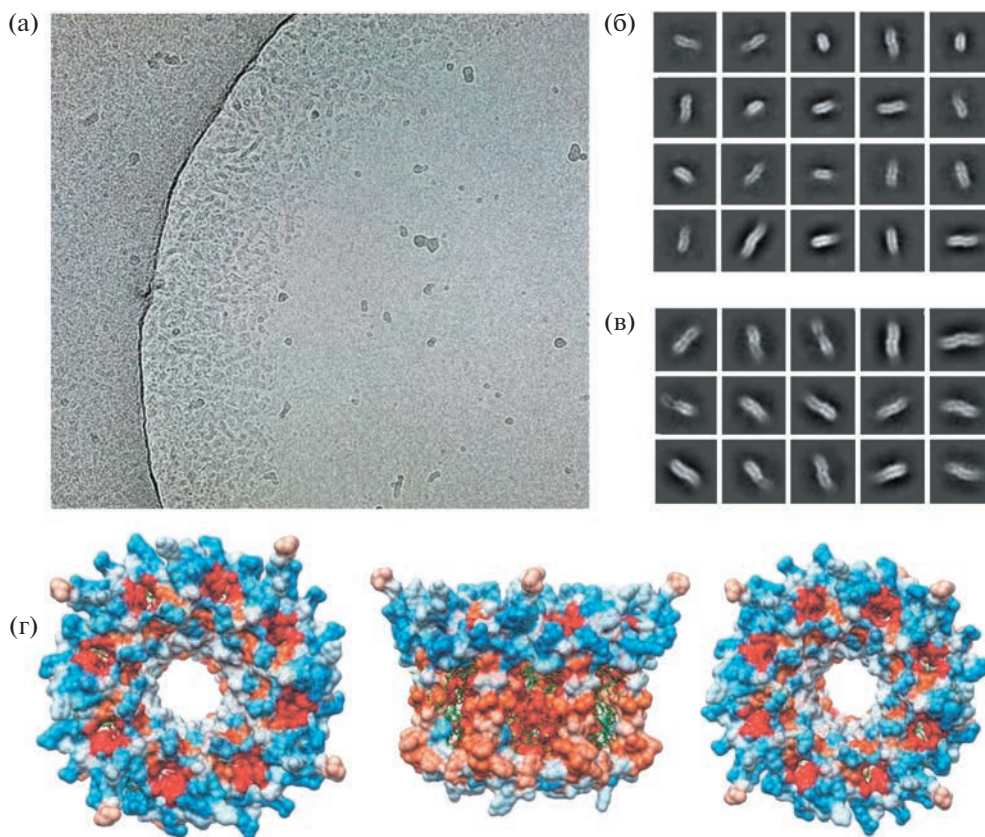


Рис. 6. Крио-ЭМ-данные бескаротиноидного светособирающего комплекса LH2– из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*: а – крио-ЭМ-изображение препарата LH2– на сетке; б – двумерные классы комплекса, демонстрирующие различную морфологию проекций частиц; в – двумерные классы, полученные в результате поиска частиц с заданным шаблоном из “длинных” частиц, размер бокса – 275×275 Å; г – проекции кристаллической структуры комплекса LH2 (код PDB – 6Q53) с удаленными каротиноидами. Структура показана в виде поверхности, гидрофобные участки показаны оранжевым цветом, гидрофильные – синим, БХл – зеленым. Красным цветом показаны гидрофобные участки, возникающие при удалении каротиноидов.

архитектурой, сходной с ранее установленной кристаллической структурой комплекса LH2, обладающей симметрией $c8$ [14] и организованной в два кольца: наружное большое кольцо из восьми β -пептидов и восьми молекул БХл, а также внутреннее малое кольцо из восьми α -пептидов и 16 молекул БХл (рис. 3в). Диаметр обнаруженных частиц в оболочке из детергента составляет ~ 120 Å, большого кольца комплекса ~ 70 Å, меньшего кольца – 60 Å, высота комплекса – 60 Å. На боковых проекциях крио-ЭМ-карты прослеживаются два кольца комплекса с очертаниями α - и β -пептидов (рис. 4а). Слабая крио-ЭМ-карта на виде сверху обусловлена наличием преимущественной боковой ориентации комплекса на изображениях (рис. 4б).

С использованием полученной 3D-карты крио-ЭМ было проведено неравномерное уточнение (Non-uniform refinement) [20] с учетом установленной симметрии $c8$, предназначенное для мембранных белков и белков с небольшой массой (рис. 5а). Таким образом получена крио-

ЭМ-карта для комплекса LH2+ с разрешением 4.5 Å (рис. 5б). Результат вписывания ранее установленной кристаллической структуры LH2+ (код PDB – 6Q53) в полученную карту крио-ЭМ показан на рис. 5в. Как видно, плотность крио-ЭМ-карты наиболее выражена в области двух колец комплекса, при этом область между кольцами имеет относительно слабую плотность. Тем не менее отчетливо прослеживаются α -спирали полипептидов с правильной взаимной ориентацией.

Для комплекса LH2– методом крио-ЭМ получено 2150 стеков изображений, демонстрирующих объекты различной морфологии: короткие частицы с характерной эллипсоидной формой LH2 и более вытянутые частицы разной длины (рис. 6а). Аналогично обработке данных LH2+ было получено 20 двумерных классов с 208000 проекций комплекса LH2– (рис. 6б) в боксах размером 275×275 Å. Среди проекций наблюдаются как длинные структуры с изгибами, так и короткие, имеющие характерные очертания комплекса LH2+. В состав LH2+ из пурпурной серной бак-

терии *E. haloalkaliphila* входит высокогидрофобный каротиноидный пигмент – ликопин. Анализ гидрофобности поверхности молекулы LH2+ показал, что удаление ликопина приводит к увеличению площади гидрофобной поверхности комплекса (рис. 6г). Вероятно, молекулы бескаротиноидного LH2– стремятся закрыть образовавшиеся гидрофобные участки и по этой причине собираются в нефизиологичные агрегаты в единой оболочке из детергента. Действительно, поиск частиц по заданному шаблону из “длинных” частиц с последующей 2D-классификацией выявил 25 000 частиц с морфологией, отличной от каротиноидсодержащего варианта комплекса (рис. 6в). Увеличение концентрации детергента DDM с 1.0 до 2.0% для увеличения растворимости комплекса не продемонстрировало значимых различий в морфологии частиц. Таким образом, гетерогенность препарата LH2– и наличие преимущественных ориентаций не позволили провести реконструкцию структуры.

В результате получена крио-ЭМ-плотность для каротиноидсодержащего светособирающего комплекса LH2+ из пурпурной серной бактерии *E. haloalkaliphila* с разрешением 4.5 Å, согласующаяся с установленной ранее кристаллической структурой данного комплекса низкого разрешения. Получены крио-ЭМ-изображения для бескаротиноидного комплекса LH2–, демонстрирующие гетерогенность объекта. Двумерные классы проекций комплекса имеют различную морфологию, как сходную с пространственной организацией каротиноидсодержащего светособирающего комплекса LH2+, так и характерную для более крупных агрегатов, формирующихся, по-видимому, за счет слипания частиц в отсутствие молекул каротиноида.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00062).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McDermott G. et al. // Nature. 1995. V. 374. P. 517. <https://doi.org/10.1038/374517a0>
2. Zuber H., Cogdell R.J. // Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. V. 2. P. 315. https://doi.org/10.1007/0-306-47954-0_16
3. Bahatyrova S. et al. // Nature. 2004. V. 430. P. 1058. <https://doi.org/10.1038/nature02823>
4. Cogdell R.J. et al. // Quart. Rev. Biophys. 2006. V. 39. P. 227. <https://doi.org/10.1017/S0033583506004434>
5. Gabrielsen M. et al. // The Purple Phototrophic Bacteria. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. V. 28. P. 135. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5_8
6. Moskalenko A.A., Karapetyan N.V. // Z. Naturforsch. C. 1996. B. 51. S. 763. <https://doi.org/10.1515/znc-1996-11-1201>
7. Scheer H. // Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. V. 25. P. 1–26. https://doi.org/10.1007/1-4020-4516-6_1
8. Polyakov N.E., Leshina T.V. // Russ. Chem. Rev. 2006. V. 75. P. 1049. <https://doi.org/10.1070/RC2006v075n12ABEH003640>
9. Theiss C. et al. // Biophys. J. 2008. V. 94. P. 4808. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.121681>
10. Telfer A. et al. // Carotenoids. Basel: Birkhäuser Basel, 2008. V. 4. P. 265. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-7499-0_14
11. Frank H.A., Polívka T. // The Purple Phototrophic Bacteria. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. V. 28. P. 213. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5_12
12. Koepke J. et al. // Structure. 1996. V. 4. P. 581. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00063-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00063-9)
13. Papiz M.Z. et al. // J. Mol. Biol. 2003. V. 326. P. 1523. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00024-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00024-X)
14. Leiger K. et al. // J. Phys. Chem. B. 2019. V. 123. P. 29. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b08083>
15. Ашихмин А.А. и др. // Докл. РАН. 2013. Т. 453. С. 563. <https://doi.org/10.7868/S0869565213350235>
16. Ashikhmin A. et al. // Photosynth. Res. 2014. V. 119. P. 291. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9947-6>
17. Imhoff J.F. // Anoxygenic phototrophic bacteria, in: B. Austin (Ed.), Methods in Aquatic Bacteriology. Chichester: Wiley, 1988. P. 425. <https://doi.org/10.1017/S0025315400043393>
18. Punjani A. et al. // Nat Methods. 2017. V. 14. P. 290. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4169>
19. Zheng S.Q. et al. // Nat Methods. 2017. V. 14. P. 331. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4193>
20. Punjani A. et al. // Nat Methods. 2020. V. 17. P. 1214. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-00990-8>
21. Pettersen E.F. et al. // J. Comput. Chem. 2004. V. 25. P. 1605. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
22. Gardiner A.T. et al. // Sci. Adv. 2021. V. 7. P. eabe4650. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe4650>

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

УЛУЧШЕНИЕ ДИФРАКЦИОННЫХ СВОЙСТВ КРИСТАЛЛОВ
ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ© 2023 г. Л. А. Варфоломеева^{1,*}, К. М. Поляков², А. С. Комолов³, Т. В. Ракитина^{3,4},
Н. И. Дергоусова¹, П. В. Дороватовский³, К. М. Бойко¹, Т. В. Тихонова¹, В. О. Попов¹¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия⁴Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

*E-mail: larisaavarfolomeeva@gmail.com

Поступила в редакцию 02.06.2023 г.

После доработки 02.06.2023 г.

Принята к публикации 02.06.2023 г.

При решении структуры тиоцианатдегидрогеназы (TcDH) возникли трудности, связанные с тем, что кристаллы фермента либо были двойниками, либо имели сильную анизотропию. Дифракционное качество кристаллов может быть улучшено за счет использования в качестве объекта изучения мутантных форм или изучения структуры родственного фермента из другого организма. На основе анализа олигомерной структуры TcDH предложены перспективные для улучшения дифракционных свойств мутантные формы фермента. Получены кристаллы и решены структуры мутантных форм TcDH с заменами T169A и K281A. Структура мутантной формы с заменой T169A аналогична ранее решенным структурам. В структуре мутантной формы с заменой K281A обнаружено изменение в строении тетрамера, которое привело к невозможности двойникования.

DOI: 10.31857/S0023476123600799, EDN: ABAVXD

ВВЕДЕНИЕ

Фермент нового класса, тиоцианатдегидрогеназа (TcDH), был впервые выделен из галоалкалофильной хемолитоавторофной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* Arh1 [1]. Пространственная структура TcDH установлена методом рентгеноструктурного анализа (РСА) [2]. Основной структуры молекулы TcDH является скрученный β -лист из семи антипараллельных цепей, формирующий β -пропеллер. Субъединицы фермента формируют симметричный димер. В ранее решенных структурах два симметричных димера TcDH образуют тетрамер. Субъединицы фермента в тетрамере располагаются в одной плоскости. Контакты субъединиц в димере значительно сильнее контактов между субъединицами из разных димеров в тетрамере. Активный центр TcDH располагается в центральной полости β -пропеллера. Доступ молекул растворителя в активный центр фермента возможен с одной стороны центральной полости. Вторая сторона центральной полости закрыта С-концевым фрагментом полипептидной цепи. Активный центр фермента содержит три иона меди, координированных шестью остатками гистидина и остатками лизина и аспартата.

Топологически молекула TcDH сходна со структурой N-концевого домена N_2O -редуктазы [3].

Независимые части элементарных ячеек всех восьми пространственных структур TcDH, депонированных в банк белковых структур, содержат идентичные тетрамеры. Пять структур TcDH (6G50, 6I3Q, 6UWE, 6G50, 8BPN), полученные в разных условиях кристаллизации, принадлежат к кристаллической модификации, в которой возможно двойникование псевдомероздрического типа. Кристаллы фермента этой кристаллической модификации принадлежат к пр. гр. $P2_1$. Причем параметры элементарной ячейки a и c приблизительно равны, а угол моноклинности β близок к 120° . Димеры в структурах тетрамеров располагаются в одной плоскости, параллельной плоскости, включающей ребро b и диагональ $(a + c)$ элементарной ячейки. Тетрамеры TcDH образуют слои в этих структурах.

В остальных структурах TcDH (5OEX, 5F75, 6SJI) строение тетрамеров аналогично, но они не образуют слои. Кристаллы этих модификаций также принадлежат к пр. гр. $P2_1$, но имеют параметры элементарной ячейки, не допускающие псевдомероздрического двойникования. Однако дифракционные данные кристаллов этих кристал-

лических модификаций обладают большой анизотропией и более низким разрешением по сравнению с кристаллами-двойниками.

Псевдомероздрическое двойникование часто наблюдается для кристаллов белков. Было подсчитано, что на момент публикации статьи более 30% структур, депонированных в банк белковых структур, могли оказаться псевдомероздрически двойниками [4]. В этой работе был предложен алгоритм, позволяющий определять потенциальный оператор двойникования для заданной элементарной ячейки и пространственной группы и оценивать долю каждого кристаллического домена. Этот алгоритм был включен в программу уточнения REFMAC5 [5]. Уточнение степени двойникования при кристаллографическом уточнении заметно улучшает качество карты электронной плотности и статистические показатели [6].

Двойникование приводит к ухудшению дифракционных свойств кристаллов за счет уширения дифракционных пиков, затруднения индексирования рефлексов и кристаллографического уточнения модели. Идеальное двойникование приводит к снижению разрешения в 1.26 раза [6]. Двойникование кристалла обнаруживается при анализе статистики распределения интенсивностей рефлексов дифракционных данных, и существует два специальных теста [7, 8]. Для небольшой степени двойникования можно рассчитать вклады в интенсивности рефлекса от каждого кристаллического домена, используя программу DETWIN [8]. Раздвойниковывание данных значительно повышает качество карты электронной плотности, несмотря на возрастание ошибок при определении интенсивностей рефлексов [9].

Генно-инженерный подход неоднократно применялся для улучшения качества кристаллов исследуемых белков [10]. Так, замена остатков лизина, расположенных на поверхности белка RhoGDI из *Homo sapiens*, на аланин улучшила качество кристаллов белка [11]. Модификация длины N- и C-концов МАРКАР-киназы 2 из *Homo sapiens* позволила получить мутантные формы фермента, которые образовывали кристаллы лучшего качества [12]. Удаление подвижной петли, закрепляющей липоксигеназу мягкого коралла *Plexaura homomalla* на цитоплазматической мембране, привело к улучшению качества кристаллов и увеличению разрешения дифракционных данных [13]. Оставление гистидинового тага в препарате аквапоринов из *Homo sapiens* и *Spinacia oleracea* способствовало уменьшению степени двойникования или его исчезновению вовсе, однако разрешение дифракционных данных ухудшалось [14].

Цель настоящей работы – улучшение дифракционных качеств кристаллов TcDH за счет исследования структур мутантных форм фермента с заменами аминокислотных остатков в области

слабых контактов между димерами в тетрамере. Ожидалось, что использование этих мутантных форм изменит четвертичную структуру белка и исключит возможность двойникования кристаллов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка генно-инженерных препаратов TcDH. Создание генно-инженерных конструкций TcDH с заменами T169A, K281A и двойной заменой (K264A и K267A), экспрессию рекомбинантных белков в клетках *E. coli*, выделение и очистку проводили согласно методике [2].

Перед определением активности и кристаллизацией препараты фермента насыщали ионами Cu^{2+} в молярном соотношении 1 : 3. Удельную активность рекомбинантных форм TcDH определяли спектрофотометрически в реакции с цитохромом C_{550} из сердца лошади [2].

Кристаллизация. Для кристаллизации использовали растворы рекомбинантных форм TcDH с концентрацией 10 мг/мл в 25 мМ боратном буфере, pH 9.5, содержащем 150 мМ NaCl.

Первичный поиск условий кристаллизации рекомбинантных форм TcDH осуществляли методом диффузии паров (вариант “сидячая капля”) с использованием роботизированной системы для кристаллизации макромолекул Rigaku (Япония) и набора коммерческих растворов для кристаллизации Index HT, Crystal Screen HT (Hampton research, США). Оптимизацию найденных условий кристаллизации осуществляли методом диффузии паров (вариант “висячая капля”) в 24-луночных планшетах (VDX, США) при температуре 15°C. Смешивали 1 мкл раствора белка и 1 мкл раствора резервуара, в лунку планшета вносили 500 мкл раствора резервуара.

Кристаллы TcDH с заменой T169A получены при использовании противораствора следующего состава: 0.2 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 М Bis-Tris, pH 5.5, 25% PEG 3350. Кристаллы TcDH с заменой K281A получены при использовании противораствора следующего состава: 0.5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 М цитрата натрия, pH 5.6, 0.7 М Li_2SO_4 . Кристаллы TcDH с двойной заменой (K264A, K267A) получены при использовании противораствора следующего состава: 1 мМ ZnCl_2 , 0.1 М MES, pH 6.0, 12% PEG 6000.

Сбор дифракционных данных. Наборы дифракционных данных для кристаллов рекомбинантных форм TcDH с заменой T169A и двойной заменой (K264A, K267A) собирали на станции “Белок” синхротрона Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” (Москва, Россия) [15], для кристалла TcDH с заменой K281A – на станции BL41XU (SPring-8, Япония). Для кристаллов TcDH с заменой T169A

Таблица 1. Статистика сбора данных и уточнения структур рекомбинантных форм TcDH

	T169A	K281A
Станция	РСА-Белок, КИСИ	BL41XU, SPring-8, Япония
Пр. гр.	$P2_1$	$P2_1$
$a, b, c, \text{\AA}$	90.81, 162.24, 90.76	98.15, 142.42, 294.40
β , град	119.74	90.07
Длина волны, $\text{\AA}$	0.79312	1.00000
Разрешение, $\text{\AA}$	81.12–1.80 (1.85–1.80)	49.12–2.07 (2.10–2.07)
Число независимых рефлексов	208077 (14719)	485243 (20586)
Повторяемость	6.75 (6.32)	2.92 (2.96)
$I/\sigma(I)$	6.57 (1.70)	6.91 (1.52)
Полнота данных, %	98.8 (94.4)	98.8 (99.8)
R_{meas} , %	27.3 (129.0)	15.3 (99.3)
$CC_{1/2}$, %	98.7 (72.0)	99.1 (40.8)
Степень двойникования	0.56/0.44	1.00
R_{cryst} , %	18.6	17.9
R_{free} , %	25.4	23.4
Среднеквадратичные отклонения		
Длины связей, $\text{\AA}$	0.018	0.018
Валентные углы, град	3.000	2.816
Число неводородных атомов		
Белок	14547	57915
Растворитель	743	2419
Ионы меди	8	32
Общий средний В-фактор		
Средний В-фактор по белку	18.9	27.9
Средний В-фактор по растворителю	19.8	27.3
Код PDB	8P3L	8P3M

Примечание. В скобках приведены значения для данных высокого разрешения.

использовали раствор на основе кристаллизационного раствора с добавлением 25% PEG 400 в качестве криопротектанта. Для кристаллов TcDH с заменой K281A использовали раствор на основе кристаллизационного раствора с добавлением 20% этиленгликоля в качестве криопротектанта. Для кристаллов TcDH с двойной заменой (K264A, K267A) использовали раствор на основе кристаллизационного раствора с добавлением 20% глицерина в качестве криопротектанта. Сбор дифракционных данных проводили при температуре 100 K.

Обработку интенсивностей рефлексов проводили с помощью программы XDS [16]. Усреднение проводили в программе XSCALE [16]. Статистика сбора данных представлена в табл. 1.

Кристаллы рекомбинантной формы TcDH с двойной заменой (K264A, K267A) были не пригодны для РСА с высоким разрешением. Они да-

вали дифракционную картину только с разрешением $\sim 3 \text{\AA}$.

Решение и уточнение структуры. Структуры рекомбинантных форм TcDH с заменами T169A и K281A были решены методом молекулярного замещения с помощью программы MOLREP [17], в качестве модели использовали тетрамер нативной TcDH. Модель уточняли в программе REFMAC5 [5]. Для кристаллографических расчетов использовали комплекс программ CCP4 [18]. Для структуры TcDH с заменой T169A на заключительных стадиях уточнения учитывали возможность двойникования. Модель после каждых 10 циклов уточнения корректировали в ручном режиме в графической программе COOT [19]. Статистика уточнения структур представлена в табл. 1. Расчет энергии диссоциации димеров и тетрамеров TcDH и анализ аминокислотных остатков, вовлеченных в формирование контактов между димерами TcDH

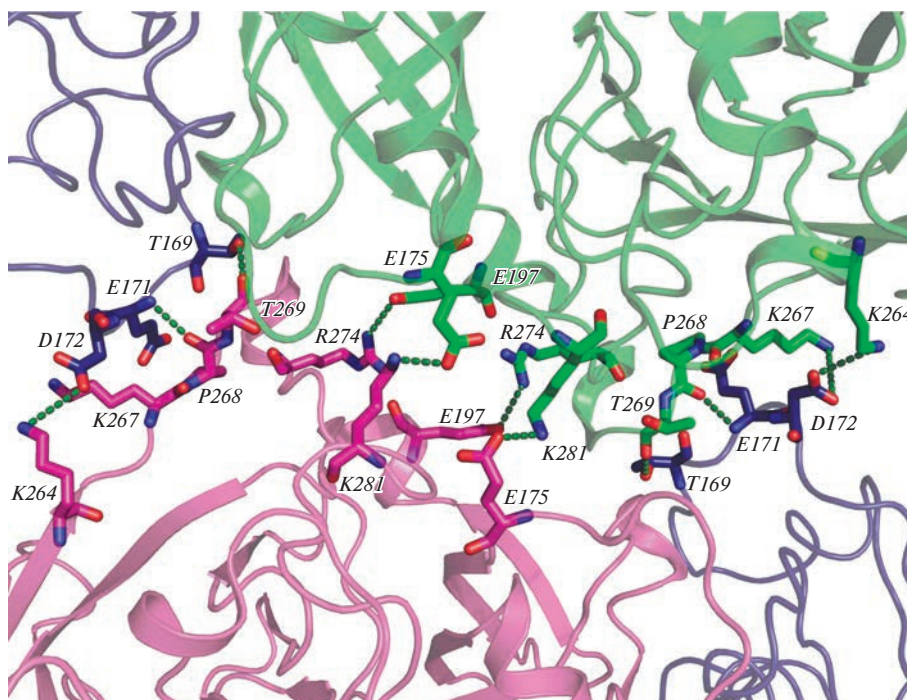


Рис. 1. Область контактов димеров в тетрамере TcDH дикого типа (PDB ID 6I3Q). Аминокислотные остатки, формирующие контакты между димерами в тетрамере, представлены в виде цилиндров. Для внутренних субъединиц элементы вторичной структуры показаны в виде ленточной модели, для внешних субъединиц элементы вторичной структуры не показаны. Водородные связи и электростатические взаимодействия показаны пунктирными линиями.

в тетрамере, проводили с помощью программы PISA [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Тетрамер TcDH состоит из двух димеров (PDB ID 6I3Q). Субъединицы в димерах фермента прочно связаны. По оценке программы PISA [20] энергия сольватации димера составляет $\Delta G^i \approx -37.0$ ккал/моль, а площадь контакта субъединиц димера — $2590 \text{ \AA}^2$. Субъединицы в димерах связаны за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий. Область контакта включает в себя ~ 30 водородных связей. Димеры в тетрамере TcDH располагаются в одной плоскости. Контакты между субъединицами двух взаимодействующих димеров в тетрамере являются менее прочными. Энергия сольватации поверхности взаимодействия димеров составляет $\Delta G^i \approx -2.0$ ккал/моль, а суммарная площадь контакта равна $\sim 900 \text{ \AA}^2$. Тетрамер TcDH стабилизируется небольшим числом водородных связей (~ 8) и электростатических взаимодействий между димерами. В тетрамере TcDH можно выделить внутренние и внешние субъединицы. Площадь взаимодействия внутренних субъединиц в тетрамере составляет $\sim 400 \text{ \AA}^2$, а площадь взаимодействия внешней и внутренней субъединиц равна $\sim 244 \text{ \AA}^2$. Внутренние и внешние субъединицы димера совмещаются по всем

α -атомам с g.m.s.d. $0.3 \text{ \AA}$. Взаимодействие аминокислотных остатков в области контактов двух димеров в тетрамере показано на рис. 1. Для внутренних субъединиц в тетрамере наблюдаются взаимодействия между боковыми группами остатков R274—E197 и K281—E175. А для внутренней и внешней субъединиц обнаруживаются взаимодействия между боковыми группами остатков E171—K264 и D172—K267 и водородные связи между атомами основной цепи остатков P268—E171 и между карбонильной группой и боковой группой остатков T269—T169 (рис. 1).

Разрушение контактов между димерами TcDH может привести к изменению структуры тетрамера и упаковки молекул в кристалле и улучшить качество кристаллов фермента из-за исчезновения возможности двойникования. В качестве мишеней для точечного мутагенеза были выбраны остатки K281, T169, K264, K267, замена которых могла привести к нарушению взаимодействий между димерами в тетрамере TcDH. Замены остатков K281, T169, K264, K267 на аланин у мутантных форм фермента не должны сильно нарушить правильную укладку и, с другой стороны, могут изменить олигомерную структуру, тем самым исключив возможность образования двойников.

Кристаллы мутантной формы TcDH с заменой T169A (как и кристаллы большинства решенных

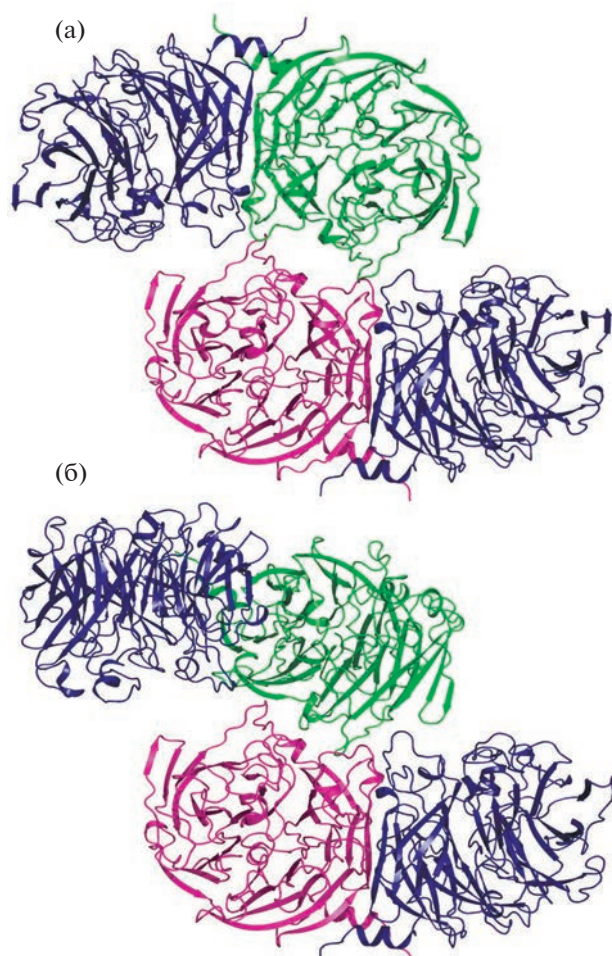


Рис. 2. Структура тетрамеров мутантной формы TcDH с заменой T169A (а) и K281A (б). Структуры мутантных форм совмещены по всем C α -атомам внутренней субъединицы нижнего димера.

ранее структур) принадлежат к пр. гр. $P2_1$ с приблизительно равными параметрами a и c и углом моноклинности $\beta \sim 120^\circ$. Структура TcDH с заменой T169A уточнена как двойник, состоящий из двух доменов со степенью двойникования 0.56/0.44 (табл. 1). Значение R_{cryst} составляет 18.6%, а R_{free} — 25.4% (табл. 1). Независимая часть элементарной ячейки содержит один тетрамер фермента (рис. 2а). Остаток A169 хорошо различим на карте электронной плотности (рис. 3а).

Строение тетрамера мутантной формы аналогично строению тетрамера фермента дикого типа. Структуры внутренней и внешней субъединицы TcDH с заменой T169A совмещаются с соответствующими субъединицами TcDH дикого типа (PDB ID 6I3Q) по всем C α -атомам с г.м.с.д. 0.2 Å. Отсутствие водородной связи между боковой группой A169 и кислородом пептидной связи T269 не привело к нарушению взаимодействия между внутренней и внешней субъединицами му-

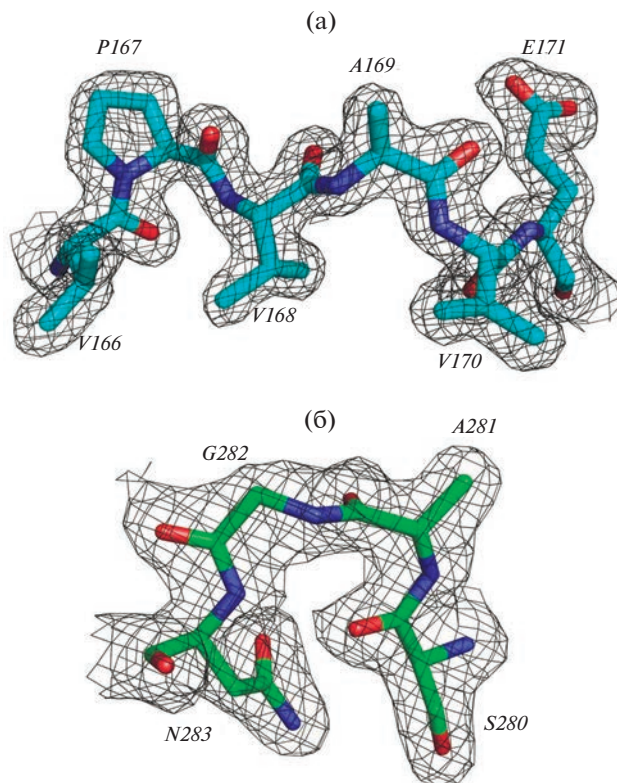


Рис. 3. Карта $(2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})$ электронной плотности на уровне 1σ для участка полипептидной цепи с точечной мутацией T169A (а) из структуры мутантной формы с заменой T169A и с точечной мутацией K281A (б) из структуры мутантной формы с заменой K281A.

тантной формы TcDH. Данная водородная связь, вероятно, не вносила решающего вклада в стабилизацию тетрамера TcDH.

Дифракционные данные TcDH с заменой K281A были обработаны в пр. гр. $P2_12_12_1$ и $P2_1$. Причем в обеих пространственных группах двойникование невозможно.

В пр. гр. $P2_12_12_1$ параметры элементарной ячейки равны $a = 98.15$, $b = 142.42$ и $c = 294.40$ Å. В этой группе закон погасания был нарушен для рефлексов с индексами H00 и 00L. Программа MOLREP смогла определить положение трех димеров мутантной формы фермента из предполагаемых четырех в независимой части элементарной ячейки. Анализ карты электронной плотности в графической программе COOT позволил достроить четвертую димерную молекулу TcDH в модель вручную. Модель удалось уточнить до значения $R_{\text{cryst}} = 19.0\%$.

Понижение группы симметрии до $P2_1$ ($a = 98.15$, $b = 142.42$, $c = 294.40$ Å, $\beta = 90.07^\circ$) позволило устранить противоречие с систематическими погасаниями и способствовало тому, что программа MOLREP определила положение всех

восьми димеров в независимой части элементарной ячейки. В пр. гр. $P2_1$ модель удалось уточнить до значения $R_{\text{cryst}} = 17.9\%$ (табл. 1). Димеры мутантной формы с заменой K281A формировали тетрамерную структуру, похожую по строению на тетрамер фермента дикого типа (рис. 26). Остаток A281 хорошо различим на карте электронной плотности (рис. 36).

Замена K281A не привела к нарушению укладки субъединиц. Не изменилось для этой мутантной формы и строение димеров. А в строении тетрамера TcDH с заменой K281A наблюдаются существенные изменения по отношению к строению тетрамеров ранее решенных структур. Тетрамеры мутантных форм TcDH с заменами T169A и K281A представлены на рис. 2. На рисунке выбрана ориентация, для которой все субъединицы в тетрамере TcDH с заменой T169A (как и у всех решенных ранее структур) располагаются в плоскости рисунка (рис. 2а), а тетрамер TcDH с заменой K281A (рис. 2б) развернут так, чтобы совместились внутренние субъединицы одного из димеров (нижний на рисунке). Димеры в тетрамере мутантной формы TcDH с заменой K281A не располагаются в одной плоскости (рис. 2б). Димеры в этой структуре развернуты друг относительно друга примерно на 30° . Такое строение тетрамера делает невозможным упаковку молекул в слоистую структуру, склонную к образованию двойников. В структуре TcDH с заменой K281A только внутренние субъединицы участвуют в образовании контактов в тетрамере. Площадь контактов равна $\sim 370 \text{ \AA}^2$. Нарушение взаимодействий между парой остатков E175 и 281 оказалось критичным для стабилизации структуры тетрамера TcDH.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе поиска кристаллов TcDH с улучшенными дифракционными свойствами решены структуры мутантных форм фермента с точечными заменами T169A и K281A. Кристаллы TcDH с заменой T169A были двойниками. Замена K281A позволила за счет изменения структуры тетрамера фермента найти новую кристаллическую модификацию фермента, где двойникование невозможно. Однако кристаллы TcDH с заменой K281A давали дифракционную картину только с разрешением около $2 \text{ \AA}$ из-за большого размера элементарной ячейки.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 23-74-30004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Lysenko A.M. et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 657. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-657>
2. Tikhonova T.V., Sorokin D.Y., Hagen W.R. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2020. V. 117. P. 5280. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922133117>
3. Paraskevopoulos K., Antonyuk S.V., Sawers R.G. et al. // J. Mol. Biol. 2006. V. 362. P. 55. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.064>
4. Lebedev A.A., Vagin A.A., Murshudov G.N. // Acta Cryst. D. 2006. V. 62. P. 83. <https://doi.org/10.1107/S0907444905036759>
5. Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 355. <https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>
6. Campeotto I., Lebedev A., Schreurs A.M.M. et al. // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 14876. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32962-6>
7. Yeates T.O. // Methods Enzymol. 1997. V. 276. P. 344. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)76068-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)76068-3)
8. Padilla J.E., Yeates T.O. // Acta Cryst. D. 2003. V. 59. P. 1124. <https://doi.org/10.1107/S0907444903007947>
9. Yang F., Dauter Z., Wlodawer A. // Acta Cryst. D. 2000. V. 56. P. 959. <https://doi.org/10.1107/S0907444900007162>
10. Derewenda Z. S. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 604. <https://doi.org/10.1107/S090744491000644X>
11. Longenecker K.L., Garrard S.M., Sheffield P.J., Derewenda Z.S. // Acta Cryst. D. 2001. V. 57. P. 679. <https://doi.org/10.1107/S0907444901003122>
12. Malawski G.A., Hillig R.C., Monteclaro F. et al. // Protein Sci. 2006. V. 15. P. 2718. <https://doi.org/10.1110/ps.062491906>
13. Neau D.B., Gilbert N.C., Bartlett S.G. et al. // Acta Cryst. F. 2007. V. 63. P. 972. <https://doi.org/10.1107/S1744309107050993>
14. Backmark A., Nyblom M., Törnroth-Horsefield S. et al. // Acta Cryst. D. 2008. V. 64. P. 1183. <https://doi.org/10.1107/S090744490802948X>
15. Svetogorov R.D., Dorovatovskii P.V., Lazarenko V.A. // Cryst. Res. Technol. 2020. V. 55. P. 1900184. <https://doi.org/10.1002/crat.201900184>
16. Kabsch W. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 125. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
17. Vagin A., Teplyakov A. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 22. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042589>
18. Winn M.D., Ballard C.C., Cowtan K.D. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 235. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>
19. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 486. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
20. Krissinel E., Henrick K. // J. Mol. Biol. 2007. V. 372. P. 774. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.022>

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 539.26

**AB INITIO-ФОРМА СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ КУКУРБИТ
[8]УРИЛА В РАСТВОРЕ ПО ДАННЫМ МАЛОУГЛОВОГО
РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЙНИЯ**© 2023 г. В. В. Волков^{1,4,*}, В. А. Лившиц^{2,3}, Б. Б. Мешков², В. Е. Асадчиков¹¹Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия²Центр фотохимии РАН ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия³МФТИ “Московский физико-технический институт”, Долгопрудный, Россия⁴Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: vvo@crys.ras.ru, volkicras@mail.ru

Поступила в редакцию 17.07.2023 г.

После доработки 27.07.2023 г.

Принята к публикации 27.07.2023 г.

Проведенные ранее исследования пространственной структуры комплексов гость–хозяин макроциклических кавитандов кукурбитурилов с рядом нитроксильных радикалов методами электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), ЯМР и кристаллографии показали, что в водных растворах с использованием в качестве молекул-гостей ряда нитроксильных радикалов могут возникать упорядоченные агрегаты в форме равностороннего треугольника из трех моноккомплексов гость–хозяин в его вершинах. Получены экспериментальные результаты по малоугловому рентгеновскому рассеянию водных растворов комплексов гость–хозяин кукурбит[8]урилы со стабильным нитроксильным радикалом – протонированным темпоамином и проведено *ab initio*-моделирование на их основе формы агрегатов комплексов, находящихся в естественном состоянии в растворе. При поиске моделей формы агрегатов либо не использовали никакой дополнительной информации об их структуре, либо вводили наличие оси третьего порядка. ЭПР применен в качестве независимого метода исследования агрегации комплексов в растворе. Показано, что форма частиц комплексов при больших концентрациях кавитанда и гостя в водном растворе близка по своим параметрам к равностороннему треугольнику, что согласуется с известными кристаллографическими данными и ЭПР.

DOI: 10.31857/S0023476123600672, EDN: HYULZE

ВВЕДЕНИЕ

Достигнутые успехи в области супрамолекулярной химии во многом обеспечивают нужды смежных областей, особенно таких, как создание новых “умных” материалов с разнообразными управляемыми свойствами. Супрамолекулы представляют собой образования, возникающие за счет ассоциации молекул-компонентов, связанных нековалентными взаимодействиями. В таких комплексах различают “хозяина” – основного структурообразующего компонента и “гостей” – функциональных молекул. Спектр потенциальных гостей и хозяев для создания новых структур чрезвычайно широк. В качестве хозяев могут выступать такие макроциклы, как краун-эфиры, калликсарены, циклодекстрины и кукурбитурилы (СВ). Последние соединения представляют особый интерес из-за совокупности уникальных свойств и считаются одними из наиболее перспективных для применений в нанотехнологии и медицине. Это кавитанды, построенные из гликольуриль-

ных фрагментов (число фрагментов $n = 5–10$), соединенных метиновыми мостиками в жесткую макроциклическую структуру (рис. 1). Число n фигурирует в названиях этих соединений: кукурбит[n]урилы и обозначается СВ[n] или СВ n . Часть соединений из этой серии обладает достаточно хорошей растворимостью в воде, способностью к избирательному связыванию катионных органических соединений, образованию разнообразных архитектур с катионами металлов. Уникальное сочетание гидрофобной жесткой полости, лежащей между двумя ободами (rim), содержащими карбонильные группы, открывает широкие возможности для связывания молекул-гостей в водных растворах и создания большего спектра архитектур по сравнению, например, с циклодекстринами или калликсаренами.

Разнообразие поведения СВ при связывании молекул-гостей привело к большому числу исследований, посвященных инкапсуляции лекарственных молекул, формированию окислитель-

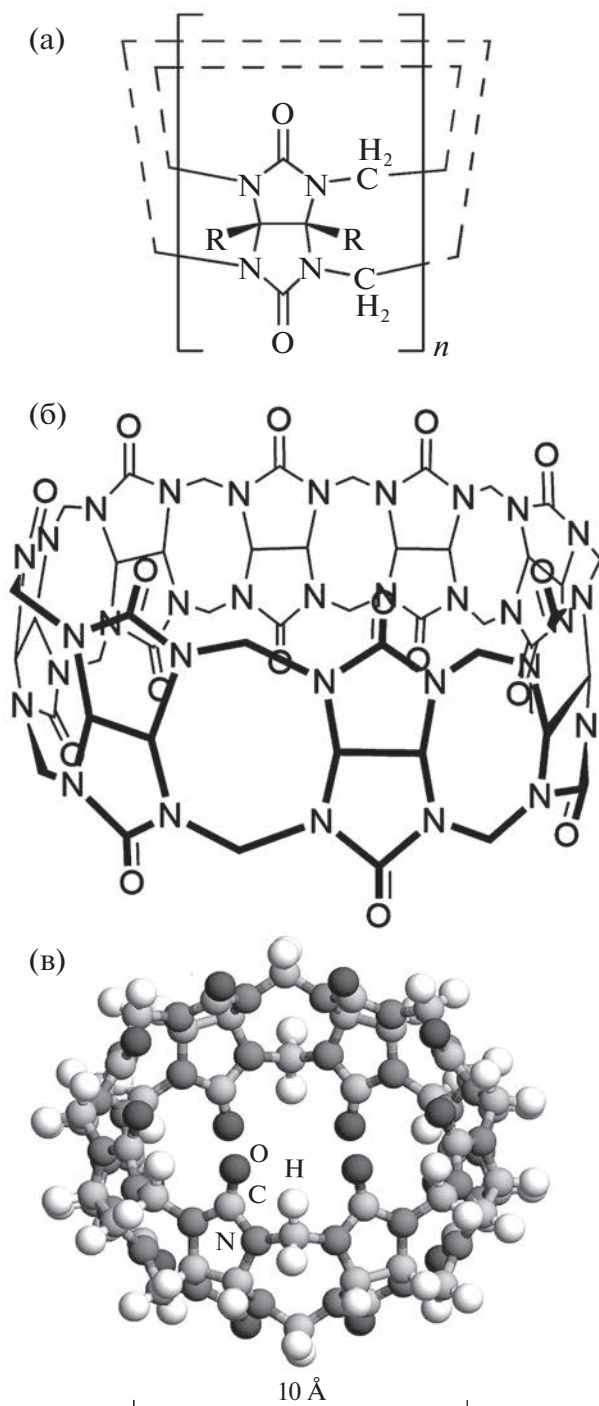


Рис. 1. Схема строения кукурбит [8]урилы: мономерное звено (а), полная структура при числе звеньев $n = 8$ (б), кристаллическая структура (в) по данным [21] (показаны атомы, входящие только в структуру кукурбит [8]урилы).

но-восстановительных везикул и т.д. [1–8]. СВ могут присоединять гостей не только внутри своей полости, но выступать в качестве внешнего структурообразующего элемента в полядных комплексах [9]. Комбинирование полярных и неполярных связей позволяет конструировать ком-

плексы с лекарственными препаратами [10], а добавление к структуре СВ функциональных групп – конструировать комплексы для адресной доставки молекул-гостей [11]. Образование кристаллизующихся комплексов с белками помогает определять структуру некристаллизующихся биомолекул [12–15].

Высокая прочность связывания молекул гостей в комплексах обусловлена несколькими свойствами. Во-первых, это возможность молекул-гостей, особенно положительно заряженных, располагаться близко к порталам, имеющим отрицательный потенциал за счет карбонильных групп, а также вытеснять в процессе связывания в водный объем молекулы воды, которые не могут образовывать стабильные водородные связи в замкнутой наноразмерной полости СВ. Кроме того, существенную роль играют жесткость макроцикла, минимальная потеря энергии сольватации при инкапсуляции, разнообразие комбинаций ион-дипольных взаимодействий положительно заряженных групп.

Кукурбитурил с $n = 6$ был впервые получен в 1905 г. Р. Берендом. Исследования кукурбит[n]урилов (СВ[n]) резко расширились, когда Ким и соавт. [2] сообщили о синтезе основных членов этого семейства с $n = 5–8$; после этого стали появляться и другие работы [16, 17]. Основными методами изучения структуры кукурбитурилов и их комплексов являются спектроскопия (УФ, видимая и ИК), электронный парамагнитный резонанс (ЭПР), ЯМР), электронная микроскопия, а также расчетные методы молекулярной динамики [16, 19, 20].

В [21] удалось получить атомарную структуру макроциклов методом кристаллографии (рис. 1в). Однако взаимодействие макроциклов и комплексов гость–хозяин на их основе в воде остается недостаточно изученным, а ограниченная растворимость в воде по-прежнему является важным недостатком, ограничивающим область их применения.

Комплексы гость–хозяин с кукурбитурилами стали вызывать особый интерес после того, как три группы исследователей [21–23] независимо обнаружили, что в водных растворах комплексов СВ [8] (СВ8) с некоторыми нитроксильными радикалами наряду с обычными триплетными спектрами ЭПР (S3), обусловленными сверхтонким взаимодействием неспаренного электрона со спином ядра азота N^{14} ($I = 1$) NO-группы радикала, наблюдаются спектры ЭПР с семикомпонентной (S7) сверхтонкой структурой (СТС) и распределением интенсивностей компонент 1 : 3 : 6 : 7 : 6 : 3 : 1 с константой сверхтонкого взаимодействия, в 3 раза меньшей величины для свободного радикала в водном растворе ($a_i = a_N/3$). Указанные особенности спектров S7, как

предполагается, свидетельствуют об образовании упорядоченных агрегатов, состоящих из трех комплексов гость–хозяин, по-видимому, образующих равносторонний треугольник, и делокализации неспаренных электронов по трем атомам азота NO-групп комплексов в результате спин-обменного взаимодействия. В обзоре [24] приведены примеры комплексов гость–хозяин для других нитроксильных радикалов с СВ8, способных к агрегации, при которой также наблюдаются спектры S7.

В [25] впервые получены тройные комплексы гость–хозяин из СВ8 в качестве молекулы-хозяина и двух молекул-гостей — нитроксильных радикалов различной структуры и биологически важных аминокислот и ароматических соединений в качестве аналитов. Для характеристики связывания гостей использованы параметры полярности окружения и вращательной подвижности спиновых зондов. Показано, что эти параметры зависят от природы аналитов. Для таких тройных комплексов гость–хозяин наряду с обычными триплетными спектрами ЭПР от нитроксильных зондов (S3) также обнаружены супрамолекулярные ансамбли, состоящие из трех эквивалентных тройных комплексов (“триады”), спектры ЭПР которых имеют семикомпонентную сверхтонкую структуру (S7) (рис. 2). Относительная интенсивность спектров S7 по сравнению со спектрами S3 возрастает с увеличением концентрации NaCl в растворе, а также существенно зависит от природы аналита и радикала.

В [21] методом рентгеноструктурного анализа исследована кристаллическая структура комплекса СВ8 с нитроксильным радикалом 2,2,6,6-тетраметил-4-метокси-пиперидин-1-оксидом в качестве молекулы-гостя. Было показано, что в кристаллической фазе в элементарной ячейке кристалла комплексы гость–хозяин расположены в вершинах равностороннего треугольника с образованием слоев, между которыми находятся молекулы воды. В связи с этим представляет интерес форма агрегатов не только в кристаллах, но и в нативных условиях водного раствора. Метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), как известно, широко используется для структурных исследований макромолекул в растворе [27], однако работы с применением этого метода для изучения агрегации комплексов гость–хозяин в растворах, насколько известно, до сих пор отсутствовали.

Полученные методом ЭПР результаты свидетельствуют о том, что в растворах комплексы СВ8 с некоторыми нитроксильными радикалами существуют в виде высокосимметричных агрегатов из трех мономеров [23]. Задачей настоящей работы было определение морфологии агрегатов из идентичных комплексов СВ8 (в качестве “хозяи-

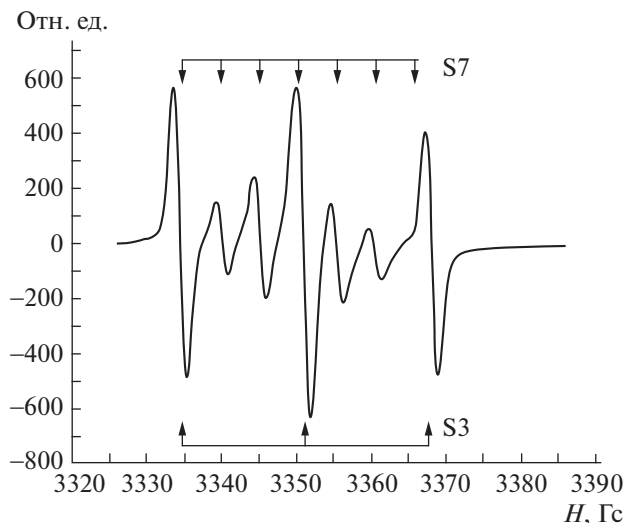


Рис. 2. Спектр ЭПР комплекса СВ8–ТпА (6.6 мМ) в 30 мМ растворе NaCl. По вертикальной оси отложены относительные значения ненормированной интенсивности первой производной от сигнала поглощения.

на”) и нитроксильного радикала — протонированного темпоамина — 2,2,6,6-тетраметил-4-амино-пиперидин-N-оксида (ТпА) в качестве “гостя” (СВ8–ТпА) по данным МУРР. Цель исследования — определение формы наночастиц в растворе без дополнительных предположений об их структуре. ЭПР был применен в качестве независимого метода исследования агрегации комплексов в растворе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы для исследований. Получение концентрированных растворов комплексов СВ8–ТпА. Предварительные оценки показали, что для измерений МУРР на имеющейся лабораторной установке требуются достаточно высокие концентрации комплексов в водном растворе. К сожалению, растворимость СВ8 в воде в обычных условиях недостаточна, чтобы получить необходимую концентрацию комплекса СВ8–ТпА. В [22] было показано, что растворимость СВ8 в воде возрастает в несколько раз, во-первых, при использовании протонированного темпоамина в качестве гостя и, во-вторых, в присутствии достаточно больших концентраций растворенного NaCl. Оработанная нами на основе этих данных методика получения концентрированных растворов комплекса СВ8–ТпА состоит в следующих шагах. Сначала темпоамин (ТА) растворяют в 30 мМ NaCl, pH 5.0, из расчета концентрации 6.6 мМ (1.25 мг/мл), выдерживая 2–3 ч в шейкере при 25°C. При этом аминогруппа молекулы-гостя протонируется с образованием ТпА. Затем добав-

ляют СВ8 8.8 мг/мл (из расчета концентрации 6.6 мМ) при 25°C и выдерживают смесь в шейкере 5–6 ч при 25°C. Через 24 ч мелкую взвесь удаляют центрифугированием при 15000 об./мин в течение 60 мин. Конечные концентрации ТпА и СВ8 в супернатанте составили 6.2 мМ при pH 4.5.

Электронный парамагнитный резонанс. Спектры ЭПР измеряли на спектрометре Bruker ER-200D в стеклянных капиллярах из пирекса с внутренним диаметром 1.2 мм при 294 К с использованием прямоугольного резонатора H_{012} . Частота кванта составляла ~ 9.5 ГГц, постоянное магнитное поле — 3356 Гс, частота магнитной модуляции — 100 кГц. Амплитуда модуляции и мощность СВЧ-поля соответствовали условиям неискаженной регистрации формы спектров ЭПР.

Спектр ЭПР комплекса ТпА–СВ8 в 30 мМ растворе NaCl представлен на рис. 2. Как было отмечено выше, он состоит из суперпозиции двух слагаемых: семикомпонентного спектра S7, обусловленного агрегатами из трех комплексов гость–хозяин, и триплета S3 от свободных радикалов ТпА и одиночных комплексов гость–хозяин. Число компонент S7, равное семи, соответствует суммарному спину ядер N^{14} , равному трем; величина сверхтонкого расщепления (~ 5 Гс) равна примерно одной трети триплетного расщепления S3. Эти параметры позволяют считать, что сигнал S7 принадлежит симметричной структуре из трех эквивалентных комплексов с суммарным спином ядер N^{14} , равным трем, в которой происходит делокализация неспаренного электрона по трем эквивалентным ядрам N^{14} [25].

Малоугловое рентгеновское рассеяние. Для исключения ошибок, связанных с радиационным повреждением образцов кукурбитурилов, чувствительных к ионизирующему излучению, рентгеновские измерения проводили на лабораторной установке малоуглового рассеяния с низкой плотностью потока квантов “АМУР-К” [26] с однокоординатным позиционно-чувствительным детектором ОДЗ-М при фиксированной длине волны излучения $\lambda = 0.1542$ нм (CuK $_{\alpha}$ -линия острофокусной трубки с медным анодом, монохроматор из пиролитического графита) и коллимационной системой Кратки. Сечение рентгеновского пучка составляло 0.2×8 мм, область углов рассеяния соответствовала диапазону значений модуля вектора рассеяния $0.1 < s < 11.0$ нм $^{-1}$ ($|s| = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$, 2θ — угол рассеяния). Плотность потока квантов первичного пучка составляла $\sim 10^7$ квантов/см 2 /с через образец. Растворы помещали в кварцевые капилляры диаметром 1 мм со стенками 10 мкм. Плотность потока рентгеновского пучка $\sim 3 \times 10^7$ квантов/см 2 /с. Время измерений одного образца — 120 мин. Экспериментальные данные нормировали на интен-

сивность падающего пучка, после чего в них вводили поправку на коллимационные искажения. Из данных рассеяния образцами вычитали рассеяние капилляром с водой для компенсации рассеяния от стенок кюветы капилляра, воздуха и остаточной интенсивности первичного пучка. Первичную обработку измерений проводили с помощью программы PRIMUS из пакета программ анализа данных малоуглового рассеяния ATSAS [27].

Радиусы инерции частиц R_g (среднеквадратичное расстояние от центра масс частицы) вычисляли по данным МУРР, используя приближение Гинье $I_{\text{exp}}(s) = I(0)\exp(-s^2 R_g^2/3)$ [28], а также определяли из функции распределения по расстояниям $p(r)$, вычисленной из экспериментальных данных с помощью программы косвенного фурье-преобразования GNOM [27, 29] по соотношению

$$I(s) = 4\pi \int_{r=0}^{\infty} p(r) \frac{\sin(sr)}{sr} dr. \quad (1)$$

Функцию $p(r)$ использовали для определения максимальных размеров растворенных частиц D_{max} и их радиуса инерции R_g как среднеквадратичного расстояния между точками в однородном теле [28]:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^D r^2 p(r) dr}{2 \int_0^D p(r) dr}. \quad (2)$$

В данной работе использовали моделирование структуры частиц с помощью малых сферических объемных элементов (“метод шариков” [31]). Для поиска пространственного расположения объемных элементов применяли программу решения нелинейной задачи наименьших квадратов с помощью глобальной минимизации DAMMINV [30], которая является развитием программы DAMMIN [31], основанной на методе моделирования отжига. Модифицированная программа последовательно находит набор решений при варьировании относительного вклада штрафных членов целевой функции: величины квадратичного отклонения модельной кривой рассеяния от экспериментальной, штрафов за рыхлость и разрыв структуры тела, за отклонение среднего числа контактов шариков от заданного значения и др. Из полученного набора решений отбирают модель, которой соответствует наилучшее соответствие экспериментальным данным по критерию χ^2 . Часть моделей была найдена при условии наличия оси симметрии третьего порядка.

Теоретическое рассеяние от атомных моделей тройного комплекса, в том числе от кристалли-

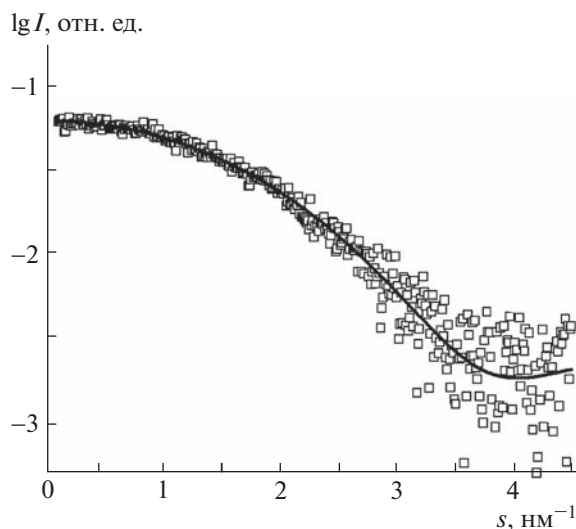


Рис. 3. Малоугловое рассеяние от образца СВ8–ТпА; точки — эксперимент, линия — теоретическое рассеяние от моделей, представленных на рис. 5. Формы кривых рассеяния, рассчитанные для модели с введенной осью третьего порядка (рис. 5б) и без нее (рис. 5а) совпадают на графике.

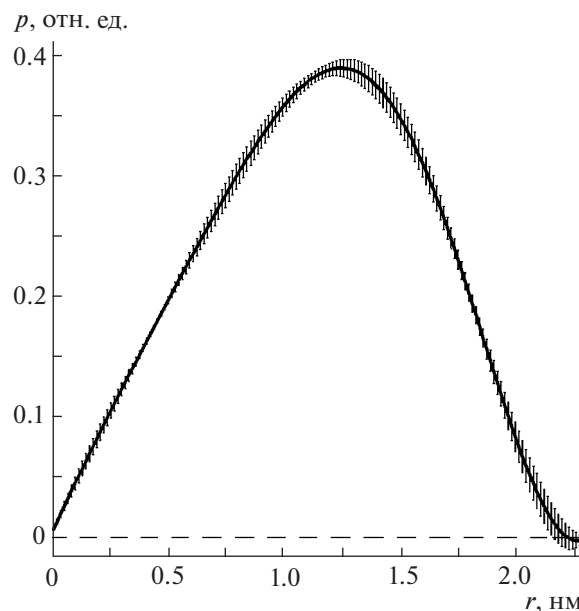


Рис. 4. Функция парных расстояний, рассчитанная по данным малоуглового рассеяния (рис. 3) от образца СВ8–ТпА.

ческой структуры, опубликованной в приложении к работе [21], рассчитывали с помощью программы CRY SOL [32], учитывающей исключенный объем растворителя и наличие гидратной оболочки частиц.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На рис. 3 представлены экспериментальная и теоретическая кривые рассеяния от исследованного образца раствора комплекса, на рис. 4 — рассчитанная по данным рассеяния функция парных расстояний $p(r)$, использованная в качестве входных данных для программы DAMMINV. Теоретическая кривая соответствует найденным моделям формы частиц, показанным на рис. 5а, 5б. Эти кривые практически совпадают и неразличимы на графике. На рис. 5а показано решение, при поиске которого ось симметрии третьего порядка не

вводили, чтобы не навязывать форме частиц ожидаемых свойств. Оказалось, что учет оси третьего порядка в искомой структуре не привел к существенным изменениям формы (рис. 5б). В табл. 1 приведены геометрические параметры найденных моделей и критерии качества совпадения теоретических интенсивностей рассеяния с модельными.

Отметим, что относительный диаметр центрального отверстия в шариковых моделях больше, чем в кристаллической структуре тройного комплекса. Вероятно, это можно связать с тем, что в отличие от атомной модели плотность шариковых моделей постоянна по объему. Формы частиц, определяемые по данным рассеяния, близки к круглым кольцам, но имеют практически одинаковый внешний диаметр, близкий к максимальной хорде в атомной модели. Увели-

Таблица 1. Геометрические параметры моделей комплексов

Структура на рис. 5	Исключенный объем, nm^3	Максимальный диаметр, nm	Радиус инерции, nm	χ^2	Учет оси симметрии третьего порядка
а	4.21 ± 0.03	2.20 ± 0.04	0.83 ± 0.03	1.11 ± 0.02	нет
б	4.30 ± 0.03	2.19 ± 0.04	0.83 ± 0.02	1.11 ± 0.02	да
г		2.15	0.85 ± 0.01	1.80 ± 0.02	при построении модели
д	4.92 ± 0.03	2.15	0.85 ± 0.01	1.30 ± 0.02	неприменимо

Примечание. Ошибки в значениях параметров найденных шариковых моделей оценивали по разбросу 20 решений для каждого образца. Для кристаллических моделей радиус инерции был рассчитан как среднеквадратичное расстояние атомов от центра масс с учетом атомного номера. Значения χ^2 рассчитаны по экспериментальным данным. Радиус инерции определен по формуле (2).

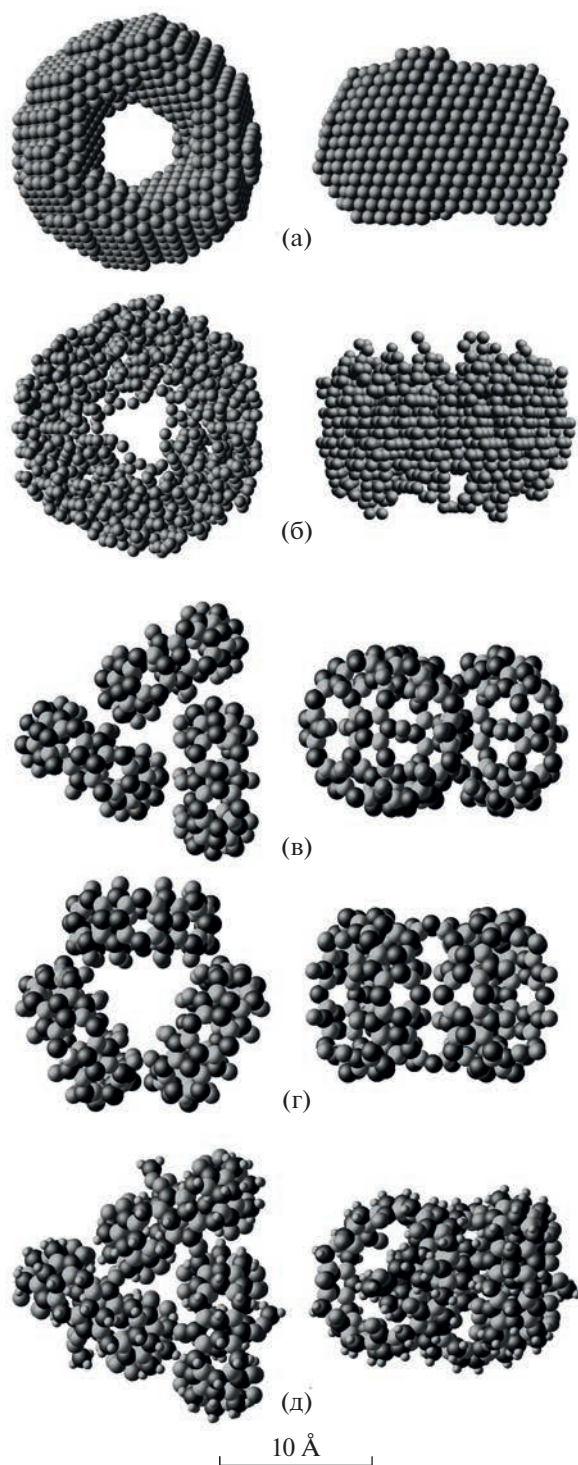


Рис. 5. Шариковые модели комплексов, найденные по данным рассеяния с помощью программы DAMMINV от образца CB8–TpA: а – без дополнительных ограничений, б – с введенной осью симметрии третьего порядка, в – структура тройного комплекса CB8 по данным [21] (показаны атомы, входящие только в структуру CB8, без молекулы “гостя”), г – гипотетическая круглая модель агрегата CB8, д – полная кристаллическая структура тройного комплекса CB8–TpA по данным [21] вместе с молекулами ассоциированной воды. Структуры справа повернуты на 90° относительно горизонтальной оси.

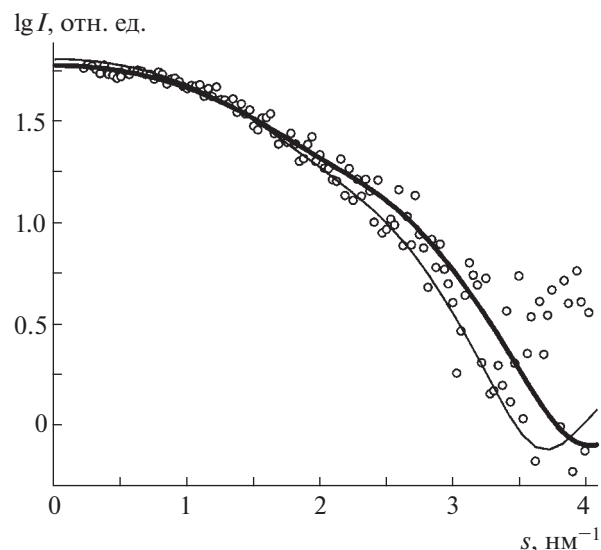


Рис. 6. Сравнение теоретических интенсивностей рассеяния от атомных моделей (линии) с экспериментальными данными (точки). Жирная линия – рассеяние от кристаллической модели на рис. 5д, тонкая линия – от круглой модели рис. 5г. Рассеяние от модели рис. 5в на рисунке неотличимо от 5г.

чить диаметр отверстия в структуре можно было бы, предположив “круглую” модель агрегата (рис. 5г), которая кажется ближе к шариковым моделям. Эту модель делали вручную с помощью программы MASSHA из пакета ATSAS, располагая кольца мономеров таким образом, чтобы получить максимально число возможных водородных связей между ними. Ошибка в относительном расположении мономеров предположительно не превышает 0.5 нм и не должна заметно влиять на форму теоретической кривой МУРР. Из рис. 6 видно, что круглая модель хуже аппроксимирует данные эксперимента, несмотря на близкий радиус инерции.

Объемы моделей, как и форма частиц, рассчитываются независимо от абсолютной величины интенсивностей и определяются только формой всей кривой рассеяния. Так как интенсивность рассеяния рентгеновских лучей определяется контрастом электронной плотности, то в водных растворах определяемые размеры частиц оказываются больше их “сухого” размера из-за двух эффектов. Первый из них – вытеснение молекул воды структурой с образованием полостей на границе контакта частица–молекула растворителя. Соответствующий объем называют “исключенным”. Второй эффект связан с образованием более плотной по отношению к средней плотности воды водной оболочки частицы, которая имеет эффективную толщину 0.15–0.2 нм. Эти эффекты рассмотрены в [32]. Соответственно рассеяние от атомных моделей было рассчитано с учетом этих

эффектов. Исключенный объем для кристаллической модели оказался больше объема шариковых моделей примерно на 16% (табл. 1). Вероятно, это связано с различиями в пространственной упаковке атомов в кристаллической структуре и шариков в моделях формы, и это различие оказывается существенным при малых размерах частиц. Данное расхождение требует дополнительного исследования.

Отметим, что недостаточно хорошее согласие экспериментальных и расчетных кривых рассеяния (1.80 ± 0.02 , 1.30 ± 0.02) может быть обусловлено примесями агрегатов другой формы. Подобное явление наблюдалось в результате моделирования спектров ЭПР комплексов гость–хозяин СВ8 с 2,2,6,6-тетраметил-4-метокси-пиперидин-1-оксидом, близким аналогом радикалов ТА и ТПА [21]. Так как на форму кривой рассеяния должны влиять частицы с размерами, сравнимыми с размерами агрегатов, т.е. мономеры и димеры (агрегаты больших размеров, чем тройные комплексы в растворе отсутствуют, в противном случае их наличие заметно увеличило бы максимальный размер на графике функции парных расстояний), был проведен численный эксперимент по определению долей таких примесных частиц по данным рассеяния с помощью программы OLIGOMER [33]. Данная программа подгоняет интенсивность рассеяния от образца суперпозицией теоретических кривых, рассчитанных от структурных моделей агрегатов, определяя относительные концентрации компонентов смеси. Для структуры димера использовали модель, составленную из двух мономеров “в стопку”. Расчет теоретических кривых рассеяния проводили с помощью программы CRYSDOL, как описано выше. Полученные доли компонентов составляли (тример–димер–мономер): 0.97 ± 0.02 – 0.00 – 0.03 ± 0.02 . Малая доля мономеров в растворе согласуется со спектром ЭПР: интенсивность линий септета S7 относительно триплета в проведенном эксперименте значительно выше, чем в данных, приведенных в [21], где предполагалось наличие заметного количества примесных агрегатов другой формы по сравнению с тримерными агрегатами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные методом МУРР от растворов, по типу формы (кольцо, аппроксимирующее треугольный агрегат) и размерным параметрам относительно неплохо соответствуют значениям, опубликованным для тримеров треугольной формы, образованных из монокомплексов гость–хозяин СВ8 с 2,2,6,6-тетраметил-4-метокси-пиперидин-1-оксидом в [21]. Необъясненным остается отличие в исключенных объемах. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии

неупорядоченной агрегации монокомплексов СВ8–ТПА при относительно высоких концентрациях СВ8 и ТПА в воде. Это дает основание считать, что создаваемые на основе комплексов “гость–хозяин” тримерные супрамолекулярные конструкции СВ8 с функциональными молекулами будут достаточно детерминированными и стабильными по структуре.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН в части развития библиотеки подпрограмм общего назначения. Измерения рентгеновского рассеяния выполнены на оборудовании ЦКП ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект RFMEFI62119X0035).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee J.W., Samal S., Selvapalam N. et al. // *Acc. Chem. Res.* 2003. V. 36. № 8. P. 621.
<https://doi.org/10.1021/ar020254k>
2. Kim J., Jung In-Sun, Kim Soo-Young et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. V. 122. № 3. P. 540.
<https://doi.org/10.1021/ja993376p>
3. Gerasko O.A., Samsonenko D.G., Fedin V.P. // *Russian Chemical Reviews.* 2002. V. 71. № 9. P. 741.
<https://doi.org/10.1070/RC2002v071n09ABEH000748>
4. Huang Z., Ke Qin, Geng Deng et al. // *Langmuir.* 2016. V. 32. P. 12352.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01709>
5. Liu S., Ruspic C., Mukhopadhyay P. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 15959.
<https://doi.org/10.1021/ja055013x>
6. Kim K., Selvapalam N., Young Ho Ko et al. // *Chem. Soc. Rev.* 2007. V. 36. P. 267.
<https://doi.org/10.1039/b603088m>
7. Gonzalez C.A.M. Cucurbiturils as Molecular Containers: The Mechanism of Complexation of Small Guests, the Effects of the Inclusion on their Photophysical Properties, and Potential Applications. PhD Thesis. Bremen: International University Bremen, 2003. 161 p.
<https://d-nb.info/1035266601/34>
8. Hang Conga H., Qian-Jiang Zhua, Sai-Feng Xuea et al. // *Chin. Sci. Bull.* 2010. V. 55. P. 3633.
<https://doi.org/10.1007/s11434-010-4146-8>
9. Lagona J., Mukhopadhyay O., Chakrabarti S., Isaacs L. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005. V. 44. P. 4844.
<https://doi.org/10.1002/anie.200460675>
10. Walker S., Oun R., McInnes F.J., Wheate N.J. // *Isr. J. Chem.* 2011. V. 5–6. P. 616.
<https://doi.org/10.1002/ijch.201100033>
11. Assaf K.I., Florea M., Antony J. et al. // *J. Phys. Chem. B.* 2017. V. 121. № 49. P. 11144.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b09175>
12. Dang D.T. // *Front Chem.* 2022. V. 10. 829312.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2022.829312>
13. Di Costanzo L., Geremia S. // *Molecules.* 2020. V. 25. 3555.
<https://doi.org/10.3389/10.3390/molecules25153555>

14. Dang D.T., Bosmans R.P.G., Moitzi C. et al. // Org. Biomol. Chem. 2014. V. 12. P. 9341.
<https://doi.org/10.1039/c4ob01729c>
15. De Oliveira O.V., da Silva Gonçalves A., de Almeida N.E.C. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2021.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1932600>
16. Zhang S. Synthesis of Mono-Functionalized Cucurbit[n]urils and Exploration of their Applications. PhD thesis. Jacobs Univ., Department of Life Sciences and Chemistry. 2019. 124 p.
<https://d-nb.info/1190888130/34>
17. Day A., Arnold A.P., Blanch R.J., Snushall B. // J. Org. Chem. 2001. V. 66. P. 8094.
<https://doi.org/10.1021/jo015897c>
18. Wheate N.J., Kumar P.G.A., Torres A.M. et al. // J. Phys. Chem. B. 2008. V. 112. P. 2311.
<https://doi.org/10.1021/jp709847p>
19. Biedermann F., Vendruscolo M., Scherman O.A. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2013. V. 135. P. 14879.
<https://doi.org/10.1021/ja407951x>
20. Bardelang D., Udachin K.A., Leek D.M. et al. // Cryst. Growth Des. 2011. V. 11. P. 5598.
<https://doi.org/10.1021/cg201173j>
21. Bardelang D., Banaszak K., Karoui H. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 13. P. 5402.
<https://doi.org/10.1021>
22. Mileo E., Mezzina E., Grepioni F. et al. // Chem. Eur. J. 2009. V. 15. P. 7859.
<https://doi.org/10.1002/chem.200802647>
23. Jayaraj N., Porel M., Ottaviani M.F. et al. // Langmuir. 2009. V. 25. P. 13820.
<https://doi.org/10.1021/la9020806>
24. Ouari O., Bardelang D. // Isr. J. Chem. 2018. V. 58.
<https://doi.org/10.1002/ijch.201700115>
25. Лившиц В.А., Мешков Б.Б., Габидинова Р.Ф. и др. // Химия высоких энергий. 2018. Т. 52. С. 140.
<https://doi.org/10.7868/S0023119718020096>
26. Могилевский Л.Ю., Дембо А.Т., Свергун Д.И., Фейгин Л.А. // Кристаллография. 1984. Т. 29. Вып. 3. С. 587.
27. Manalastas-Cantos K., Konarev P.V., Hajizadeh N.R. et al. // J. Appl. Cryst. 2021. V. 54. P. 343.
<https://doi.org/10.1107/S1600576720013412>
28. Feigin L.A., Svergun D.I. Structure Analysis by Small-Angle X-ray and Neutron Scattering. New York: Plenum Press, 1987. 321 p.
29. Svergun D.I. // J. Appl. Cryst. 1992. V. 25. P. 495.
<https://doi.org/10.1107/S0021889892001663>
30. Волков В.В. // Кристаллография. 2021. Т. 66. № 5. С. 796.
<https://doi.org/10.31857/S0023476121050234>
31. Svergun D.I. // Biophys. J. 1999. V. 76. P. 2879.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77443-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77443-6)
32. Svergun D. // J. Appl. Cryst. 1995. V. 28. P. 768.
<https://doi.org/10.1107/S0021889895007047>
33. Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V. et al. // J. Appl. Cryst. 2003. V. 36. P. 1277.
<https://doi.org/10.1107/S0021889803012779>

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.55

ВЛИЯНИЕ МИКРОГРАВИТАЦИИ НА КРИСТАЛЛИЗАЦИЮ
КАРДИОТОКСИНА ИЗ ЯДА ОЧКОВОЙ КОБРЫ *Naja naja*© 2023 г. К. М. Дубова^{1,2}, П. В. Дубовский³, Ю. Н. Уткин³, В. Р. Самыгина^{1,2,*}¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

*E-mail: lera@crys.ras.ru

Поступила в редакцию 07.07.2023 г.

После доработки 31.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Кардиотоксины, относящиеся к семейству трехпетельных токсинов, — основные компоненты яда кобр, проявляющие различные виды биологической активности, включая антимикробную и цитотоксическую, в отношении раковых клеток. Данные о минимальных структурных различиях индивидуальных токсинов необходимы для понимания молекулярных механизмов их действия. Такая информация может быть получена методом рентгеноструктурного анализа высокого разрешения. Исследованы влияние микрогравитации на кристаллическую упаковку и дифракционное качество кристаллов кардиотоксина кобры *Naja naja*. При кристаллизации на Международной космической станции получены кристаллы, позволяющие получить максимально высокое разрешение для структуры данного токсина. Белок кристаллизовался исключительно в гексагональной пространственной группе, тогда как больше половины кристаллов, полученных в лабораторных условиях, принадлежало к ромбической сингонии.

DOI: 10.31857/S0023476123600465, EDN: HZBNYG

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время неуклонно растет интерес к мембраноактивным полипептидным токсинам из ядов змей и насекомых. Такие токсины обладают антимикробной и цитотоксической активностью в отношении раковых клеток и поэтому привлекают как основа для создания новых лекарственных соединений [1]. Мишенью действия этих токсинов является плазматическая мембрана бактериальных и раковых клеток, что значительно затрудняет выработку у таких клеток устойчивости к ним. Для рационального конструирования новых антибиотиков и цитостатиков необходимы данные о структуре самих токсинов в водной, модельной мембранной среде и кристалле. Если для токсинов из яда пауков и насекомых в этом направлении сделано довольно много, то для кардиотоксинов из яда кобр имеющейся информации явно не достаточно [2]. Это определяется структурными особенностями рассматриваемых токсинов. Токсины из яда пауков и насекомых, как правило, разупорядочены в водном растворе, а при взаимодействии с мембраной формируют α -спирали и/или их комбинации. Кардиотоксины представляют собой низкомолекулярные (6.5–7 кДа), высокоосновные (pI 8–10)

белки. Этот класс токсинов встречается в ядах змей рода *Naja* (настоящие кобры) [3] и монотипического рода *Hemachatus* (ошейниковая кобра) [4]. Кардиотоксины — наиболее распространенные компоненты яда кобр, относятся к семейству трехпетельных токсинов, одному из основных семейств токсинов змей [5]. Трехпетельная структура кардиотоксинов сформирована полипептидной цепью, уложенной в три петли, выходящие из небольшой глобулярной части. Петля I включает в себя остатки от 1 до 15, петля II — от 20 до 39, петля III — от 44 до 54, а остальные аминокислоты составляют глобулярную часть (рис. 1). Концы петель I–III содержат в основном гидрофобные остатки, придающие молекуле амфифильные свойства: гидрофобная область петель I–III окружена поясом заряженных остатков, в основном лизинов [6]. Вторичная структура кардиотоксина представляет собой пять антипараллельных β -листов, которые выстраиваются в двухцепочечный домен (состоящий из листов I и II) и трехцепочечный домен (состоящий из листов III, IV и V) [7]. Консервативными элементами в их пространственной структуре являются четыре дисульфидные связи и восемь формирующих их остатков цистеина [5].

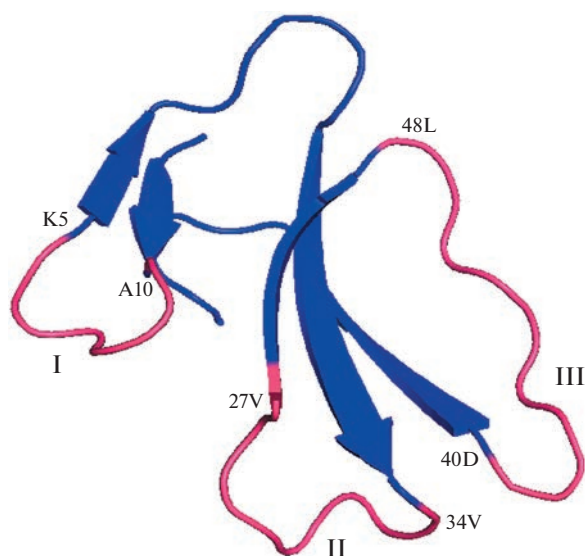


Рис. 1. Общая структура трехпетельного токсина (pdb 7QFC).

На основании различия связывания с фосфолипидами кардиотоксины разделены на Р- и S-типы [8]. Они имеют консервативные остатки пролина и серина в положениях 30 и 28 в первичной структуре соответственно, т.е. в оконечности второй петли молекулы. Если в окончании петли I кардиотоксинов присутствует только один остаток пролина (Pro-8), то оба типа взаимодействуют с анионными фосфолипидами, Р-тип проявляет активность также к цвиттер-ионным фосфолипидам [9]. Структура кардиотоксина S-типа СТ13 из *Naja naja* (СТ13Nn) определена [10] в двух кристаллических формах, орторомбической и гексагональной. Сравнительный анализ этих структур позволил установить важные конформационные особенности функциональных петель I и II токсина СТ13Nn [10]. Благодаря этим двум структурам удалось впервые выявить в кристалле конфигурацию петли II в так называемой мембранносвязанной форме. Исследованная гексагональная кристаллическая форма получена в условиях микрогравитации [10].

Ранее было показано, что кристаллизация в условиях микрогравитации может приводить к изменению кристаллической упаковки белков в кристаллах [11–13], увеличению размеров кристаллов, уменьшению мозаичности и в ряде случаев повышению разрешения [14, 15], что важно для точности структурного анализа. В настоящей работе показано, что микрогравитация улучшает дифракционное качество и влияет на кристаллическую упаковку кристаллов СТ13Nn.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и кристаллизация кардиотоксина. Токсин выделен из яда кобры *Naja naja* и очищен, как описано в [10]. Подбор условий кристаллизации токсина проводили методом диффузии в парах в варианте сидячей капли. Капли получали смешиванием 1 мкл белка (10 мг/мл) с 1 мкл резервуарного раствора. Объем резервуарного раствора составлял 120 мкл. Для поиска условий использовали кристаллизационные наборы Crystal Screen HR2-110, Crystal Screen HR2-112 (Hampton Research, США). Для скрининга использовали планшеты Intelli-Plate 48-3 (Hampton Research, США). Начальные условия оптимизировали путем варьирования добавок, pH, природы буфера. Наилучшие кристаллы были получены в 1.7 М хлориде натрия, 0.1 М дигидрофосфате натрия, 0.1 М дигидрофосфате калия в 0.1 М MES, pH 5.5, в течение 2–3 дней при комнатной температуре.

Затем найденные условия оптимизировали и адаптировали к методу встречной диффузии [16] путем варьирования концентраций белка и осадителя. Оптимизация при переходе к методу встречной диффузии заключалась в повышении концентрации белка до 15 мг/мл. Кристаллы были выращены в невесомости в стеклянных капиллярах с внутренним диаметром 0.5 мм в ходе российско-японского эксперимента с использованием оборудования PCRf [16–18] японского аэрокосмического агентства JAXA на борту Международной космической станции (МКС) с использованием российских космических кораблей.

Сбор и анализ дифракционных данных, анализ наборов данных, кристаллической упаковки. Сбор дифракционных данных проводили на синхротроне SPring-8, станция BLXU40 и Petra III, станция P14 Германия. Данные обрабатывали с использованием программ XDS [19] и Aimless [20]. Сбор данных проводили при 100 К, кристаллы предварительно вымачивали в криорастворе, содержащем компоненты соответствующего кристаллизационного раствора и 20% глицерина. Анализ кристаллической упаковки провели с помощью программ CCP4 [21] и PyMol [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кристаллы токсина СТ13Nn были выращены в лаборатории методами диффузии в парах и встречной диффузии и на МКС методом встречной диффузии до размера 0.1 мм (рис. 2). Увеличить размер кристаллов и снизить их количество не удалось путем варьирования концентрации осадителя. Таким образом, размеры кристаллов, выращенных на земле и в условиях микрогравитации, не отличались. Для кристаллов СТ13Nn получены две кристаллические формы. В отличие

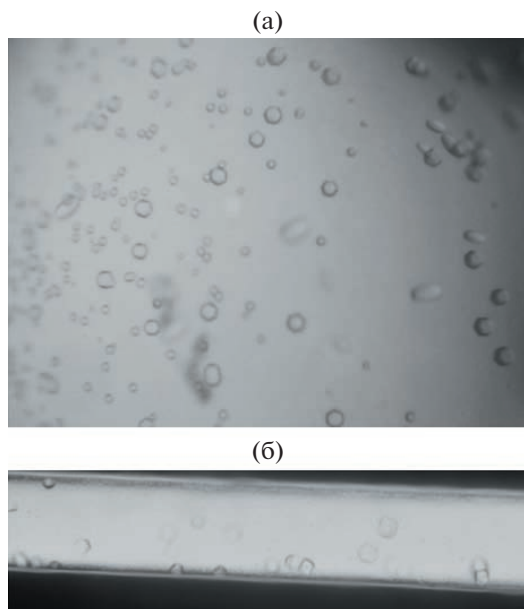


Рис. 2. Кристаллы кардиотоксина S-типа из яда *Naja naja* в кристаллизационной капле (а) и капилляре (б), выращенные в условиях микрогравитации.

от множества кристаллографических исследований гомологичных кардиотоксинов, которые были закристаллизованы с одной полипептидной цепью в независимой части, кристаллы СТ13Np получены в пр. гр. $P6_422$ с тремя субъединицами в независимой части и в пр. гр. $C222_1$ с шестью субъединицами в независимой части [10]. Кристаллические упаковки показаны на рис. 3.

Анализ показал, что все кристаллы, полученные в условиях микрогравитации, принадлежат к

гексагональной пространственной группе. Кристаллическая орторомбическая форма была получена только для кристаллов, выращенных на Земле в четырех случаях, как методом диффузии в парах, так и методом встречной диффузии. Анализировали пространственное разрешение, до которого рассеивали кристаллы, параметры ячейки и мозаичность. Критерием предела разрешения являлось значение $I/\sigma(I)$ не менее 1.5. Дифракционное качество кристаллов, выращенных в условиях микрогравитации, было выше, чем для кристаллов, полученных на Земле. Некоторые исследователи связывают более низкое содержание растворителя в ячейке с более высоким разрешением. Содержание растворителя составляло 65.36% (коэффициент Мэттьюса $3.55 \text{ \AA}^3/\text{Да}$) для орторомбической пространственной группы и 78.97% (коэффициент Мэттьюса $5.84 \text{ \AA}^3/\text{Да}$) для гексагональной. Таким образом, в данном случае гексагональная форма имеет более высокое разрешение, несмотря на более высокое содержание растворителя. Вместе с тем более высокое содержание растворителя в ячейке часто встречается при высокой симметрии [23].

Для сравнения дифракционного качества кристаллов, выращенных на Земле и на МКС, протестировали семь кристаллов, выращенных методом встречной диффузии или диффузией в парах в лабораторных условиях, и пять кристаллов, выращенных методом встречной диффузии на МКС (табл. 1).

Анализ показал, что обе формы имеют низкую мозаичность. Гексагональная форма образуется как в наземных условиях, так и в условиях микрогравитации. Случаев кристаллизации кардиотоксина СТ13Nh в условиях микрогравитации в ор-

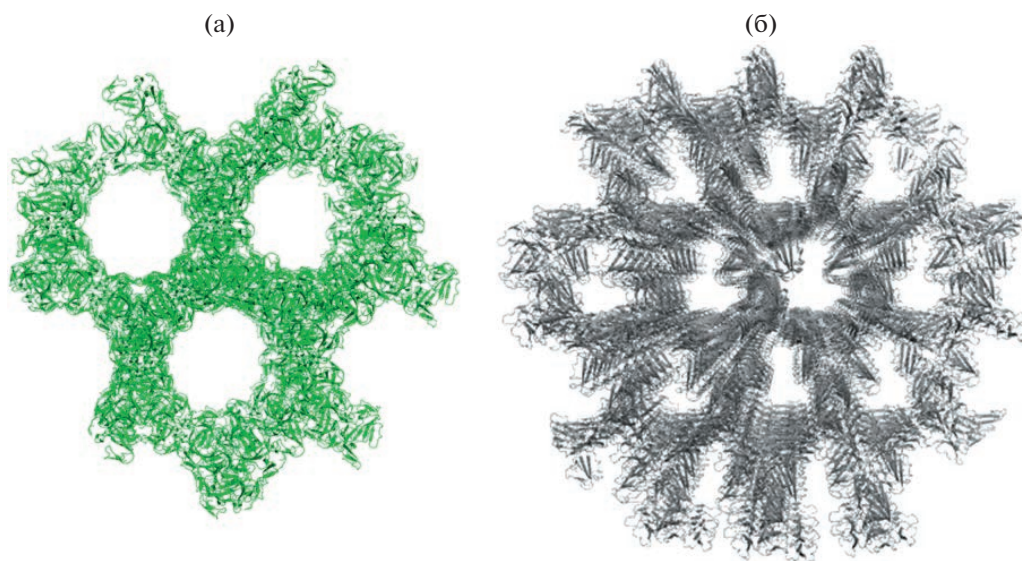


Рис. 3. Кристаллическая упаковка молекул CN13Np: а — гексагональная, б — орторомбическая.

Таблица 1. Характеристики кристаллов СТ13Nn

Пр. гр.	Разрешение, Å	<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , Å	Мозаичность, град	<i>I</i> /sig(<i>I</i>)	Метод кристаллизации
<i>C</i> 222 ₁	2.6	86.68, 96.86, 130.37	0.1	1.6	1
<i>C</i> 222 ₁	2.6	88.76, 97.17, 132.12	0.09	1.8**	2
<i>C</i> 222 ₁	2.76	88.74, 97.09, 131.64	0.07	1.73	2
<i>C</i> 222 ₁	2.65	88.79, 97.19, 131.73	0.1	1.5	2
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.6	109.41, 109.41, 135.86	0.19	1.5	2
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.6	109.36, 109.36, 135.86	0.2	1.7	1
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.73	109.35, 109.35, 135.79	0.18	1.8	1
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.3	109.33, 109.33, 135.77	0.12	2.3**	2*
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.3	109.35, 109.35, 135.69	0.14	2.0	2*
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.35	109.36, 109.36, 135.81	0.13	2.1	2*
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.4	109.34, 109.34, 135.73	0.15	1.9	2*
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.45	109.30, 109.30, 135.81	0.17	1.96	2*

Примечание. Метод кристаллизации: 1 — диффузия в парах, 2 — встречная диффузия; * — кристаллы выращены на МКС.

** Кристаллы, с использованием которых были решены пространственные структуры в [10].

торомбической пространственной группе не обнаружено. Дифракционное качество кристаллов выше при использовании микрогравитации.

Случаи влияния микрогравитации на кристаллическую упаковку и дифракционное качество кристаллов описаны в литературе. В основном происходят уменьшение параметров ячейки и повышение разрешения [18]. Для формиатдегидрогиназы из *Arabidopsis thaliana* было установлено, что кристаллы, полученные на земле методом диффузии в парах, принадлежали к пр. гр. *P*2₁2₁2 и рассеивали до разрешения 1.7 Å (pdb code 3NAQ) [24], тогда как кристаллы, выращенные на МКС методом свободной диффузии, относились к тетрагональной сингонии и дифрагировали до 1.22 Å (pdb code 3JTM) [12]. Использование микрогравитации для кристаллизации позволило улучшить разрешение для таких белков, как фактор ингибирования миграции макрофагов, уридинфосфоорилаза, простагландин D синтеза и T1 липаза, до атомного или околоатомного разрешения [15, 25–27].

В настоящей работе показано, что в условиях микрогравитации кардиотоксин СТ13Nn кристаллизуется в более высокосимметричной кристаллической форме и образует кристаллы, рассеивающие до более высокого разрешения. От пространственного разрешения зависит детальность и точность результатов анализа структур. Таким образом, в случае кардиотоксина использование микрогравитации является предпочтительным для получения высококачественных кристаллов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН (в части анализа дифракционного качества

кристаллов) и в рамках Федеральной космической программы 2016–2025 гг. (ОКР “МКС (Наука)” (в части кристаллизации кардиотоксина).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khalil A., Elesawy B.H., Ali T.M. et al. // *Molecules*. 2021. V. 26. P. 4941. <https://doi.org/10.3390/molecules26164941>
2. Dubovskii P.V., Efremov R.G. // *Expert Rev. Proteomics*. 2018. V. 15. P. 873. <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1537786>
3. Kalita B., Utkin Y.N., Mukherjee A.K. // *Toxins (Basel)*. 2022. V. 14. P. 839. <https://doi.org/10.3390/toxins14120839>
4. Joubert F.J. // *Eur. J. Biochem.* 1977. V. 74. P. 387. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11403.x>
5. Gayatri S., Gorai B., Sivaraman T. // *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2016. V. 7. P. 936.
6. Konshina A.G., Dubovskii P.V., Efremov R.G. // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2012. V. 13 (6). P. 570.
7. Дубовский П.В., Уткин Ю.Н. // *Acta Naturae*. 2014. T. 6. № 3. С. 12.
8. Chien K.Y., Chiang C.M., Hseu Y.C. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 14473.
9. Dubovskii P.V., Ignatova A.A., Alekseeva A.S. // *Toxins*. 2022. V. 15. P. 6. <https://doi.org/10.3390/toxins15010006>
10. Dubovskii P.V., Dubova K.M., Bourenkov G. et al. // *Toxins*. 2022. V. 14. P. 149. <https://doi.org/10.3390/toxins14020149>
11. Luna A., Meisel J., Hsu K. et al. // *NPJ Microgravity*. 2020. V. 6. P. 12. <https://doi.org/10.1038/s41526-020-0102-3>
12. Shabalín I.G., Serov A.E., Skirgello O.E. et al. // *Crytallography Reports*. 2010. V. 55 P. 806. <https://doi.org/10.1134/S1063774510050159>

13. *Timofeev V., Samygina V.* // Crystals. 2022. V. 13. P. 71. <https://doi.org/10.3390/cryst13010071>
14. *Esposito L., Sica F., Sorrentino G. et al.* // Acta Cryst. D. 1998. V. 54. P. 386. <https://doi.org/10.1107/s0907444997011992>
15. *Dubova K.M., Sokolov A.V., Gorbunov N.P. et al.* // Crystallography Reports. 2018. V. 63. P. 951. <https://doi.org/10.1134/S1063774518060111>
16. *Tanaka H., Inaka K., Sughiyama Sh.* // J. Synchrotron Rad. 2004. V. 11. P. 45. <https://doi.org/10.1107/S0909049503023446>
17. *Takahashi S., Tsurumura T., Aritake K. et al.* // Acta Cryst. F. 2010. V. 66. P. 846. <https://doi.org/10.1107/S1744309110020828>
18. *Boyko K.M., Timofeev V.I., Samygina V.R. et al.* // Crystallography Reports. 2016. V. 61. № 5. P. 718. <https://doi.org/10.1134/S1063774516050059>
19. *Kabsch W.* // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 133. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047374>
20. *Evans P.R., Murshudov G.N.* // Acta Cryst. D. 2013. V. 69. P. 1204. <https://doi.org/10.1107/S0907444913000061>
21. *Agirre J., Atanasova M., Bagdonas H. et al.* // Acta Cryst. D. 2023. V. 79. P. 449. <https://doi.org/10.1107/S2059798323003595>
22. *Schrödinger L., DeLano W.* 2020. PyMOL. <http://www.pymol.org/pymol>
23. *Chruszcz M., Potrzebowski W., Zimmerman M.D. et al.* // Protein Sci. 2008. V. 17. P. 623. <http://www.protein-science.org/cgi/doi/10.1110/ps.073360508>
24. *Shabalin I.G., Tikhonova T.V., Polyakov K.M. et al.* // EMBL Annual. 2007. Rep. 2. P. 109.
25. *Eistrikh-Heller P.A., Rubinsky S.V., Samygina V.R. et al.* // Crystallography Reports. 2021. V. 66. P. 777. <https://doi.org/10.1134/S1063774521050059>
26. *Inaka K., Takahashi S., Aritake K. et al.* // Cryst. Growth Des. 2011. V. 11. P. 2107. <https://doi.org/10.1021/cg101370v>
27. *Rahman R.N., Ali M.S., Leow T.C. et al.* // Gravitation- al and Space Biology. 2010. V. 23. P. 89.

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

СТРУКТУРА БЕЛКА Hfq ИЗ *Chromobacterium haemolyticum* ВЫЯВИЛА НОВЫЙ ВАРИАНТ РЕГУЛЯЦИИ СВЯЗЫВАНИЯ РНК С БЕЛКОМ

© 2023 г. Н. В. Леконцева¹, А. Д. Никулин^{1,*}

¹Институт белка РАН, Пущино, Россия

*E-mail: nikulin@vega.protres.ru

Поступила в редакцию 27.07.2023 г.

После доработки 27.07.2023 г.

Принята к публикации 28.08.2023 г.

Определена структура белка Hfq из бактерии *Chromobacterium haemolyticum*, формирующая кристаллы в двух различных пространственных группах. В обоих случаях белок имеет характерную четвертичную структуру кольцевого гексамера. Полученная структура показала ранее не описанный вариант взаимодействия С-концевой неструктурированной части Hfq с аминокислотными остатками проксимального РНК-связывающего участка белка. Такой контакт может вносить вклад в регуляцию связывания молекул РНК с белком Hfq.

DOI: 10.31857/S0023476123700339, EDN: FVWDIA

ВВЕДЕНИЕ

Многие бактерии используют малые регуляторные РНК (мРНК) для эффективного отклика на экстремальные внешние воздействия и стрессы [1–3]. Они влияют на синтез многих факторов транскрипции и вирулентности, регулируя уровень трансляции и время жизни мРНК, что приводит к быстрому изменению метаболических процессов в клетках [4–7]. Существует особый класс белков, взаимодействующих с мРНК, расплетающих их вторичную структуру и способствующих взаимодействию мРНК с комплементарными участками мРНК [8–11]. Такие белки имеются как в грамотрицательных бактериях, так и в грамположительных, однако отсутствуют в термофильных и экстремально термофильных бактериях. Благодаря свойству этих белков разрушать вторичную структуру молекул РНК и способствовать приобретению ими необходимых для функционирования конформаций их часто называют РНК-шаперонами.

Наиболее характерным представителем РНК-шаперонов является белок Hfq [12]. Это высококонсервативный белок длиной от 80 до 100 аминокислотных остатков (а.о.), формирующий характерную четвертичную структуру в виде тороидальных гексамеров. Каждый мономер белка состоит из пятипятевого β-бочонка с предшествующей N-концевой α-спиралью. Эта основная часть белка включает в себя ~65 а.о. и составляет консервативный структурный мотив, относящийся к семейству LSM доменов (InterPro IPR005001). Последующие а.о. составляют струк-

турно неупорядоченную неконсервативную С-концевую часть переменной длины (С-концевой домен или СТД). В полученных ранее структурах белков Hfq из различных организмов эта область либо полностью не описана, либо имеет описание только небольшой части. α-fold также характеризует С-концевую часть белка как неструктурированную.

Hfq имеет три области связывания РНК: проксимальную, дистальную и латеральную [12–15]. Проксимальная область белка расположена в центральной поре гексамера со стороны α-спиралей и специфично связывает уридинсодержащие участки мРНК. Дистальная область Hfq расположена с противоположной стороны гексамера и специфически узнает полиадениновые 3'-участки мРНК или AAN-триплеты мРНК. Положительно заряженные латеральные участки связывания РНК на белке Hfq расположены на боковой поверхности каждого мономера в районе петли между N-концевой α-спиралью и первым β-тяжем. Они имеют повышенное сродство к аденин/уридинсодержащим участкам РНК и считаются местом встречи мРНК с комплементарными участками мРНК. В зависимости от пути взаимодействия мРНК с белком Hfq было предложено относить их к двум различным классам [16]. К первому относят мРНК, которые связываются с проксимальным и латеральными участками Hfq уридинсодержащими участками и взаимодействуют с мРНК, связанной с дистальной областью белка. Ко второму классу относят мРНК, для которых необходимо связывание с

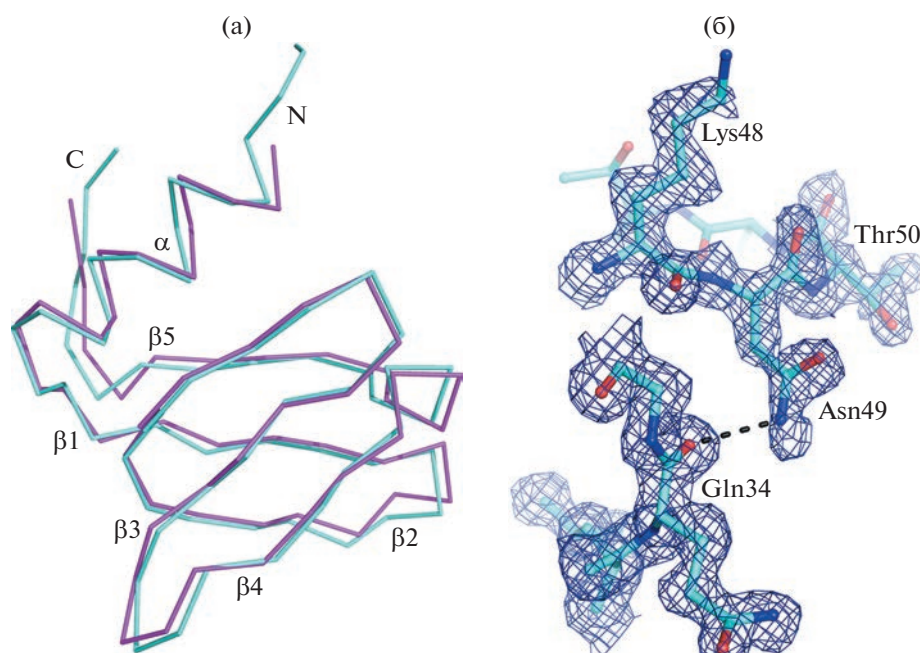


Рис. 1. Ленточное представление структуры мономера белка Hfq из *C. haemolyticum* и наложение на нее структуры мономера белка Hfq из *E. coli* (PDB 6BDG). Обозначены N- и C-концы белков, элементы вторичной структуры (а). Фрагмент участка полипептидной цепи ChaHfq в области аспарагина Asn49 и соответствующая карта электронной плотности $2mFo-DFc$ со срезой 1σ . Водородная связь между атомом азота боковой цепи Asn49 и атомом кислорода главной цепи Gln34 показана пунктирной линией (б).

Pseudomonas aeruginosa (PDB 1U1S) в качестве исходной модели. Асимметричные части ячеек содержали мономер белка (пр. гр. $P6$) или гексамер белка (пр. гр. $P2_12_12_1$). Структуры уточнены с использованием программного комплекса PHENIX. Для проверки возможных погрешностей на структуру определяемого белка за счет влияния расчетных фаз с ориентированной исходной модели белка Hfq использовали карты электронной плотности *Composite Omit Map* с моделируемым отжигом структуры. Ручная правка и модификация модели осуществлялись с помощью программного комплекса COOT [29]. После завершения уточнения структур белка ChaHfq координаты структур и дифракционные данные депонировали в банк данных белковых структур PDB. Статистика сбора данных и кристаллографического уточнения представлена в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Структура белка ChaHfq в пр. гр. $P6$. Благодаря внутренней симметрии шестого порядка гексамер Hfq может кристаллизоваться в пр. гр. $P6$ с одним мономером в асимметричной ячейке. В банке данных PDB имеются 11 депонированных структур белка Hfq из разных организмов (PDB 5SZE, 2YLC, 5I2I, 4MML, 7OG8, 4PNO, 7OGW, 4RCB, 4RCC, 6BDG, 2Y90), имеющих пр. гр. $P6$. В полной ячейке кристалла содер-

жится гексамер, являющийся активной формой белка Hfq.

Мономер белка ChaHfq повторяет структуры гомологичных белков (рис. 1а). В электронную плотность были вписаны а.о. с 5 по 71. Первые четыре N-концевых и четырнадцать C-концевых остатков белка в модели отсутствуют, поскольку имеют высокую подвижность, а соответствующие участки карты электронной плотности не позволяют провести полипептидную цепь. Такое поведение концевых участков Hfq наблюдается во всех известных структурах этого белка, полученных с помощью рентгеноструктурного анализа. Наиболее интересным в структуре ChaHfq является хорошее качество электронной плотности для аспарагина Asn49 (рис. 1б), находящегося в петле между β -тяжами $\beta 3$ и $\beta 4$. Углы ϕ и ψ этого высококонсервативного аспарагина лежат в запрещенной области карты Рамачандрана, причем это характерно для всех известных структур белков Hfq. Исходя из полученной структуры можно предположить, что положение боковой цепи аспарагина фиксируется водородной связью с кислородом карбоксильной группой остатка глутамина Gln34. Других причин, стерических или функциональных, для сохранения Asn49 своей конформации не наблюдается.

Структура белка ChaHfq в пр. гр. $P2_12_12_1$. Асимметричная часть ячейки кристалла белка ChaHfq в этой пространственной группе содержит пол-

Таблица 1. Статистика обработки дифракционных данных и уточнения структур белка Hfq из *Chromobacterium haemolyticum*

	Гексамер в асимметричной части ячейки	Мономер в асимметричной части ячейки
Код PDB	8P9M	8P9I
Длина волны, Å	1.5418	1.5418
Диапазон разрешения, Å	22.2–2.0 (2.1–2.0)	21.1–1.4 (1.45–1.4)
Пр. гр.	$P2_12_12_1$	$P6$
Параметры ячейки, Å; град	$a = 58.5, b = 71.6, c = 96.6;$ $\alpha = \beta = \gamma = 90$	$a = b = 65.1, c = 27.7;$ $\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$
Общее число рефлексов	53 153 (5300)	68 876 (4985)
Уникальных рефлексов	27 718 (2743)	13 424 (1343)
Избыточность	1.9 (1.9)	5.1 (3.7)
Полнота, %	98.4 (99.7)	99.8 (99.6)
Среднее отношение $I/\sigma(I)$	8.2 (0.9)	14.3 (1.6)
В-фактор Вильсона	27.5	7.3
R_{merge}	0.068 (0.76)	0.095 (0.65)
R_{meas}	0.096 (1.07)	0.105 (0.76)
R_{pim}	0.068 (0.76)	0.045 (0.39)
CC1/2	1.0 (0.58)	1.0 (0.48)
CC*	1.0 (0.86)	1.0 (0.80)
Число рефлексов, использованное для расчета R_{free}	1123 (119)	682 (64)
R_{work}	0.22 (0.33)	0.15 (0.22)
R_{free}	0.28 (0.36)	0.19 (0.30)
Число неводородных атомов	3535	661
белка	3281	545
лигандов	6	1
воды	248	115
Среднеквадратичные отклонения		
длин связей, Å	0.008	0.006
валентных углов, град	0.93	0.91
Положение остатков на карте Рамачандрана		
предпочтительные области, %	95.0	97.0
допустимые области, %	3.8	3.0
запрещенные области, %	1.2	0
Средний температурный В-фактор	32.75	9.16
для белка	32.35	7.21
для молекул воды	41.54	18.27

Данные в скобках соответствуют слою наиболее высокого разрешения.

ный гексамер. Структура основной части гексамера аналогична структурам гомологичных белков Hfq (рис. 2). Полученная электронная плотность позволила для большинства мономеров белка описать положение остатков с 5 по 72, а для двух мономеров удалось идентифицировать электронную плотность С-концевой части до 76 (цепь F)

и до 79 остатков (цепь В) из 85. Это так называемые области “С-концевого домена” или STD белка Hfq. Аминокислотные остатки 70–72 цепи F контактируют с остатками 49–50 (область петли $\beta 3$ – $\beta 4$) симметричной молекулы, что фиксирует их положение в ячейке кристалла и позволяет получить интерпретируемую электронную плотность.

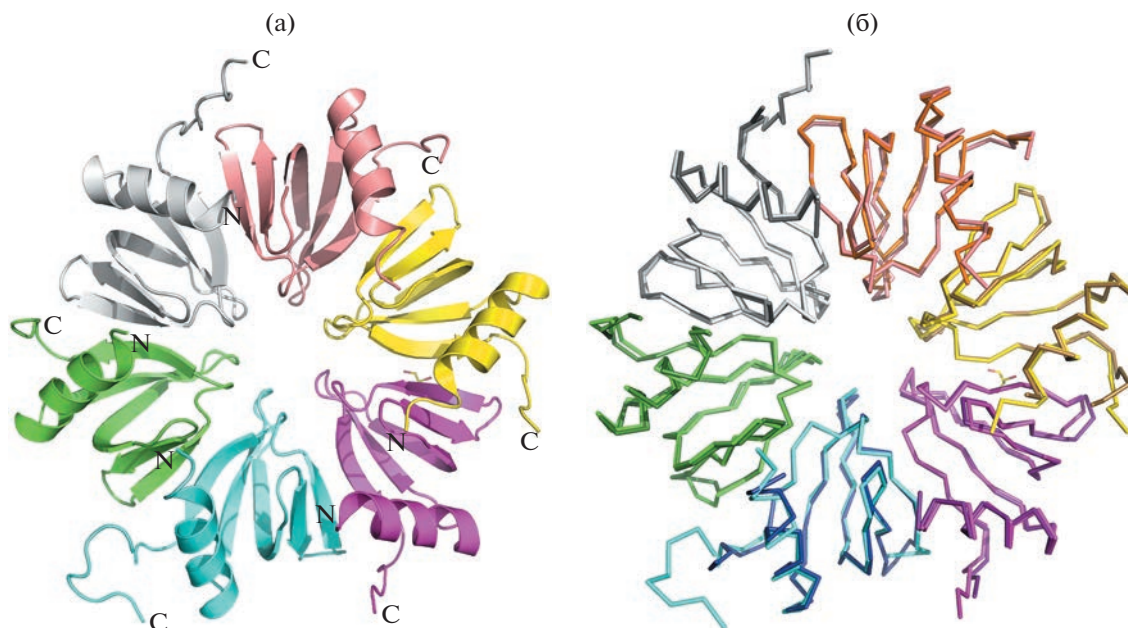


Рис. 2. Схематическое представление гексамера белка Hfq из *C. haemolyticum*. Вид со стороны α -спиралей белка (проксимальной стороны гексамера). Указаны N- и C-концы (а). Наложение главных цепей гексамера белка ChaHfq и гексамера белка Hfq из *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 1U1S) (б).

Аминокислотные остатки С-концевой части цепи В контактируют с проксимальной областью симметричной молекулы белка, что позволило уверенно вписать остатки с 73 по 79 в экспериментальную электронную плотность (рис. 3а). Сравнение полученной структуры со структурами белка Hfq в комплексах с РНК показало, что остатки 73–79 занимают положение олиго(У) РНК в этих комплексах (рис. 3б, 3в). В комплексе Hfq-AU₆A РНК важную роль играет позиционирование оснований нуклеотидов между консервативными остатками тирозина/фенилаланина (Phe42 в Hfq из *E. coli*, Tyr43 в ChaHfq) с образованием их стэкинг-взаимодействия и формирования гидрофобных контактов [30]. В полученной структуре белка ChaHfq аминокислоты Pro72, Pro76 и His74 располагаются между боковыми цепями тирозинов и участвуют в гидрофобных контактах. Вместо стэкинга оснований нуклеотидов с ароматическими боковыми цепями имеют место σ – π -взаимодействия, такие как контакт атома кислорода боковой цепи Gln78 с ароматическим кольцом Tyr43 (рис. 3б). Для комплексов Hfq с РНК характерна развитая сеть водородных связей между боковыми цепями а.о. белка с атомами оснований и сахарофосфатного остова. В случае белка ChaHfq таких контактов всего четыре: между атомами кислорода главной цепи пролина Pro72 и гистидина His75 с боковой цепью глутамина Gln42, между боковой цепью глутамина Gln78 с карбоксильной группой глутамина Gln42 (рис. 3б), а также N ξ атомом Lys79 с кислородом

главной цепи остатка His58. В результате наблюдаемые контакты участка 73–79 ChaHfq не позволяют говорить о его значительном сродстве к проксимальной области белка Hfq, однако положение STD в проксимальном участке белка может составить некоторую конкуренцию связыванию РНК в этой области.

Текущая модель функционирования белка Hfq как регулятора трансляции посредством мРНК основана на одновременном (или последовательном) связывании с белком двух разных РНК: мРНК и мРНК [31]. При этом белок Hfq служит не только местом встречи двух молекул РНК с комплементарными участками, но и способствует разрушению (плавлению) их вторичной структуры, ускоряя формирование нового дуплекса мРНК–мРНК. Для его образования мРНК и мРНК первоначально связываются в разных областях белка — проксимальном и дистальном сайтах Hfq. Известны данные об участии STD белка Hfq из *E. coli* в регуляции связывания мРНК и их взаимодействия с мРНК [18, 19, 32–34]. Так, было показано, что С-концевой домен белка играет роль в специфическом узнавании мРНК белком Hfq и высвобождении сформированного дуплекса мРНК с мРНК, причем как *in vitro*, так и *in vivo* [18, 19]. Предполагается, что STD участвует в дискриминации РНК по специфичности к белку Hfq, контактируя с латеральным участком связывания основной части белка и не позволяя неспецифичным РНК связываться с белком [17]. В такой модели а.о. С-концевой части белка по-

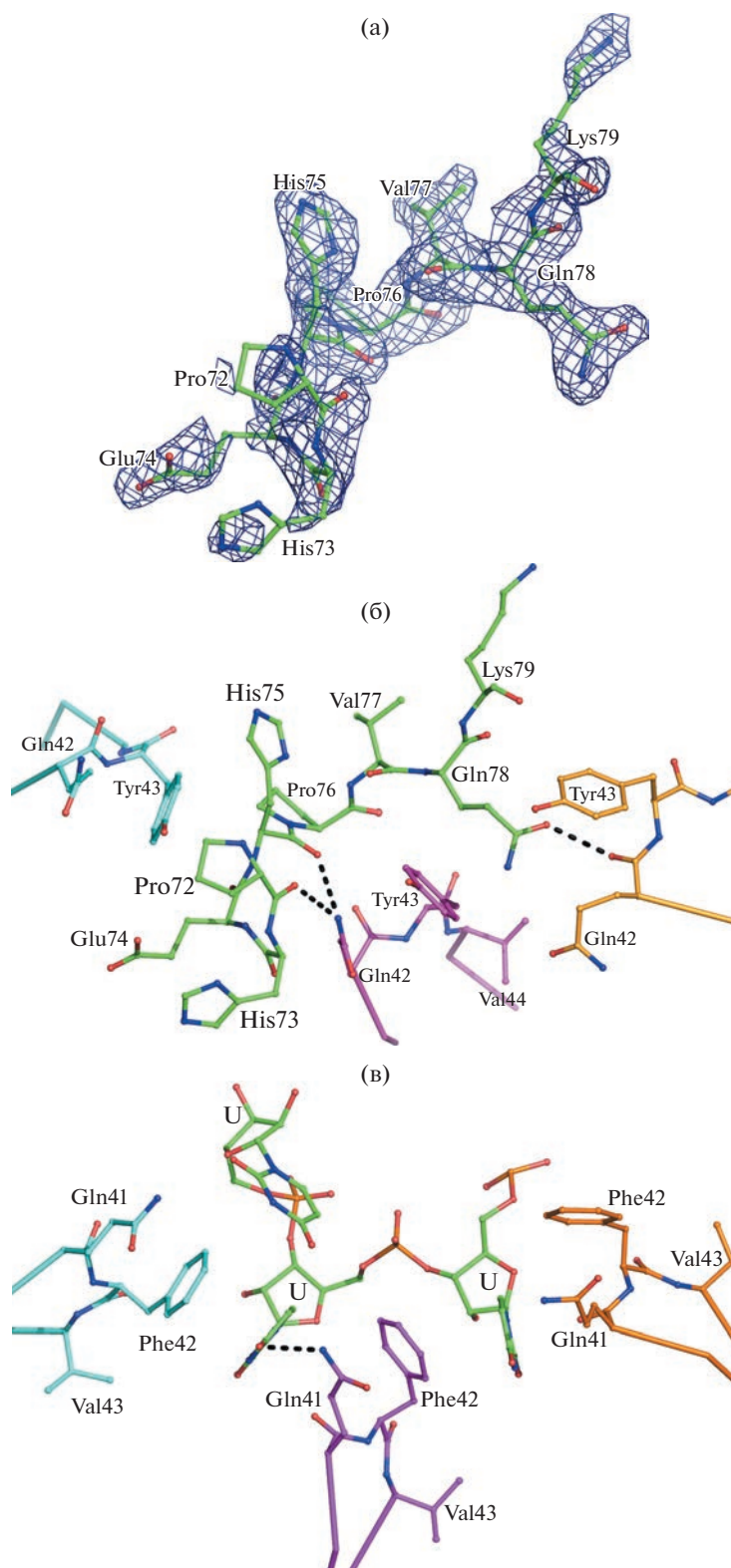


Рис. 3. Участок цепи В белка Hfq из *C. haemolyticum* с 73 по 79 аминокислотный остаток с соответствующим фрагментом карты электронной плотности $2mF_o - DF_c$ со срезкой 1σ (а). Контакты участка 73–79 с аминокислотными остатками симметрично связанной молекулы белка ChaHfq. Водородные связи показаны пунктирными линиями (б). Фрагмент структуры белка Hfq из *E. coli* в комплексе с AU₆A РНК (PDB 3RER). Шаростержневой моделью представлены три уридина из связанной молекулы РНК. Обозначены консервативные а.о. белка глутамин Gln41 (соответствует Gln42 белка ChaHfq), фенилаланин Phe42 (соответствует Tyr43) и валин Val43 (соответствует Val44) белка из *E. coli* (в) (ориентация участков белка Hfq из *E. coli* соответствует структуре ChaHfq панели б).

сле 72 взаимодействуют с остатками латеральной области гексамера и могут закрывать ее от связывания РНК. Структура белка Hfq из *C. haemolyticum* демонстрирует еще один вариант участия STD в регуляции связывания мРНК с белком. Гидрофобные области STD связываются с проксимальным участком белка, имеющим выраженную специфичность к олиго(У)-последовательностям РНК, ингибируя связывание Hfq с неспецифичными РНК. Однако данное предположение строится на полученной нами структуре белка Hfq из *C. haemolyticum* в комбинации с опубликованными ранее данными и требует экспериментальной проверки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (госзадание АААА-А18-118120690135-9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jørgensen M.G., Pettersen J.S., Kallipolitis B.H. // Biochim. Biophys. Acta — Gene Regul. Mech. 2020. V. 1863. P. 194504. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2020.194504>
2. Holmqvist E., Wagner G.H. // Biochem. Soc. Trans. 2017. V. 45. P. 1203. <https://doi.org/10.1042/BST20160363>
3. Dutta T., Srivastava S. // Gene. 2018. V. 656. P. 60. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.02.068>
4. Wagner E.G.H., Romby P. // Adv. Genet. 2015. V. 90. P. 133. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.05.001>
5. Pecoraro V., Rosina A., Polacek N. // Non-Coding RNA. 2022. V. 8. P. 22. <https://doi.org/10.3390/ncrna8020022>
6. Miyakoshi M. et al. // Mol. Microbiol. 2022. V. 117. P. 160. <https://doi.org/10.1111/mmi.14814>
7. Antoine L. et al. // Genes (Basel). 2021. V. 12. P. 1125. <https://doi.org/10.3390/genes12081125>
8. dos Santos R.F., Arraiano C.M., Andrade J.M. // Curr. Genet. 2019. V. 65. P. 1313. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00990-y>
9. Stenum T.S., Holmqvist E. // Mol. Microbiol. 2022. V. 117. P. 4. <https://doi.org/10.1111/mmi.14785>
10. Katsuya-Gaviria K. et al. // RNA Biol. 2022. V. 19. P. 419. <https://doi.org/10.1080/15476286.2022.2048565>
11. Woodson S.A., Panja S., Santiago-Frangos A. // Microbiol. Spectr. / Ed. Storz G., Papenfort K. 2018. V. 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0026-2018>
12. Updegrove T.B., Zhang A., Storz G. // Curr. Opin. Microbiol. 2016. V. 30. P. 133. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.02.003>
13. Murina V., Lekontseva N., Nikulin A. // Acta Cryst. D. 2013. V. 69. P. 1504. <https://doi.org/10.1107/S090744491301010X>
14. Park S. et al. // Elife. 2021. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.7554/eLife.64207>
15. Kavita K., de Mets F., Gottesman S. // Curr. Opin. Microbiol. 2018. V. 42. P. 53. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.014>
16. Schu D.J. et al. // EMBO J. 2015. V. 34. P. 2557. <https://doi.org/10.15252/embj.201591569>
17. Santiago-Frangos A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2019. V. 166. P. 10978. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814428116>
18. Kavita K. et al. // Nucl. Acids Res. 2022. V. 50. P. 1718. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac017>
19. Santiago-Frangos A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2016. V. 113. P. E6089. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613053113>
20. Han X.Y., Han F.S., Segal J. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 1398. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.64681-0>
21. Lima-Bittencourt C.I. et al. // BMC Microbiol. 2007. V. 7. P. 58. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-58>
22. Takenaka R. et al. // Jpn. J. Infect. Dis. 2015. V. 68. P. 526. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2014.285>
23. Okada M. et al. // BMC Infect. Dis. 2013. V. 13. P. 406. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-406>
24. Tanpowpong P., Charoenmuang R., Apiwatanakul N. // Pediatr. Int. 2014. V. 56. P. 615. <https://doi.org/10.1111/ped.12301>
25. Teixeira P. et al. // Mol. Genet. Genomics. 2020. V. 295. P. 1001. <https://doi.org/10.1007/S00438-020-01676-8>
26. Winn M.D. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 235. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>
27. McCoy A.J. et al. // J. Appl. Cryst. 2007. V. 40. P. 658. <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>
28. Afonine P. V et al. // Acta Cryst. D. 2012. V. 68. P. 352. <https://doi.org/10.1107/S0907444912001308>
29. Emsley P. et al. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 486. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
30. Wang W. et al. // Genes Dev. 2011. V. 25. P. 2106. <https://doi.org/10.1101/gad.16746011.2004>
31. Santiago-Frangos A., Woodson S.A. // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. 2018. V. 9. P. e1475. <https://doi.org/10.1002/wrna.1475>
32. Sonnleitner E. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 323. P. 1017. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.190>
33. Vecerek B. et al. // Nucl. Acids Res. 2008. V. 36. P. 133. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm985>
34. Panja S. et al. // J. Mol. Biol. 2015. V. 427. P. 3491. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.07.010>

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 539.26

СРАВНИТЕЛЬНОЕ СТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГИСТОНОПОДОБНЫХ БЕЛКОВ НУ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ

© 2023 г. М. В. Петухов^{1,2,3,*}, Т. В. Ракитина^{2,4}, Ю. К. Агапова⁴, Д. Е. Петренко⁴,
П. В. Конарев^{1,4}, В. В. Бритиков⁵, Е. В. Бритикова⁵, Э. В. Бочаров², Э. В. Штыкова¹

¹Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

³Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

⁴Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁵Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

*E-mail: pmxmv1@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.05.2023 г.

После доработки 15.05.2023 г.

Принята к публикации 15.05.2023 г.

Нуклеоид-ассоциированные белки (НАБ) контролируют структуру и функции бактериального нуклеоида. Наиболее представленными в делящихся бактериальных клетках НАБ являются гистоноподобные белки НУ. Ранее с помощью ЯМР-спектроскопии были получены структурные ансамбли конформаций белков НУ из патогенных микоплазм *Spiroplasma melliferum* и *Mycoplasma gallisepticum*. Проведено структурное исследование этих микоплазменных белков с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). Встречаемость отдельных конформаций из ансамбля, полученных методом ЯМР, оценена по данным рассеяния растворами белков НУ. В частности, использовался подход, основанный на характеристизации равновесных смесей в терминах объемных долей их компонентов. Общая форма белков и их олигомерное состояние независимо подтверждены с помощью *ab initio*-моделирования методом конечных объемных элементов. Проведен анализ гибкости ДНК-связывающих доменов белков методом оптимизации ансамбля, в основе которого лежит сравнение структурных характеристик конформаций, приближающих данные МУРР к распределению этих характеристик в случайно-сгенерированном наборе. Полученные результаты – новый взгляд на вариативность структуры НУ белков, необходимую для их функционирования.

DOI: 10.31857/S0023476123600143, EDN: FZWVGJ

ВВЕДЕНИЕ

Гистоноподобный белок НУ является представителем нуклеоид-ассоциированных белков (НАБ), участвующих в суперспирализации геномной ДНК бактерий и ее компактизации в нуклеоид [1]. Димеры НУ белков [2] связывают ДНК без специфичности к нуклеотидной последовательности, но проявляют повышенную аффинность к двуцепочечной ДНК, содержащей дефекты двойной спирали [3, 4]. Белки НУ являются наиболее распространенными и широко представленными в делящихся бактериальных клетках НАБ и участвуют в регуляции репликации, рекомбинации, репарации и транскрипции, а также влияют на адаптационные способности и вирулентность бактерий [5, 6]. Отсутствие НУ белка смертельно для простейших паразитических бактерий класса *Mollicutes*, вызывающих микоплазменные инфекции [7]. Белки НУ от-

сутствуют в эукариотических клетках и поэтому активно исследуются как потенциальные фармакологические мишени для разработки антибактериальных средств [8, 9]. В связи с этим большой интерес вызывает конформационная динамика белков НУ [10, 11], а также их способность к мультимеризации [12] и вклад данного феномена в формирование сверхструктур ДНК, характерных для нуклеоида [4, 13].

Структурные свойства двух белков НУ патогенных микоплазм (*Spiroplasma melliferum* (HUSpm) и *Mycoplasma gallisepticum* (HUMgal)), являющихся гомодимерами [3], состоящими из двух одинаковых субъединиц, были исследованы методами рентгеноструктурного анализа и гетероядерной спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения [10, 11, 14, 15]. В результате была получена кристаллическая структура HUSpm высокого разрешения [15] и обнаруже-

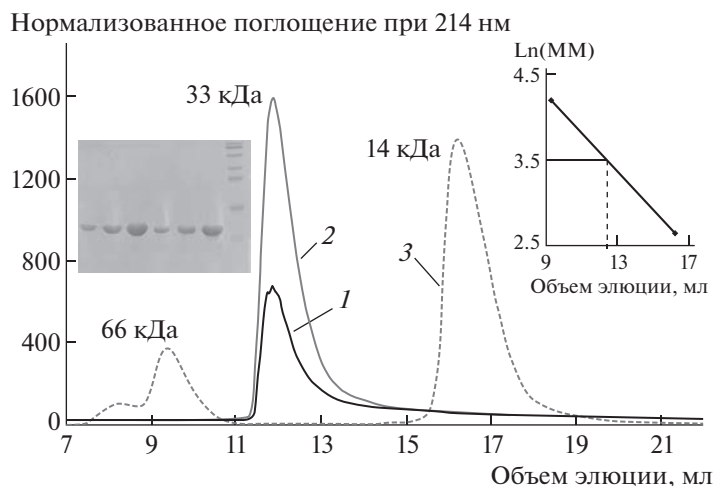


Рис. 1. Анализ чистоты и гомогенности белковых препаратов HUSpm и HUMgal и определение олигомерного состояния белков. Приведены результаты ГФХ на колонке Superdex G-75: 1 – HUSpm, 2 – HUMgal, 3 – маркеры ММ БСА и лизоцим. На врезке слева представлена электрофореграмма градиентного ДСН-ПААГ (12–15%), демонстрирующая чистоту белковых препаратов; слева-направо: 2, 4, 8 мкг HUMgal; 2, 4, 8 мкг HUSpm; маркер ММ (10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130 кДа). На врезке справа представлен расчет ММ по данным ГФХ.

на разнице в конформационной динамике двух микоплазменных HU-белков [11]. В настоящей работе продолжено изучение конформационной вариативности HUMgal и HUSpm методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР).

МУРР является методом структурной биологии, используемым для изучения неупорядоченных систем, таких как растворы биологических макромолекул [16]. МУРР позволяет определить структуру низкого разрешения исключительно по кривой рассеяния без привлечения дополнительной информации (*ab initio*). Другой задачей данного метода является выбор предпочтительной конформации белка в растворе из ряда потенциально-возможных конформаций, предсказанных методами молекулярного моделирования и молекулярной динамики (МД). Выбор конформации происходит путем сравнения теоретических кривых МУРР, полученных для разных моделей, с экспериментальными данными. Например, анализ структурных моделей HUSpm, полученных с использованием комбинации МД и ЯМР-спектроскопии, выявил, что только часть предсказанных структур соответствует результатам МУРР [17]. Кроме того, МУРР позволяет описывать равновесные смеси в терминах объемных долей их компонентов. В случае гибких систем, в которых наблюдается изменчивость структуры по времени и по ансамблю, используют сравнение структурных параметров модельной системы с таковыми от набора случайных конформаций.

Цель настоящей работы – выявление и сравнительный анализ конформаций HUSpm и HUMgal, наиболее часто встречающихся в растворе, а также углубленный анализ гибкости

ДНК-связывающего домена, которая имеет ту же природу, что и внутренне-неупорядоченные белки (IDP). Полученные данные станут структурной основой для изучения ДНК белковых комплексов, формирующихся при связывании HU-белками различных видов ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали препараты рекомбинантных белков HUSpm и HUMgal, полученные как описано в [10, 11, 14, 15]. Чистоту и олигомерное состояние белковых препаратов контролировали с помощью электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) и гельфильтрационной хроматографии (ГФХ), проводимой на колонке Superdex G-75 (GE Healthcare), уравновешенной 50 мМ Na-фосфатным буфером, pH 7.5, содержащим 100 мМ NaCl (рис. 1). Серию последовательных разведений каждого белка готовили в том же буфере.

При проведении ГФХ в качестве маркера молекулярных масс (ММ) использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) с ММ 66 кДа и лизоцим из яичного белка с ММ 14 кДа. Для определения олигомерного состояния HU-белков проводили расчет ММ, используя график зависимости натурального логарифма молекулярной массы ($\ln(\text{MM})$) от объема элюции белка (рис. 1).

Эксперимент и анализ данных МУРР. Экспериментальное исследование структуры HU-белков с помощью малоуглового рассеяния синхротронного излучения проводили на синхротроне Petra III (DESY, EMBL, Гамбург) на линии P12 [18].

Станция P12 оснащена оборудованием для автоматической смены образцов и двумерным детектором Pilatus 2M (DECTRIS, Швейцария). Интенсивность рассеяния $I(s)$ измеряли в области значений волновых векторов $0.03 < s < 6.0 \text{ нм}^{-1}$, где $s = (4\pi \sin \theta)/\lambda$, 2θ – угол рассеяния, $\lambda = 0.124 \text{ нм}$ – длина волны. Измерения проводили при температуре 20°C , диапазон концентраций составлял $3.6\text{--}8.0 \text{ мг/мл}$, за 1 с снимали 20 отдельных кривых рассеяния с целью отслеживания возможного радиационного повреждения. Первичную обработку данных проводили с помощью программы PRIMUS [19]. Рассеяние в нулевой угол $I(0)$ и радиус инерции R_g были вычислены с использованием приближения Гинье [20]. Свернутость белков оценивали с помощью графиков в координатах Кратки $s^2 I(s)$ от s . Наличие колоколообразного пика на графике Кратки свидетельствует о свернутости белка.

Функции распределения по расстояниям $p(r)$, связанные с интенсивностью рассеяния $I(s)$ преобразованием Фурье и необходимые для анализа структуры рассеивающих объектов, вычисляли в программе GNOM [21] в соответствии с уравнением [22]:

$$I(s) = 4\pi \int_0^\infty p(r) \frac{\sin(sr)}{sr} dr, \quad (1)$$

GNOM также определяет максимальный размер $D_{\max}$ рассеивающего объекта исходя из условия $p(r) = 0$ при $r > D_{\max}$.

ММ оценивали по кривой рассеяния с помощью байесиевского подхода, комбинирующего концентрационно-независимые оценки ММ в единый консенсус [23]. В качестве дополнительного контроля ММ использовали исключенный (породовский) объем V_p [24, 25].

Для восстановления формы низкого разрешения образцов использовали программу DAMMIN [26], которая реализует метод имитации отжига для получения *ab initio* трехмерной шариковой модели в сфере диаметром $D_{\max}$. Сначала вычисляется интенсивность рассеяния от произвольной стартовой конфигурации шариков, а затем в процессе имитации отжига теоретическая интенсивность рассеяния рассчитывается от случайных модификаций этой конфигурации с тем, чтобы в результате минимизировать невязку χ^2 между кривой рассеяния от модели I_{calc} и экспериментальной кривой I_{exp} :

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_j \left[\frac{I_{\text{exp}}(s_j) - c I_{\text{calc}}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2, \quad (2)$$

где N – число экспериментальных точек, $\sigma(s_j)$ – экспериментальные погрешности, c – шкалирую-

ющий множитель, совмещающий кривые рассеяния по независимому критерию наименьших квадратов перед вычислением разности.

Степень неоднозначности *ab initio*-восстановления формы рассеивающего объекта по данным МУРР оценивали с помощью программы AMBIMETER [27]. В данном подходе нормализованная интенсивность рассеяния $I(s)/I(0)$ сравнивается с картой плотности кривых рассеяния, полученных от библиотеки уникальных топологий формы. В зависимости от числа ближайших соседей экспериментальной кривой на данной карте вводится параметр неоднозначности, α , равный логарифму числа соседей. Величина $\alpha < 1.5$ гарантирует однозначное восстановление формы объекта, в то время как для $\alpha > 2.5$ восстановление заведомо неоднозначно и необходимо привлечение дополнительной структурной информации для трехмерного моделирования формы по данным МУРР.

Сравнение кривых МУРР, полученных от отдельных конформаций белков и экспериментальных данных, осуществляли с помощью программы CRY SOL [28]. Программа использует мультипольное разложение амплитуд рассеяния для расчета сферически усредненной картины рассеяния и учитывает гидратную оболочку. Экспериментальные данные МУРР приближаются путем оптимизации расчетной кривой рассеяния, минимизируя расхождение между ними.

Для определения встречаемости той или иной конформации белка из ЯМР-ансамбля в смеси использовали программу OLIGOMER [19], которая приближает экспериментальную кривую рассеяния от смеси линейной комбинацией кривых рассеяния от компонентов (в данном случае различных конформаций), чтобы найти объемные доли каждого компонента. Экспериментальная интенсивность рассеяния $I(s)$ от смеси k различных компонентов записывается как линейная комбинация кривых рассеяния от компонентов смеси:

$$I(s) = \sum_i w_i \cdot I_i(s), \quad (3)$$

где w_i и $I_i(s)$ – объемная доля и интенсивность рассеяния от i -го компонента соответственно. OLIGOMER находит объемные доли компонентов путем решения системы линейных уравнений с использованием алгоритма наименьших квадратов.

Анализ гибкости вытянутых участков НУ проводили методом оптимизации ансамбля EOM (Ensemble Optimization Method) [29]. В данном методе генерируется обширный набор случайных конформаций ($\sim 1000\text{--}5000$), из которого генетический алгоритм выбирает небольшой (~ 10 моделей) оптимизированный ансамбль, рассеяние от

Таблица 1. Структурные инварианты, полученные по данным МУРР

Образец	R_g , нм	$D_{\max}$, нм	V_p , нм ³	ММ _{теор} , кДа	ММ _{Bayes} , кДа
HUSpm	2.18 ± 0.05	7.1 ± 0.3	40.4	20.6	20.6 ± 3
HUMgal	2.17 ± 0.05	7.3 ± 0.3	41.8	21.9	21.2 ± 3

которого приближает экспериментальные данные МУРР. Затем путем сравнения структурных характеристик, таких как распределение R_g и $D_{\max}$ от исходного набора и выбранного ансамбля, делают вывод о степенях гибкости и компактности интересующего фрагмента белковой молекулы. Для количественной оценки меры гибкости используется параметр R_{flex} , вычисляемый согласно теории информационной энтропии Шеннона:

$$R_{flex} = \sum_{i=1}^n p(x_i) \log(p(x_i)), \quad (4)$$

где $p(x_i)$ — вероятности распределения R_g в интервале значений $X = [x_1, \dots, x_n]$ с учетом $\log(p(x_i)) = 0$, если $p(x_i) = 0$. Таким образом, R_{flex} находится в диапазоне от 0 до 100%, $R_{flex} = 0\%$ соответствует максимальной жесткости, тогда как $R_{flex} = 100\%$ — максимальной гибкости фрагмента молекулы.

Для генерации случайного ансамбля каждый мономер белка в ЯМР-структуре димера был разделен на три домена: N-концевую часть (остатки 1–57 аминокислотной последовательности для HUMgal и 1–54 для HUSpm), вытянутую часть белков (аминокислотные остатки (а.о.) 58–82 для HUMgal и 55–78 для HUSpm) и C-концевой фрагмент (а. о. 83–99 для HUMgal и 79–93 для HUSpm). Вытянутые части белков случайным образом вращались и сдвигались с помощью программы SASREF [30], при этом положение остальных фрагментов было фиксировано, а наложенные ограничения на контакты обеспечивали связность структуры в местах соединений доменов. Расчет интенсивностей рассеяния от полученных структур проводили с помощью программы CRY SOL.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Расчетные ММ мономеров рекомбинантных HU-белков составляют 11.1 кДа для HUMgal и 10.4 кДа для HUSpm. Подвижность белков в ДСН-ПААГ соответствует ММ 11–12 кДа, при этом видно, что HUMgal немного больше HUSpm (рис. 1). Известно, что функциональной единицей HU-белка является димер. При проведении ГФХ HUSpm и HUMgal выходили в одинаковом объеме, соответствующем ММ 33кДа, вместо ожидаемых 21–22 кДа. Данный феномен связан с

тем, что подвижность белка при ГФХ зависит не от ММ, а от размера и формы белка. Для большинства глобулярных белков, в том числе для БСА и лизоцима, ММ и размер взаимозаменяемы, однако HU-белки имеют эллипсоидную, а не шарообразную форму, что приводит к аномальной подвижности. Аналогичный эффект дает наличие IDP-участков в ДНК-связывающем домене.

Экспериментальные кривые МУРР белков HUSpm и HUMgal показаны на рис. 2а. Соответствующие графики Гинье приведены на рис. 2б. Оба образца на этом графике демонстрируют линейное поведение, что свидетельствует о том, что в выбранном диапазоне данных ($sR_g < 1.3$) отсутствует влияние агрегации, и по ним можно определять величину R_g . Функции распределения по расстояниям $p(r)$ и величины максимального размера $D_{\max}$ определяли с помощью программы GNOM. Как видно на рис. 2в, обе кривые $p(r)$ имеют форму, характерную для вытянутых частиц, что говорит об отклонении от глобулярности для обоих белков. Полученные кривые $p(r)$ также демонстрируют, что $D_{\max}$ от HUMgal несколько превосходит эту величину для HUSpm. Это согласуется с димерными моделями из ЯМР (PDB-коды 5ogu и 2ndp для HUSpm и HUMgal соответственно), имеющимися для обоих белков. Графики Кратки на рис. 2г демонстрируют ярко выраженный пик, что говорит о свернутости обоих макромолекул. Структурные инварианты, полученные по данным МУРР, приведены в табл. 1. Найденные величины V_p и ММ (для HUMgal они, как и следует, оказались чуть больше) находятся в согласии с ожидаемыми значениями димерного состояния для обоих HU-белков.

Перед проведением *ab initio*-моделирования структуры низкого разрешения HU-белков оценили потенциальную неоднозначность восстановления формы с помощью программы AMBIMETER. Полученные оценки неоднозначности α , равные 1.26 и 1.23 для кривых рассеяния HUSpm и HUMgal соответственно, говорят о высокой вероятности устойчивого восстановления формы. В результате трехмерного моделирования методом конечных объемных элементов с симметрией второго порядка в программе DAMMIN экспериментальные данные HUSpm и HUMgal были при-

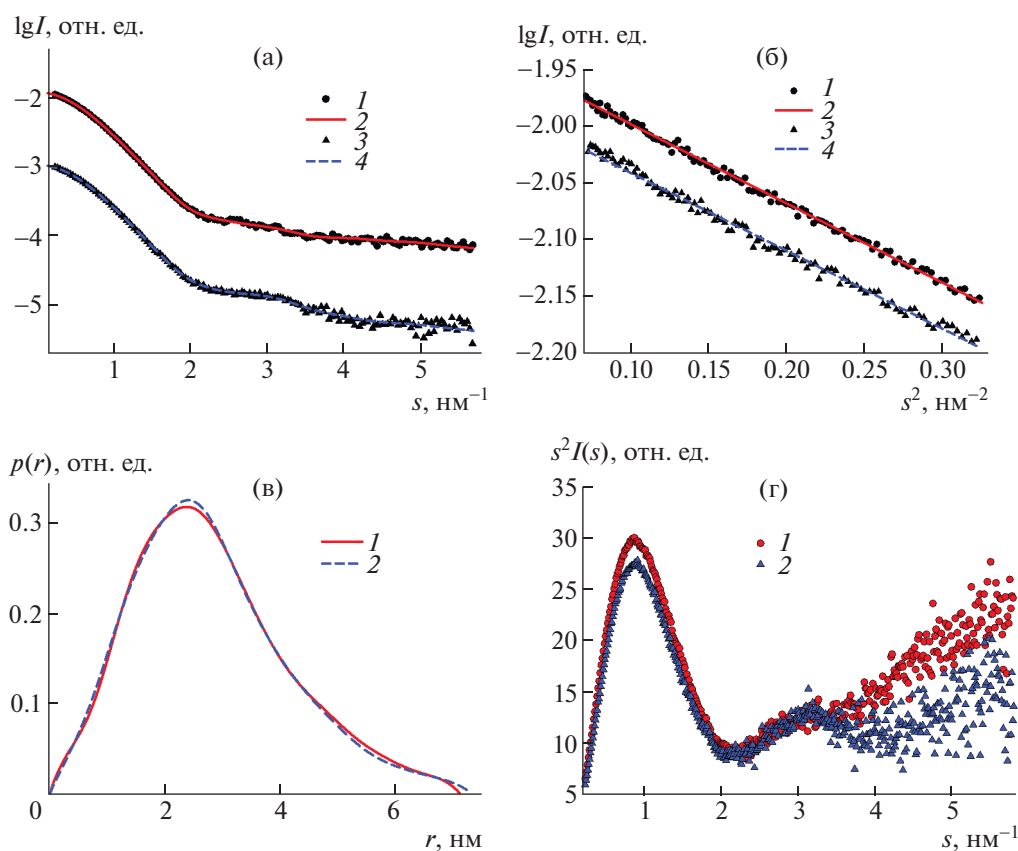


Рис. 2. Первичная обработка данных МУРР от НУ белков: а – кривые рассеяния 1, 2 – экспериментальные данные и регуляризованная кривая, полученная с помощью программы GNOM, для HUSpm, 3, 4 – экспериментальные данные и регуляризованная кривая для HUMgal; б – графики Гинье 1, 3 – экспериментальные точки для HUSpm и HUMgal, 2, 4 – линейное приближение; в, г – функции $p(r)$ и графики Кратки для HUSpm (1) и HUMgal (2).

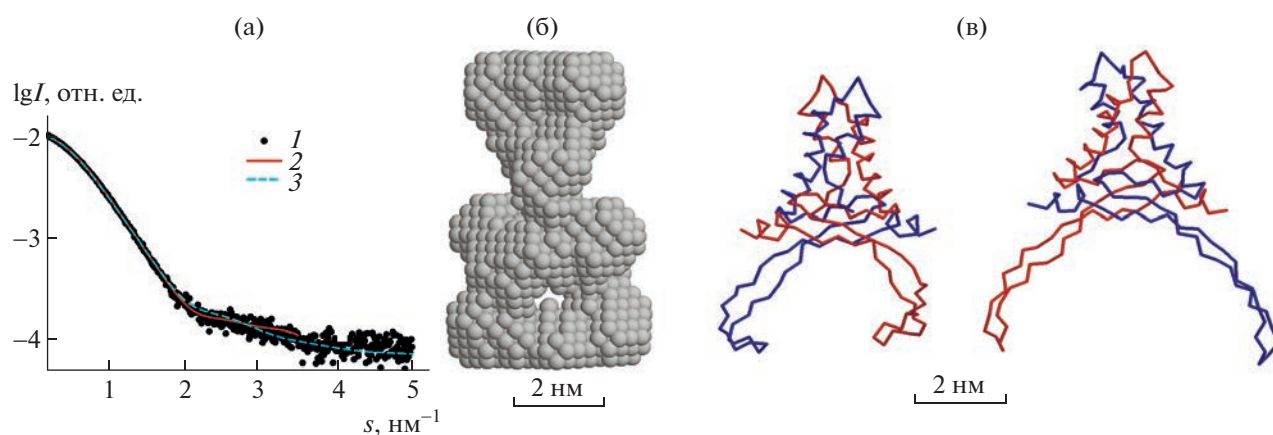


Рис. 3. Моделирование структуры HUSpm в растворе: а – профили МУРР 1 – экспериментальные данные МУРР, 2 – приближение *ab initio*-моделью, 3 – приближению смесью конформаций; б – шариковая *ab initio*-модель; в – конформации белка, выбранные программой OLIGOMER.

ближены в диапазоне s до 3.5 nm^{-1} (рис. 3а, 4а), в котором белковая частица может быть представлена как однородное тело. Типичное восстановление формы молекул НУ приведено на рис. 3б, 4б.

Полученные формы хорошо согласуются с димерным состоянием белка, демонстрируя как фиксированное ядро, так и лабильные (подвижные) части макромолекулы.

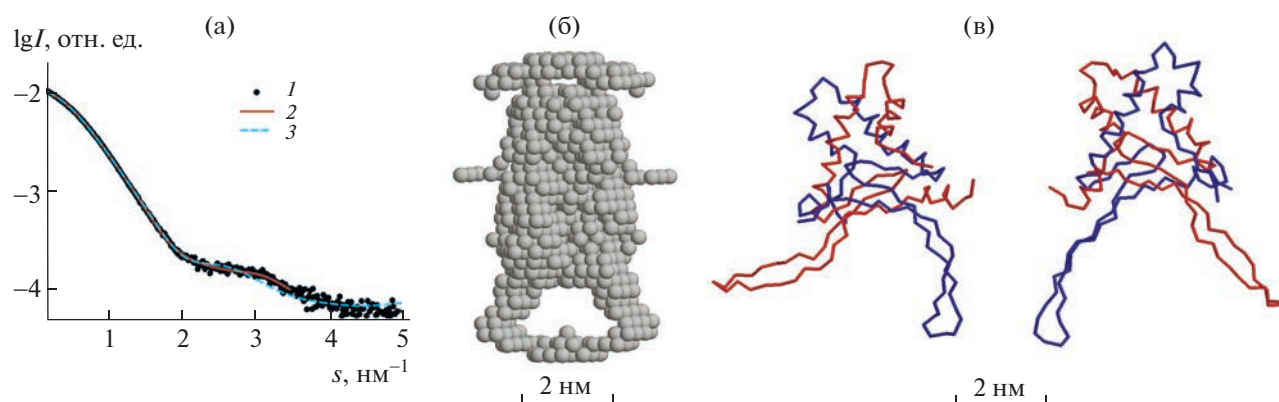


Рис. 4. Моделирование структуры HUMgal в растворе: а – профили МУРР 1 – экспериментальные данные МУРР, 2 – приближение *ab initio*-моделью, 3 – приближению смесью конформаций; б – шариковая *ab initio*-модель; в – конформации белка, выбранные с помощью программы OLIGOMER.

Ранее пространственные структуры HU-белков в растворе были получены с помощью ЯМР-спектроскопии [10, 11]. Обе модели (PDB-код 5ogu для Spm и 2ndp для Mgal) содержат по 15 различных конформаций в ансамбле. В настоящей работе попытались приблизить экспериментальные данные МУРР от обоих образцов с помощью атомных моделей отдельных конформаций, используя программу CRY SOL. В обоих случаях не удалось получить удовлетворительное приближение во всем диапазоне данных (величина невязки указана в табл. 2). Вероятно, это связано с наличием нескольких конформаций белков в растворе, находящихся в равновесии друг с другом. Анализ равновесной смеси конформаций проводили с помощью программы OLIGOMER с учетом возможных 15 конформаций для каждого белка, взятых из ЯМР-структур. В обоих случаях было достаточно выбрать по две конформации из 15, чтобы приблизить кривую рассеяния. Получившиеся приближения приведены на рис. 3а, 4а. Отметим, что кривые рассеяния приближены во всем диапазоне данных, а не только в районе малых углов, как это было в случае *ab initio*-моделирования при предположении об однородной плотности частицы. Выбранные конформации изображены на

рис. 3в, 4в, соответствующие номера моделей в ансамбле и полученные невязки и объемные фракции компонент даны в табл. 2.

Чтобы проверить степень гибкости вытянутых фрагментов белков (а. о. 55–78), ответственных за связывание с молекулами ДНК, на базе выбранных конформаций белков (модели 4 и 10 для HUSpm, модели 2 и 14 для HUMgal) были созданы ансамбли структур со случайными конформациями вытянутых фрагментов белков. Далее с помощью программы EOM были найдены оптимизированные наборы структур, позволившие улучшить приближение экспериментальных данных (рис. 5а, 6а, табл. 3). Сравнение распределений R_g и D_{max} для исходного случайного набора и оптимизированного набора конформаций указывает на высокую подвижность вытянутых фрагментов белков (рис. 5б, 5в и 6б, 6в), высокие значения параметра R_{flex} для выбранного ансамбля (91.51% для HUSpm и 83.29% для HUMgal) также подтверждают данный вывод.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено структурное исследование гистонотипных белков HUSpm и HUMgal в раство-

Таблица 2. Приближение данных МУРР с помощью ЯМР-ансамбля

Образец	Приближение отдельной конформацией, CRY SOL		Приближение смесью конформаций, OLIGOMER				
	Модель	χ^2	Модель	Объемная доля, w	Модель	Объемная доля, w	χ^2
HUSpm, 5ogu	2	2.26	4	0.57	10	0.43	1.68
HUMgal, 2ndp	14	1.53	2	0.46	14	0.54	1.33

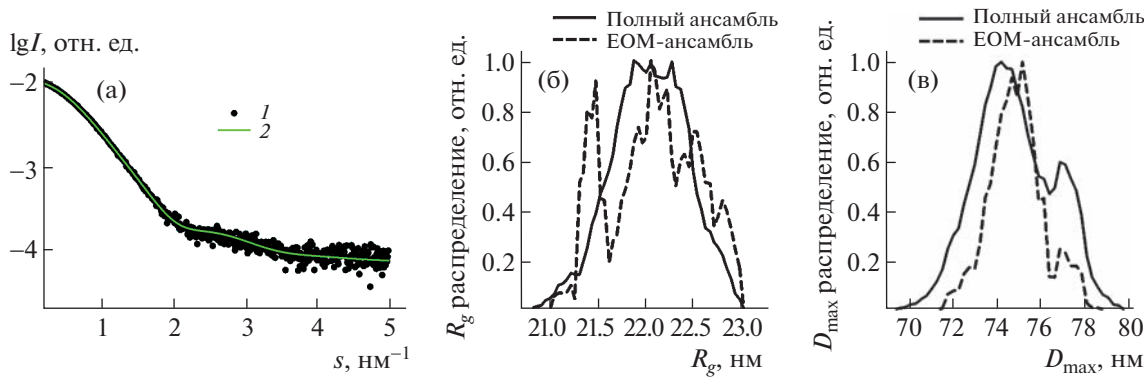


Рис. 5. Моделирование гибкости вытянутых фрагментов белка HUSpm в растворе: а – профили МУРР 1 – экспериментальные данные МУРР, 2 – приближение оптимизированным ансамблем; б – распределение R_g от случайного набора и выбранного ансамбля программой EOM; в – распределение $D_{\max}$ от случайного (полного) набора и выбранного ансамбля программой EOM.

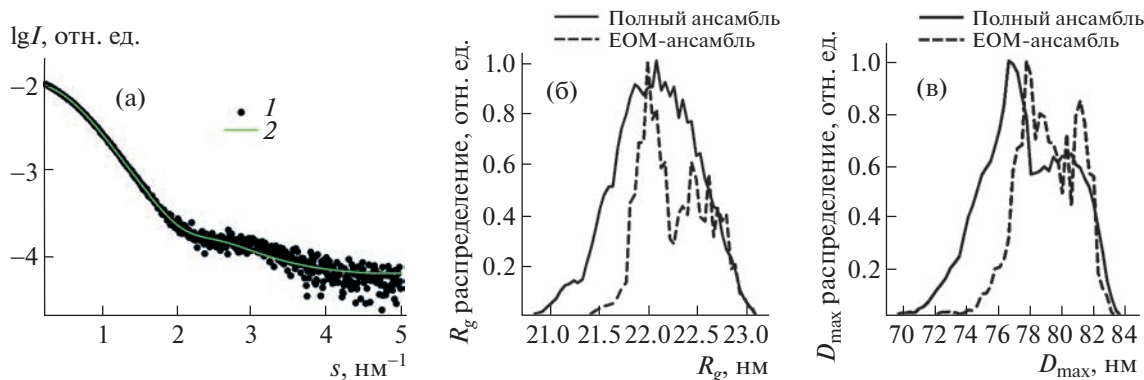


Рис. 6. Моделирование гибкости вытянутых фрагментов белка HUMgal в растворе: а – профили МУРР 1 – экспериментальные данные МУРР, 2 – приближение оптимизированным ансамблем; б – распределение R_g от случайного (полного) набора и выбранного ансамбля программой EOM; в – распределение $D_{\max}$ от случайного (полного) набора и выбранного ансамбля программой EOM.

ре. В качестве основного метода для характеристики структуры использовали МУРР. Показано, что для обоих белков олигомерным состоянием в условиях данного эксперимента является димер. При этом кривые рассеяния HUSpm и HUMgal могут быть качественно описаны с помощью двух конформаций из соответствующего ЯМР-ансам-

бля. С применением более детального анализа гибкости установлено, что HUSpm по сравнению с HUMgal имеет большую лабильность и/или конформационное многообразие ДНК-связывающих доменов. Этот вывод коррелирует с заметными различиями в термостабильности [11, 15] и конформационной динамики [10, 11] данных бел-

Таблица 3. Анализ гибкости вытянутых фрагментов белковых молекул с помощью оптимизированного ансамбля по данным МУРР

Образец	Модели, используемые для создания случайного ансамбля	R_{flex} , % (случайный ансамбль)	R_{flex} , % (выбранный ансамбль)	χ^2
HUSpm, 5ogu	4, 10	90.19	91.51	1.21
HUMgal, 2ndp	2, 14	90.91	83.29	1.34

ков, обнаруженными нами ранее. Полученные результаты могут служить объяснением как разницы в профилях аффинности к различным ДНК-структурам [3], так и разной чувствительности HUSpm и HUMgal к ингибиторам ДНК связывания [9]. Таким образом, данная работа иллюстрирует, как дополнение результатов рентгеноструктурного анализа и гетероядерной ЯМР-спектроскопии высокого разрешения данными МУРР позволяет определить существенные взаимосвязи между структурными вариациями и функциональными особенностями двух гистоноподобных белков, которые в свою очередь могут лежать в основе их специфической роли в организмах хозяев — насекомых (*Anthophila*) и птиц (*Gallus gallus*).

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-44-10021 <https://rscf.ru/project/23-44-10021/>) в части белковой инженерии и структурных исследований методом МУРР и совместного научного проекта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований с Российским научным фондом “БРФФИ–РНФ” (грант № X23РНФ-091) в части структурно-конформационного моделирования белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dorman C.J. // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 24. № 5–6. P. 316. <https://doi.org/10.1159/000368850>
2. Rouviere-Yaniv J., Gros F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 9. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.9.3428>
3. Kamashev D., Agapova Y., Rastorguev S. et al. // PLoS One. 2017. V. 12. № 11. P. e0188037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188037>
4. Verma S.C., Harned A., Narayan K. et al. // Mol. Microbiol. 2023. V. 119. № 4. P. 439. <https://doi.org/10.1111/mmi.15033>
5. Stojkova P., Spidlova P., Stulik J. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2019. V. 9. P. 159. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00159>
6. Holowka J., Zakrzewska-Czerwinska J. // Front. Microbiol. 2020. V. 11. P. 590. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00590>
7. Glass J.I., Assad-Garcia N., Alperovich N. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. № 2. P. 425. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510013103>
8. Bhowmick T., Ghosh S., Dixit K. et al. // Nat. Commun. 2014. V. 5. P. 4124. <https://doi.org/10.1038/ncomms5124>
9. Agapova Y.K., Altukhov D.A., Timofeev V.I. et al. // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. P. 15128. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72113-4>
10. Altukhov D.A., Talyzina A.A., Agapova Y.K. et al. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2016. V. 36. № 1. P. 45. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1264893>
11. Timofeev V.I., Altukhov D.A., Talyzina A.A. et al. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2018. V. 36. № 16. P. 4392. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1417162>
12. Дадинова Л.А., Петухов М.В., Гордиенко А.М. и др. // Биохимия. 2023. Т. 88. № 5. С. 785. <https://doi.org/10.31857/S032097252305007X>
13. Remesh S.G., Verma S.C., Chen J.H. et al. // Nat. Commun. 2020. V. 11. № 1. P. 2905. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16724-5>
14. Nikolaeva A.Y., Timofeev V.I., Boiko K.M. et al. // Crystallography Reports. 2015. V. 60. P. 880. <https://doi.org/10.1134/S1063774515060231>
15. Boyko K.M., Rakitina T.V., Korzhenevskiy D.A. et al. // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 36366. <https://doi.org/10.1038/srep36366>
16. Feigin L.A., Svergun D.I. Structure analysis by small-angle x-ray and neutron scattering. New York: Plenum Press, 1987. 335 p.
17. Gaponov Y.A., Timofeev V.I., Agapova Y.K. et al. // Mendeleev Commun. 2022. V. 32. № 6. P. 742. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2022.11.011>
18. Blanchet C.E., Spilotros A., Schwemmer F. et al. // J. Appl. Cryst. 2015. V. 48. № 2. P. 431. <https://doi.org/10.1107/S160057671500254X>
19. Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V. et al. // J. Appl. Cryst. 2003. V. 36. P. 1277. <https://doi.org/10.1107/S0021889803012779>
20. Guinier A., Fournet G. Small Angle Scattering of X-Rays. New York: Wiley, 1955. 268 p.
21. Svergun D.I. // J. Appl. Cryst. 1992. V. 25. P. 495. <https://doi.org/10.1107/S0021889892001663>
22. Svergun D.I., Semenyuk A.V., Feigin L.A. // Acta Cryst. A. 1988. V. 44. P. 244. <https://doi.org/10.1107/S0108767387011255>
23. Manalastas-Cantos K., Konarev P.V., Hajizadeh N.R. et al. // J. Appl. Cryst. 2021. V. 54. P. 343. <https://doi.org/10.1107/S1600576720013412>
24. Porod G. // General theory, in Small-angle X-ray scattering / Eds. Glatter O., Kratky O. London: Academic Press, 1982. P. 17.
25. Petoukhov M.V., Franke D., Shkumatov A.V. et al. // J. Appl. Cryst. 2012. V. 45. № 2. P. 342. <https://doi.org/doi:10.1107/S0021889812007662>
26. Svergun D.I. // Biophys. J. 1999. V. 76. № 6. P. 2879. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77443-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77443-6)
27. Petoukhov M.V., Svergun D.I. // Acta Cryst. D. 2015. V. 71. P. 1051. <https://doi.org/10.1107/S1399004715002576>
28. Svergun D.I., Barberato C., Koch M.H.J. // J. Appl. Cryst. 1995. V. 28. P. 768. <https://doi.org/10.1107/S0021889895007047>
29. Bernado P., Mylonas E., Petoukhov M.V. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2007. V. 129. № 17. P. 5656. <https://doi.org/10.1021/ja069124n>
30. Petoukhov M.V., Svergun D.I. // Biophys. J. 2005. V. 89. № 2. P. 1237. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.064154>

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73 + 577.1

ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ ИЗ ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *Halomonas chromatireducens*

© 2023 г. Т. Н. Сафонова^{1,*}, А. Н. Антипов¹, **В. П. Вейко**¹, Н. Н. Мордкович^{1,2},
Н. А. Окорочкова¹, П. В. Дороватовский³, К. М. Поляков^{4,**}

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

²Медико-генетический научный центр им. академика Н. П. Бочкова, Москва, Россия

³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁴Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

*E-mail: tn_safonova@mail.ru

**E-mail: kmpolyakov@gmail.com

Поступила в редакцию 16.06.2023 г.

После доработки 16.06.2023 г.

Принята к публикации 28.08.2023 г.

Кристаллы фермента пуриннонуклеозидфосфорилазы из экстремофильной бактерии *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3, подходящие для рентгеноструктурного исследования, выращены методом диффузии паров. Дифракционный набор от полученных кристаллов собран до разрешения 1.8 Å на станции белковой кристаллографии “Белок” синхротрона Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” при температуре 100 К. Набор данных обработан для пр. гр. $P1$, $P2$, $P2_1$ и $P622$. Решение методом молекулярного замещения с учетом двойникования было найдено для групп $P2_1$ и $P1$, содержащих в независимой части элементарной ячейки один и два гексамера фермента соответственно.

DOI: 10.31857/S0023476123600301, EDN: XSCQXA

ВВЕДЕНИЕ

Пуриннонуклеозидфосфорилазы (ПНФ, КФ 2.4.2.1) – ферменты нуклеинового обмена, участвующие в утилизации и реутилизации пуриновых нуклеотидов. Они катализируют обратимый фосфоролиз пуриновых нуклеозидов как природного происхождения, так и их модифицированных аналогов с образованием рибозо-1-фосфата и соответствующих оснований [1, 2]. ПНФ также катализируют реакцию трансгликозилирования, т.е. перенос углеводного остатка от одного нуклеозида на другое нуклеиновое основание с образованием нового нуклеозида [3]. Эта реакция является основной в запасном пути синтеза нуклеозидов и служит единственным источником пуриновых оснований в организмах, где не происходит синтез нуклеозидов *de novo*. ПНФ разделяются на два подсемейства – гомотримеры, обнаруженные в основном в эукариотах, и гомогексамеры (тримеры димеров), обнаруженные в основном в бактериях. Субъединицы тримерных и гексамерных форм ПНФ имеют близкие структуры [2] и различаются главным образом своей субстратной специфичностью. Так, тримерные ПНФ используют только 6-оксопуриновые рибонуклеозиды в качестве субстрата, в то время как

гексамерные ПНФ могут использовать как 6-оксопуриновые рибонуклеозиды, так и 6-аминопуриновые рибонуклеозиды [4, 5].

Внимание исследователей к изучению этой группы ферментов определяется несколькими факторами: биотехнологическим потенциалом при ферментативном синтезе производных нуклеозидов, которые могут обладать противовирусным и противоопухолевым действием [6–8], а также разработкой эффективных ингибиторов ПНФ, используемых при терапии онкологических заболеваний [9–13]. Трансфекция гена бактериальной ПНФ в раковые клетки человека стимулирует экспрессию бактериальной ПНФ, приводя к превращению производных нуклеозидов, устойчивых к действию ПНФ человека (так называемые пролекарства), в пуриновые основания, токсичные для клеток опухоли [4, 14, 15]. Различная субстратная специфичность ПНФ человека и ряда паразитических микроорганизмов позволяет селективно ингибировать синтез пуринов *de novo* в организме. Поиск эффективных ингибиторов этого фермента для обеспечения селективного Т-клеточного статуса организма при химиотерапии ряда патологий является актуальной задачей.

Для эффективного решения этих задач, а также для направленного получения мутантных форм фермента для применения в медицине и биотехнологии паразитов необходимо детальное знание структуры фермента, его функций и механизма реакции, а также взаимосвязи между структурой фермента и его активностью.

К настоящему времени клонирован ряд генов ПНФ из разных микроорганизмов. Однако данные рентгеноструктурного анализа (РСА) для этих ферментов в основном относятся к ПНФ из *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Helicobacter pylori* и других модельных или патогенных видов микроорганизмов. Поэтому представляет интерес изучение этих белков из микроорганизмов, относящихся к группе экстремофилов, поскольку способность к росту в экстремальных условиях предполагает присутствие в клетках ферментов с измененными свойствами, в том числе нуклеозидфосфорилаз. В [16] был клонирован ген *deoD Halomonas chromatireducens* AGD 8-3 и проведена его гетерологичная экспрессия в клетках *E. coli*. Рекомбинантный белок ПНФ был выделен и очищен, его основные ферментативные свойства изучены. Выбор микроорганизма для детального изучения новой ПНФ был обусловлен несколькими факторами: принадлежностью к классу γ -протеобактерий, экстремальными условиями обитания. Грамотрицательная денитрифицирующая факультативно галоалкалофильная бактерия *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3 была выделена из содовых солончаков Кулундинской степи (Россия). Эта бактерия способна к росту при аномально высоком уровне солености (2.7 М NaCl) и щелочном значении среды (pH 9.5–10.0) [17]. Экстремальные условия обитания данного микроорганизма могли привести к формированию в клетках ферментов, включая НПФ, адаптированных к необычной для других мезофилов (*E. coli* и *S. oneidensis* MR-1) концентрации ионов щелочного металла (натрия).

Несмотря на то что в международном Банке белковых структур (PDB) имеются данные для множества ПНФ из разных источников, среди них нет ни одной структуры из этой экстремофильной бактерии. Детальное изучение структурно-функциональной организации ПНФ из *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3 (HrPNP) методом РСА позволит выявить ключевые аминокислотные остатки, определяющие экстремофильные свойства фермента, в частности его термостабильность, и в дальнейшем получить мутанты с улучшенными характеристиками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение препарата пуриннонуклеозидфосфорилазы. Клонирование гена ПНФ из экстремофильной бактерии *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3, получение высокоэффективного рекомбинантного штамма-продуцента HrPNP, и фермента-

тивные характеристики описаны в [16]. Рекомбинантная HrPNP была выделена методами ионообменной хроматографии в гомогенном состоянии. Выделение и очистку HrPNP проводили по методике, описанной в [18]. Первичная структура была подтверждена методом MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометрического анализа триптического гидролизата. Ферментативную активность HrPNP определяли в калий-фосфатном буфере по методике [8].

Определение четвертичной структуры HrPNP проводили методом аналитической гель-фильтрации на колонке Tricorn 10/300 с сорбентом Superdex 200 с использованием прибора АКТА FPLC (“GE Healthcare”, Великобритания) в 10 mM натрий-фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 150 mM NaCl. В качестве белков-маркеров использовали набор “Gel Filtration Calibration Kits” (GE Healthcare Life Sciences, Великобритания), а также рекомбинантную уридинфосфорилазу из *E. coli*. Показано, что HrPNP образует гексамерную форму.

Кристаллизацию HrPNP проводили методом “висячей капли” посредством диффузии в парах при комнатной температуре в термостатированной комнате. Использовали наборы для кристаллизации (скрининга) глобулярных белков компании Hampton Research. Лиофильно высушенный препарат HrPNP растворяли в деионизированной воде (MilliQ) с концентрацией 20 мг/мл. Раствор белка центрифугировали непосредственно перед кристаллизацией на микроцентрифуге со скоростью 18000 об./мин в течение 10 мин для удаления инородных частиц и агрегатов. Каждая капля состояла из 2.0 мкл раствора белка и 2.0 мкл противораствора. Объем противораствора в резервуаре составлял 400 мкл. Кристаллизацию проводили в пластиковых планшетах для висячих капель “Lindbro” фирмы Hampton Research с использованием силиконизированных стекол диаметром 22 мм фирмы Hampton Research. Кристаллы, подходящие для РСА, вырастали в течение одной недели с использованием 0.1 М Bis-Tris-буфера (pH 6.5), содержащего 0.2 М сульфата аммония и ПЭГ 3350 (25 мас. %), в качестве противораствора.

Сбор и обработка дифракционных данных. Набор дифракционных данных собран до разрешения 1.80 Å на станции белковой кристаллографии “Белок” синхротрона Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” при температуре 100 К. Перед началом РСА кристаллы помещали в криораствор, приготовленный из кристаллизационного раствора с добавлением 25% глицерина. Обработку дифракционных данных проводили с помощью программ XDS и XSCALE [19].

Решение и уточнение структуры. Структура принадлежит пр. гр. P1, параметры ячейки приведены в табл. 1. Систематических погасаний для осевых рефлексов не наблюдается. В этом случае

Таблица 1. Статистика сбора данных, уточнение структуры HgPNP из *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3 в различных пространственных группах

Пр. гр.	$P622$	$P2_1$	$P1$
Параметры ячейки, Å; град	$a = 93.06, b = 93.06, c = 96.94; \gamma = 120$	$a = 92.24, b = 93.51, c = 92.34; \beta = 120.03$	$a = 92.36, b = 96.92, c = 92.48; \alpha = 89.97, \beta = 120.02, \gamma = 90.38$
Разрешение, Å	50.0–1.81 (1.92–1.81)	40.00–1.9 (1.95–1.90)	40.00–1.9 (2.03–1.90)
Среднее $I/\sigma(I)$	9.47 (2.96)	8.05 (3.06)	3.8 (1.57)
Полнота, %	94.7 (99.1)	98.0 (97.3)	95.1 (93.0)
Решение методом молекулярного замещения		гексамер	два гексамера
$R_{\text{meas}}, \%$	15.2 (90.5)	12.8 (58.3)	11.5 (38.6)
CC(1/2), %	99.6 (88.8)	99.3 (88.9)	98.7 (88.0)
Число доменов двойникования		6	12
Заселенности доменов		0.2108, 0.2059, 0.1435, 0.1377, 0.1531, 0.1490	0.1463, 0.1361, 0.0562, 0.0686, 0.0714, 0.0833, 0.0678, 0.0476, 0.0624, 0.0439, 0.1072, 0.1098
$R_{\text{cryst}}, \%$		20.17	16.54
Среднеквадратичные отклонения в длинах связей, Å		0.015	0.019
Среднеквадратичные отклонения в валентных углах, град		2.8	3.5
Число атомов белка		10837	21 550
Число молекул растворителя		35	284

параметры элементарной ячейки a и c приблизительно равны, углы α и γ приблизительно равны 90° , а угол β близок к 120° . Такие параметры элементарной ячейки позволяют предположить повышение симметрии до моноклинной или гексагональной сингоний. Набор был обработан для пр. гр. $P2$, $P2_1$ и $P622$ (табл. 1). Для групп $P2$ и $P622$ не удалось найти решение методом молекулярного замещения. Для группы $P2_1$ решение было найдено. Выявлено, что в независимой части элементарной ячейки локализуется один гексамер. Субъединицы этого гексамера расположены в плоскости, перпендикулярной оси второго порядка. Однако в этой группе не выполняется условие погасания рефлексов по оси $0k0$ ($k = 2n$). Для пр. гр. $P1$ было найдено решение структуры методом молекулярного замещения. Независимая часть элементарной ячейки содержит два гексамера.

Уточнение с помощью программы REFMAC5 [20] было проведено для пр. гр. $P1$ и $P2_1$ (табл. 1). В обоих случаях уточнение плохо сходится без учета возможности двойникования. При уточнении с учетом двойникования (шесть доменов для $P2_1$ и 12 доменов для $P1$) статистические характе-

ристики моделей (табл. 1) и качество электронной плотности значительно улучшаются, однако наблюдаются значительные отклонения в значениях длин связей, валентных и торсионных углов от стандартных значений. Кроме того, при уточнении в структурах удается локализовать только малое количество молекул растворителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В пр. гр. $P1$ независимая часть элементарной ячейки содержит два гексамера. Оба этих гексамера лежат в двух плоскостях, перпендикулярных кристаллографической оси b (рис. 1). В кристалле каждый из этих гексамеров образует слои, которые сформированы одной из кристаллографически независимых молекул и ее копиями, размноженными трансляционными элементами симметрии. Такие два слоя образуют двойной слой, в котором молекулы имеют плотные контакты внутри слоев, в то время как контакты между молекулами из разных слоев слабые (рис. 1). Такая двухслойная упаковка молекул из слабо связанных слоев способствует формированию двойников в кристалле.

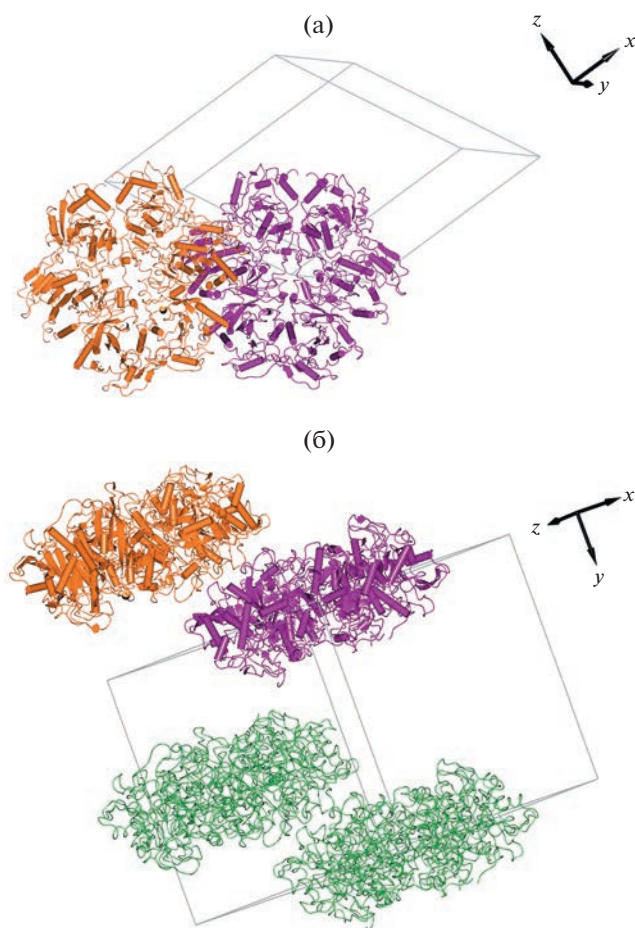


Рис. 1. Две взаимно перпендикулярные проекции кристаллической структуры двух гексамеров HgPNP из *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3 из независимой части элементарной ячейки: а — ось *b* лежит в плоскости рисунка, а гексамеры расположены перпендикулярно этой оси; б — гексамеры расположены приблизительно в плоскости рисунка.

Показано, что строение гексамерной молекулы HgPNP из *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3 близко к строению молекул ПНФ из других источников, кристаллические структуры которых были определены ранее. Все субъединицы находятся в открытой конформации. Однако делать выводы о деталях строения HgPNP из *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3 на основании полученных структур нельзя. Планируется продолжить работу по поиску другой кристаллической модификации фермента с отсутствием двойникования, а также получению кристаллов HgPNP в комплексах с ингибиторами или субстратами, что также может способствовать получению рентгеновских данных хорошего качества.

Исследование проведено в рамках выполнения работ по Государственному заданию Института биохимии им. А.Н. Баха, ФНИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” с использованием оборудования Центра коллективного

пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ealick S.E., Rule S.A., Carter D.C. et al. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 1812.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)40090-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)40090-2)
2. Mao C., Cook W.J., Zhou M. et al. // Structure. 1997. V. 5. P. 1373.
[https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00287-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00287-6)
3. Krenitsky T.A., Koszalka G.W., Tuttle J.V. // Biochemistry. 1981. V. 20 (12). P. 3615.
<https://doi.org/10.1021/bi00515a048>
4. Bennett E.M., Li C., Allan P.W. et al. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 47110.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M304622200>
5. Ducati R.G., Santos D.S., Basso L.A. // Arch. Biochem. Biophys. 2009. V. 486. P. 155.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.04.011>
6. Михайлопуло И.А., Мирошников А.И. // Acta Naturae. 2010. Т. 2. № 2. С. 36.
<https://doi.org/10.32607/20758251-2010-2-2-36-58>
7. Nannemann D.P., Kaufmann K.W., Meiler J. et al. // Protein Eng. Des. Sel. 2010. V. 23. P. 607.
<https://doi.org/10.1093/protein/gzq033>
8. Xie X., Xia J., He K. et al. // Biotechnol. Lett. 2011. V. 33. P. 1107.
<https://doi.org/10.1007/s10529-011-0535-6>
9. Liekens S., De Clercq E., Neyts J. // Biochem. Pharmacol. 2001. V. 61. № 3. P. 253.
[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00529-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00529-3)
10. Carmeliet P. // Nature. 2005. V. 438. № 7070. P. 932.
<https://doi.org/10.1038/nature04478>
11. Furukawa T., Tabata S., Yamamoto M. et al. // Pharmacol. Res. 2018. V. 132. P. 15.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.03.019>
12. Pant P., Pathak A., Jayaram B. // J. Phys. Chem. B. 2021. V. 125. P. 2856.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c10553>
13. Madrid D.C., Ting L.-M., Waller K.L. et al. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 35899.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M807218200>
14. Myers L.A., Hershfield M.S., Neale W.T. et al. // J. Pediatr. 2004. V. 145. P. 710.
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.06.075>
15. Погосян Л.Г., Нерсесова Л.С., Газарянц М.Г. и др. // Биомед. химия. 2011. Т. 57. № 5. С. 526.
<https://doi.org/10.18097/PBMC20115705526>
16. Антипов А.Н., Мордкович Н.Н., Хижняк Т.В. и др. // Прикл. биохим. микробиол. 2020. Т. 56. № 1. С. 45.
<https://doi.org/10.31857/S055510992001002X>
17. Шаповалова А.А., Хижняк Т.В., Турова Т.П. и др. // Микробиология. 2009. Т. 78. № 1. С. 117.
<https://doi.org/10.1134/S0026261709010135>
18. Мордкович Н.Н., Манувер В.А., Вейко В.П. и др. // Биотехнология. 2012. № 1. С. 21.
19. Kabsch W. // Acta. Cryst. D. 2010. V. 66. P. 125.
<https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
20. Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 355.
<https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.55, 578.22

ПОЛУЧЕНИЕ И КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ПИКОРНАИНА 3С РИНОВИРУСА А28

© 2023 г. А. Е. Тишин¹, А. В. Гладышева^{1,*}, Л. А. Пятавина^{1,2}, С. Е. Олькин¹, А. А. Гладышева^{1,2},
И. Р. Иматдинов¹, А. В. Власкина³, А. Ю. Николаева³, В. Р. Самыгина^{3,4}, А. П. Агафонов¹

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁴Институт кристаллографии А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

*E-mail: gladysheva_av@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 18.06.2023 г.

После доработки 18.06.2023 г.

Принята к публикации 05.07.2023 г.

Пикорнаин 3С риновируса человека представляет собой ценную с точки зрения коммерческого использования цистеиновую протеазу и широко используется для удаления аффинных меток и белков слияния при очистке целевого белка. Полученный в данной работе вариант пикорнаина 3С риновируса А28 не аннотирован в базах данных NCBI, имеет идентичность в PDB 79% и не использовался ранее в белковой инженерии. Разработан протокол выделения и очистки белка для структурных исследований, а также получены начальные условия кристаллизации. Получение и анализ структуры пикорнаина 3С риновируса А28 создадут новые возможности как для проведения фундаментальных исследований по отслеживанию эволюции протеолитических ферментов, так и дизайна оптимального варианта этой протеазы.

DOI: 10.31857/S0023476123600313, EDN: HZHBKY

ВВЕДЕНИЕ

Риновирусы (HRV — human rhinovirus), относящиеся к семейству *Picornaviridae*, широко распространены в природе и являются одними из основных инфекционных агентов, вызывающих простудные заболевания по всему миру [1, 2]. Геном HRV представлен одноцепочечной РНК положительной полярности размером ~7200 нуклеотидов, заключен внутри икосаэдрического безоболочечного капсида размером ~30 нм и состоит из одной открытой рамки считывания, кодирующей 11 белков. Уникальность генома HRV заключается в использовании вирусного белка VPg для синтеза вирусной РНК. Белок VPg ковалентно связан с 5'-нетранслируемым регионом вирусной (5'UTR) РНК и является единственным вирусным белком, который, как известно, подвергается капсидированию. 5'UTR содержит обширные элементы вторичной структуры РНК, в том числе внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), который управляет кэп-независимой трансляцией вирусного генома. Вторичная структура 5'UTR РНК региона IRES взаимодействует с клеточными белками, рекрутируя рибосомы и инициируя синтез полипротеина, который далее процессируется вирусными белками — пикор-

наинами 2А и 3С с образованием как не полностью процессированных промежуточных полипротеинов, так и зрелых вирусных белков [3, 4].

Пикорнаин 3С (протеаза 3С, пикорназа 3С) относится к классу цистеиновых протеаз, гидролизует пептидную связь в белке по специфическому аминокислотному сайту Leu-Gln-Ala-Ile-Phe-Gln↓Gly-Pro между глутамином и глицином и представляет собой небольшой мономерный белок с молекулярной массой ~20 кДа. Вирусные протеазы 3С сворачиваются в два топологически эквивалентных шестицепочечных β-бочонка с протяженной неглубокой бороздкой для связывания субстрата, расположенной между ними. В протеазе 3С HRV каталитически важные аминокислотные остатки Cys-His-Glu образуют связанный кластер с общей геометрией, сходной с каталитической триадой Ser-His-Asp, обнаруженной в трипсиноподобном семействе сериновых протеаз. Высококонсервативная последовательность Gly-X-Cys-Gly-Gly в вирусных протеазах 3С служит для позиционирования Cys₁₄₇ при нуклеофильной атаке на карбонильный углерод субстрата и для ориентации NH-групп Gly₁₄₅ и Cys₁₄₇ с образованием “оксаниона”, что необходимо для стабилизации тетраэдрического переходного

состояния. Таким образом, каталитический механизм активации атакующего нуклеофила и стабилизации тетраэдрического промежуточного переходного состояния в протеазах 3С очень похож на каталитический механизм трипсиноподобных сериновых протеаз, что позволяет предположить, что вирусные протеазы 3С механически связаны с сериновыми протеазами [5, 9].

Пикорнаин 3С в настоящее время используется в белковой инженерии для отщепления аффинных меток и белков слияния благодаря высокой сайт-специфичности и активности, а также хорошей растворимости. Известно, что протеаза 3С проявляет большую активность при 4°C по сравнению с часто используемой TEV-протеазой (протеазой вируса гравировки табака) и не теряет активность в буферах и добавках, используемых при получении рекомбинантных белков [10]. Отметим, что протеаза 3С является основной мишенью для скрининга кандидатных противовирусных препаратов против HRV-инфекции, поскольку играет важную роль в репликативном цикле вируса и не имеет клеточных гомологов [11]. Таким образом, рекомбинантная 3С-протеаза может быть использована для получения рекомбинантных белков без аффинных меток и партнеров-слияния в фармацевтической и биотехнологической промышленности, а также в качестве мишени для поиска кандидатных терапевтических препаратов против HRV-инфекции.

Исследуемый в данной работе вариант HRV A28 ранее не аннотировался в базах данных NCBI. Ближайший по аминокислотной последовательности вариант пикорнаина 3С в базе данных Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org>) имеет идентичность 79% с исследуемым белком, а наиболее изученный и используемый для белковой инженерии пикорнаин 3С HRV B14 имеет идентичность с пикорнаином 3С HRV A28 приблизительно 52% согласно Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). В соответствии с этими данными изучение структуры пикорнаина 3С HRV A28 создаст новые возможности для фундаментальных исследований по отслеживанию эволюции протеолитических ферментов семейства пикорнавирусов на примере пикорнаина 3С HRV A28 и обеспечит условия для поиска оптимальных кандидатных противовирусных препаратов против риновирусной инфекции. Разработан протокол выделения и очистки белка для проведения экспериментов по кристаллизации и найдены перспективные условия для выращивания кристаллов для последующего рентгеноструктурного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор объекта для исследования. Поиск близкородственных белков, пространственные струк-

туры которых уже были решены экспериментально, выполнен с помощью NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) по базе данных PDB с использованием алгоритма blastp (protein-protein BLAST). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей выполнено в программе Unipro UGENE (“УНИПРО”, Россия) с использованием итеративного метода выравнивания Muscle. Моделирование пространственных структур вирусных белков проводили в облачной версии программы AlphaFold2 – AlphaFold2_advanced.ipynb. Качество моделей оценивали по коэффициенту достоверности для каждой аминокислоты с учетом прогнозируемой локальной разности расстояний (pLDDT) AlphaFold2 [12]. Вторичные структуры были предсказаны в ESPript (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>).

Сборка генетической конструкции. Генетическая последовательность, кодирующая протеазу 3С, получена из кДНК копии генома HRV A28 (Genbank ID: UFT26780) и клонирована совместно с партнером-слияния SUMO и N-концевой 14×His-меткой, необходимой для аффинного связывания с сорбентом Ni-NTA-сефарозой при хроматографической очистке белка. Для получения продуцента рекомбинантной пикорназы 3С был выбран штамм *E. coli* KRX, поскольку в нем используется система многоступенчатого контроля экспрессии РНК полимеразы бактериофага T7, что предотвращает фоновую экспрессию трансгенов, которая может привести к нежелательным процессам. После трансформации клеток плазмидой p-14×His-SUMO-3С был осуществлен скрининг клонов-рекомбинантов с высоким уровнем экспрессии химерного белка. По результатам скрининговых исследований сформирован и депонирован в коллекцию отдела Геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора рабочий банк штамма-продуцента *E. coli* KRX p-14×His-SUMO-3С-5.

Наработка биомассы и хроматографическая очистка. Для наработки пикорнаина 3С штамм-продуцент *E. coli* “KRX p-14×His-SUMO-3С-5” инокулировали в 250 мл жидкой питательной среде SOB, содержащей 100 мкг/мл селективного антибиотика канамицина, и культивировали при 37°C, покачивании 250 rpm в течение 12–14 ч. Индукцию экспрессии осуществляли добавлением 0.1% (v/v) L-рамнозы и 1 mM IPTG с последующим культивированием при 20°C, 250 rpm в течение 20–24 ч. Полученную биомассу гомогенизировали под высоким давлением с использованием Avestin EmulsiFlex-C3 (пятикратно, 25 000 psi (~1700 bar)). Для снижения вязкости гомогената и исключения контаминации целевого белка нуклеиновыми кислотами продуцента использовали рабочее разведение бензоназы с хлоридом магния (100 е.а./мл). Гомогенат осветляли

центрифугированием (10 000 g, 15 мин), супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Для хроматографической очистки целевого химерного белка 14×His-SUMO-3С проводили прямое нанесение фильтрата на колонку с Ni-NTA-сефарозой. Фракции с первой аффинной хроматографии (first IMAC) диализовали против реакционного буфера с добавлением SUMO-протеазы при 4°C в течение 24 ч. После этого гидролизованный белок использовали для проведения второй аффинной хроматографии (second reverse IMAC) согласно [13]. Фракции, полученные после первой и второй IMAC-хроматографии, проанализированы методом SDS-PAGE-электрофореза. Очищенный рекомбинантный белок оценивали с помощью SDS-PAGE-анализа по методу Laemmli с использованием 12% полиакриламидных сборных гелей (Invitrogen, США) в присутствии 0.1% SDS [14]. Предварительно окрашенные стандарты SeeBlue Plus 2 (Invitrogen, США) использовали в качестве стандартных белковых маркеров в диапазоне размеров от 4 до 250 кДа. Для получения активной протеазы 3С HRV A28 проведено отщепление партнера слияния SUMO и 14×His-метки, что необходимо для дальнейших кристаллографических исследований.

Для определения степени чистоты белка и олигомеризации проводили эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) на хроматографе LC-20 Prominence при следующих условиях: колонка Shodex PROTEIN KW-803, 8.0 × 300 мм, температура колонки — 25°C, подвижная фаза (ПФ) — 0.05 М NaH₂PO₄, 0.3 М NaCl, pH 6.8, скорость ПФ — 1.0 мл/мин, регистрация хроматограммы — 278 нм, концентрация белка в пробе — 0.4 мг/мл, объем пробы — 5 мкл. Концентрацию белка в образцах определяли флуоресцентным методом (Qubit Protein Assay Kit, США) в трех повторах.

Непосредственно перед кристаллизацией проводили дополнительную гель-фильтрацию с использованием колонки HiLoad 16/600 Superdex 200prep grade (GE Healthcare, Швеция) в 25 мМ Трис-Cl-буфере, содержащем 150 мМ хлорида натрия, pH 7.8. Белок концентрировали до значения 8 мг/мл с использованием центрифужного концентратора с размером пор 10 кДа (Millipore, США).

Кристаллизация белка. Подбор условий кристаллизации пикорнаина 3С на первом этапе осуществляли методом диффузии в парах (вариант “сидячей капли”) с помощью роботизированной системы кристаллизации (Douglas Instruments, Великобритания) с использованием стандартных наборов для кристаллизации глобулярных белков компаний “Hampton Research” (США): Crystal Screen HT, Index HT, PEG/Ion HT; PEGRx HT — “Anatrace” (США): TOP96 и “Molecular dimen-

sions” (Великобритания): PactPremier. Скрининг условий кристаллизации проводился в кристаллизационных низкопрофильных 96-луночных планшетах (ArtRobbins, США), при этом каждая лунка содержала три подлунки, которые использовались для варьирования концентрации белка в рамках одного условия кристаллизации. Всего было подготовлено пять планшетов при двух значениях температуры: 15 и 4°C. Соотношения белка и противораствора в каждой лунке — 1 : 1, 2 : 1 и 1 : 2, суммарный объем кристаллизационного раствора в каждой подлунке — 0.4 мкл, объем кристаллизационного противораствора, содержащего осадитель, — 50 мкл. Оптимизацию найденных условий кристаллизации проводили при температурах 15 и 4°C методом диффузии в парах (вариант “висячей капли”) в 24-луночных планшетах типа VDX фирмы “Hampton research” (США). Для этого кристаллизационные капли суммарным объемом 3 мкл, состоявшие из смеси белок : кристаллизационный противораствор в соотношении 1 : 2, 1 : 1, 2 : 1, наносили на силиконизированное стекло, герметично закрепленное над резервуаром с 500 мкл кристаллизационного противораствора, содержащего осадитель.

Просмотр результатов кристаллизационных экспериментов проводили вручную с использованием оптического микроскопа Nikon при увеличении ×200–1000 1 раз в неделю в первый месяц инкубации планшетов и 1 раз в месяц — в последующий срок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование в AlphaFold2. Несмотря на наличие в базе данных GenBank девяти аминокислотных последовательностей гена 3С HRV A28 с уровнем гомологии 100% (GenBank ID: AER92574, AER92577, UFT26780, QYI87778, UHU34959, WAK75528, QZU26640, QZU26685, UFT26750), ближайший по аминокислотной последовательности вариант пикорнаина 3С, имеющий решенную пространственную структуру в базе данных PDB, имеет идентичность 79% (PDB ID: 2XYA) с исследуемым в работе белком, а наиболее изученный и используемый для белковой инженерии пикорнаин 3С HRV B14 имеет идентичность с пикорнаином 3С HRV A28 приблизительно 52% (PDB ID: 6KYZ и 2B0F).

Для того чтобы исследовать структурное сходство и консервативность пикорнавирусных протеаз, структура пикорнаина 3С HRV A28 была предсказана с использованием программного обеспечения AlphaFold2. Прогнозируемая модель имела высокую достоверность построения структуры pLDDT = 96.3, pTM = 0.925. Пространственная структура пикорнаина 3С HRV A28 демонстрирует высокое топологическое сходство с другими пикорнаинами. Так, коэффициент схо-

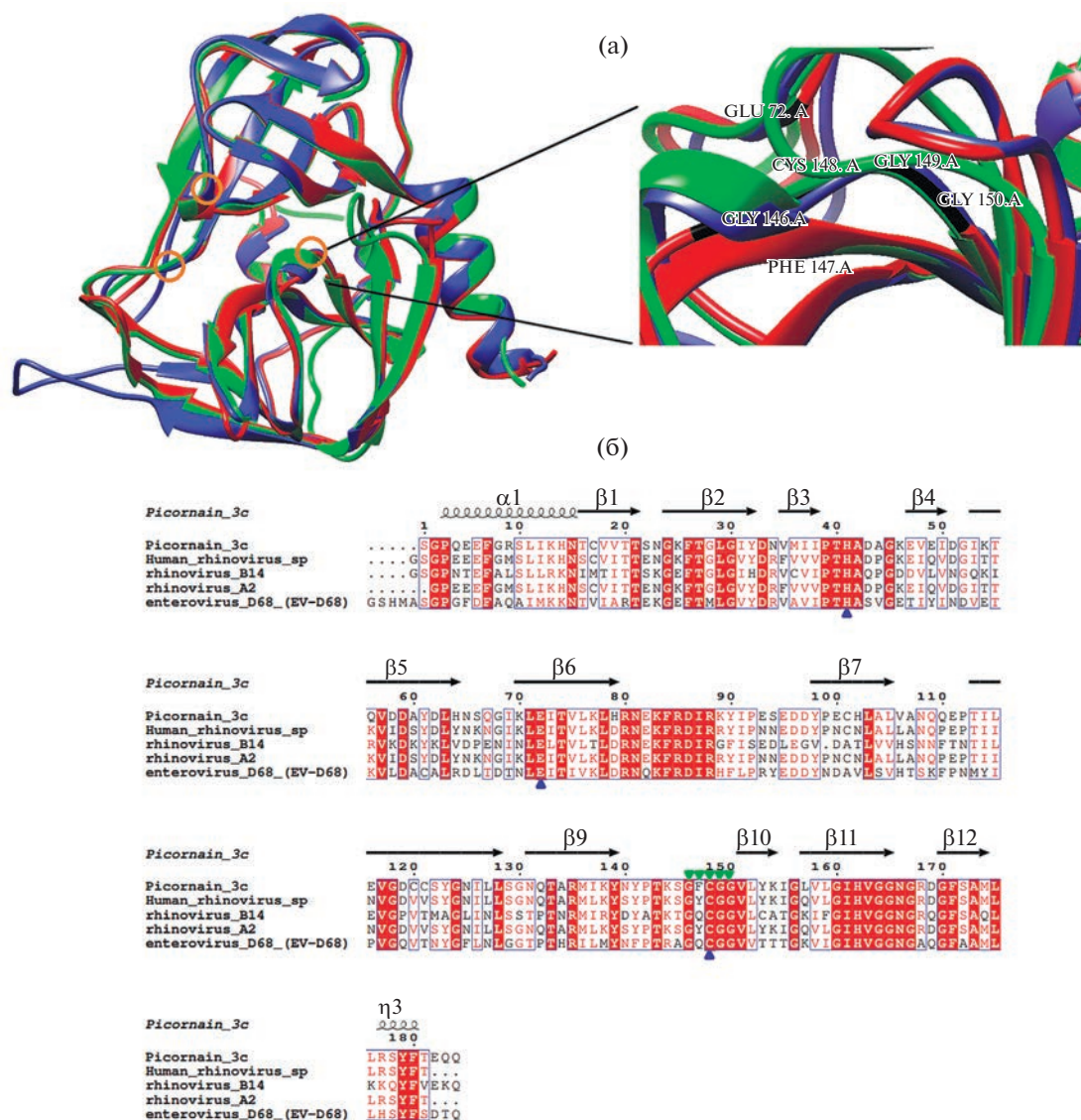


Рис. 1. Модели пикорнаинов демонстрируют высокое структурное сходство: а – наложение пространственной модели пикорнаина 3С HRV A28 (красный), пикорнаина *Human rhinovirus sp.* (PDB ID: 2XYA, синий) и пикорнаина HRV B14 (PDB ID: 6KYZ, зеленый). Оранжевыми кружками выделены позиции каталитически важных аминокислот. Отдельно вынесена структура области высококонсервативной последовательности; б – выравнивание аминокислотных последовательностей гена 3С HRV и энтеровируса D68. Для пикорнаина 3С HRV A28 указаны элементы вторичной структуры. Синими треугольниками обозначены каталитически важные аминокислоты, зелеными – высококонсервативная последовательность. Красные поля с белыми буквами указывают на строгую идентичность последовательностей.

жести TM-score составил 0.91 со структурой 2XYA, 0.93 со структурой 6KYZ и 0.95 со структурой пикорнаина энтеровируса D68 (PDB ID: 7L8H). Несмотря на то что уровень гомологии пикорнаина 3С HRV A28 с пикорнаином 3С энтеровируса D68 по аминокислотной последовательности 46%, коэффициент схожести моделей этих белков оказался наибольшим из рассмотренных. Топологически пикорнаин 3С HRV A28 представлен одной большой α -спиралью ($\alpha 1$), образованной

15 аминокислотами, и двенадцатью β -листами ($\beta 1$ – $\beta 12$) (рис. 16). Обнаружены каталитически важные остатки аминокислот Cys₁₄₉, His₄₁ и Glu₇₂, характерные для пикорнаинов, которые образуют связанный кластер аминокислот с общей геометрией, сходной с каталитической триадой Ser-His-Asp семейства трипсиноподобных сериновых протеаз (рис. 1а) [15]. Одна из аминокислот каталитического центра Cys₁₄₉ располагается в высококонсервативном регионе

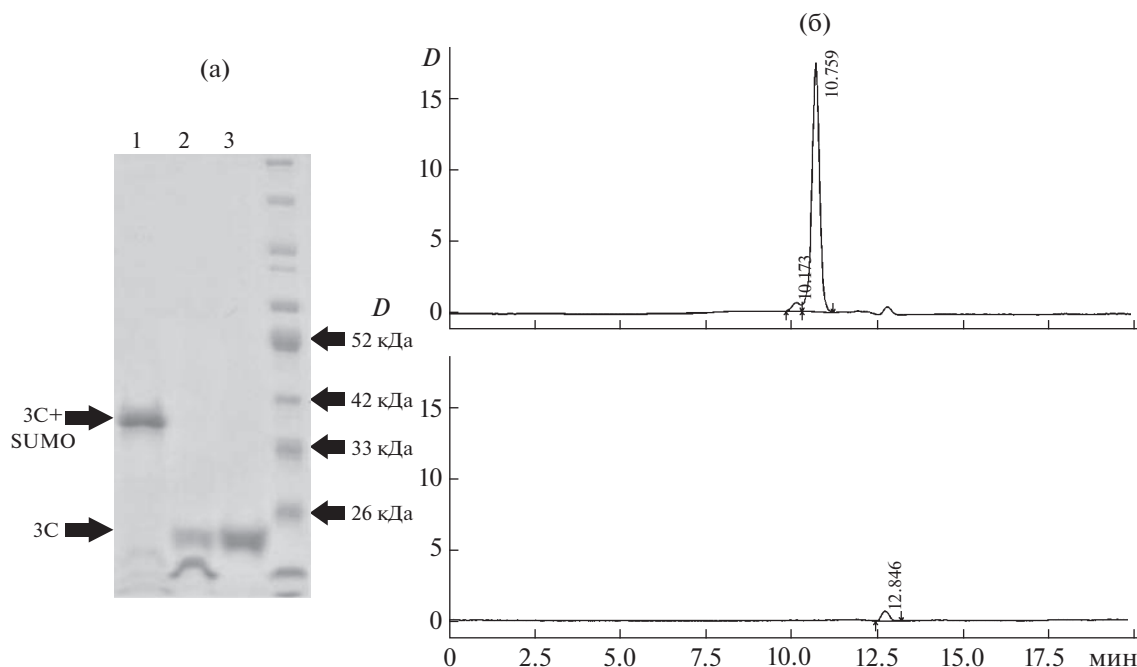


Рис. 2. Получение пикорнаина 3С HRV A28 без аффинных меток и белков слияния: а — вторая аффинная (реверс) хроматография пикорнаина 3С (1 — химерный белок 14×His-SUMO-3С до добавления SUMO-протеазы; 2 — продукты ферментативного отщепления партнера слияния SUMO; 3 — фракция белков, не связавшихся с Ni-NTA сефарозой после нанесения); б — профили эксклюзионной хроматографии препарата пикорнаина 3С (вверху) и растворителя белковой фракции (внизу).

Gly₁₄₇-**Phe**₁₄₈-Cys₁₄₉-Gly₁₅₀-Gly₁₅₁ вирусных пикорназ, который является мишенью для нуклеофильной атаки на карбонильный углерод субстрата (рис. 1а) [5]. При этом появление Phe₁₄₈ влечет изменение топологии региона. У вирусных пикорназ последовательность аминокислот Gly₁₄₇-**Phe**₁₄₈-Cys₁₄₉-Gly₁₅₀-Gly₁₅₁ образует не протяженную α-спираль, в то время как у пикорнаина 3С HRV A28 наблюдается свободная петля (рис. 1б).

Наработка и ферментативная активность. Для кристаллизации пикорнаина 3С HRV A28 потребовалось отщепление метки 14 × His-SUMO. Для этого химерный белок 14 × His-SUMO-3С подвергали протеолитическому расщеплению SUMO-протеазой, продукты гидролиза наносили на колонку с Ni-NTA-сефарозой, по результатам реверс хроматографии получен препарат рекомбинантного пикорнаина 3С HRV A28 без партнера слияния и меток. При анализе белковых фракций методом SDS-PAGE установлено, что пикорнаин 3С соответствует теоретически рассчитанной массе 20.3 кДа, а также имеет высокую степень чистоты и гомогенности (рис. 2а). Согласно проведенному эксклюзионному ВЭЖХ-анализу, в полученном образце присутствовал мажорный пик, соответствующий целевому белку (~20 кДа) с чистотой более 96%

(рис. 2б). Пики растворителя (буфера пикорнаина 3С HRV A28) при определении степени чистоты и олигомеризации белковой фракции не учитывали. Ферментативная активность пикорнаина 3С подтверждена с использованием химерного белка-субстрата SUMO-3Csite-AmilCP, представляющего собой синий хромопротеин AmilCP из кораллов *Acropora millepora* и содержащий сайт расщепления протеазы 3С в линкерном регионе после лидирующей последовательности SUMO (Leu-Gln-Ala-Ile-Phe-Gln-Gly-Pro). Для этого подготовленные разведения протеазы 3С вносили в буферный раствор, содержащий равное количество белка-субстрата (массовые соотношения 1 : 1, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 и 1 : 10 000). После инкубации при 25°C в течение 1 часа продукты гидролиза анализировали с использованием метода SDS-PAGE (рис. 3). Показано, что рекомбинантный хроматографически очищенный пикорнаин 3С HRV A28 проявляет строго специфическую протеолитическую активность в отношении модельного белка-субстрата 14 × His-SUMO-3Csite-AmilCP, содержащего сайт распознавания и расщепления LQAI FQG↓P в линкерном регионе (рис. 3).

Кристаллизация. Проведение дополнительной стадии очистки (гель-фильтрация) непосредственно перед кристаллизацией являлось важ-

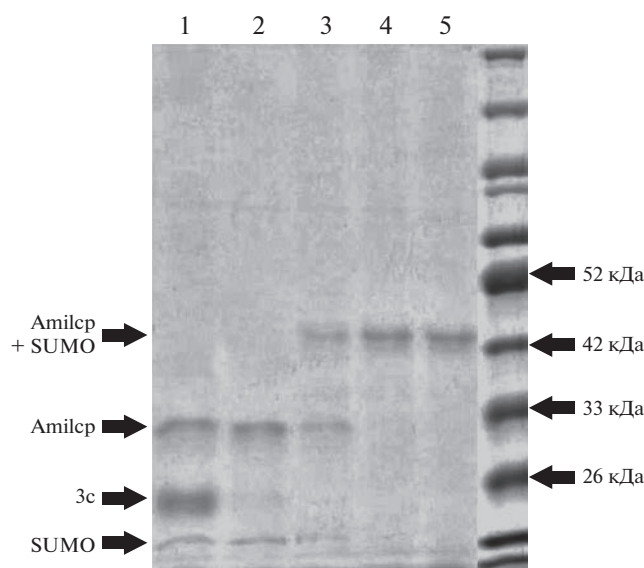


Рис. 3. Подтверждение специфической ферментативной активности пикорнаина 3С HRV A28 (1–5 – массовые соотношения субстрата к ферменту 1 : 1, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 и 1 : 10 000 соответственно).

ным фактором для получения результатов, так как позволило отделить мономер пикорнаина от агрегатов большей массы, которые составляли приблизительно половину объема образца. В результате широкого скрининга условий в большинстве кристаллизационных капель наблюдался легкий и средний гранулированный осадок, который в ряде условий при длительном времени инкубации переходил в агрегаты. В части условий были получены микрокристаллические осадки, в нескольких – мелкие одиночные кристаллы и сростки очень малого размера (линейный размер по наибольшей грани менее 15–20 мкм). На основе полученных условий провели два повтора оптимизации, суммарно – четыре планшета, каждый по 24 условия. В подавляющем большинстве условий оптимизации, даже при низких концентрациях осадителя, наблюдается выпадение легкого или среднего гранулированного осадка и микрокристаллина, в ряде условий со временем наблюдается выпадение агрегатов белка. Кристаллов, размеры которых были бы пригодны для проведения рентгеноструктурного эксперимента, не наблюдалось, однако было получено несколько перспективных условий при 15°C (табл. 1), которые после оптимизации позволят получить кристаллы для дифракционного эксперимента. В случае условий 20% ПЭГ 3350, 0.2 М хлорида кальция понадобится решить проблему образования сростков. Наиболее перспективными являются условия 2 М сульфат аммония, 0.2 М калий-натриевый тартрат, 0.1 М цитратный буфер pH 5.6 и 28% ПЭГ 400, 0.2 М хлорид кальция, 0.1 М

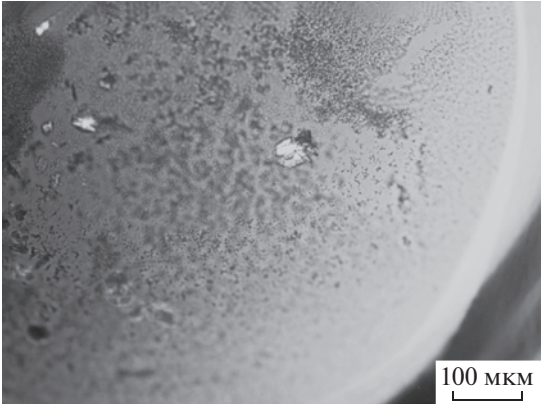
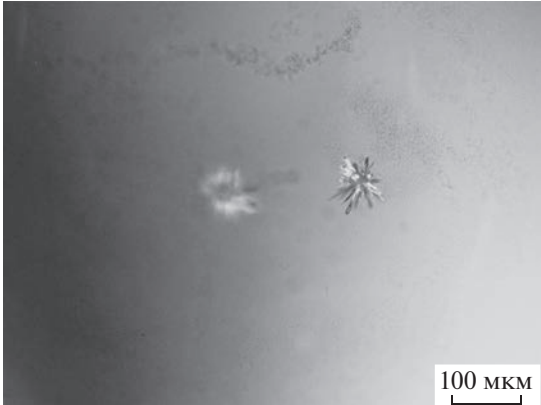
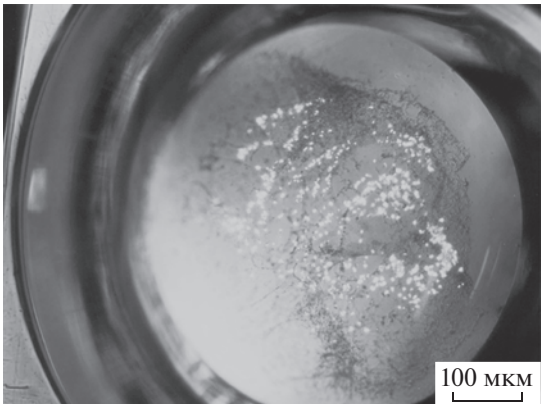
HEPES pH 7.5. В первом случае понадобится варьирование условий, позволяющее уменьшить количество зародышей при кристаллизации, получив таким образом меньшее количество кристаллов большего размера в капле. Во втором случае достаточно получить друзы большего размера, так как отдельные кристаллы возможно отщепить от друз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пикорнаин 3С риновируса человека представляет собой ценную коммерческую цистеиновую протеазу, которая может специфически распознавать короткую аминокислотную последовательность Leu-Gln-Ala-Ile-Phe-Gln↓Gly-Pro для удаления белков слияния при очистке целевого рекомбинантного белка. Белки слияния, такие как MBP (белок, связывающий мальтозу), GST (глутатион-S-трансфераза) и т.д., широко используются для облегчения экспрессии и очистки гетерологичных белков в различных клетках-хозяевах. Однако эти белки слияния обычно необходимо впоследствии удалять с помощью протеаз, чтобы свести к минимуму их потенциальные побочные эффекты в отношении целевых белков. По сравнению с другими широко используемыми коммерческими протеазами, такими как TEV-протеаза, энтерокиназа или протеаза SUMO, преимущество пикорнаина 3С заключается в высокой субстратной специфичности и протеолитической активности в широком диапазоне температур от 4 до 30°C [16]. Таким образом, пикорнаин 3С может проводить эффективные реакции удаления метки и белков слияния даже при низких температурах, когда структура и активность целевых белков в значительной степени стабилизируются, что способствует его практическому применению в научных кругах, наукоемкой промышленности, фарминдустрии и медицине.

В настоящей работе был получен оригинальный рекомбинантный пикорнаин 3С риновируса A28, показана его ферментативная активность, проведена попытка его кристаллизации и получены начальные перспективные условия кристаллизации. Моделирование пространственной структуры пикорнаина 3С в AlphaFold 2 выявило видоизменение структуры с α -спирали на свободную петлю в паттерне важных высококонсервативных аминокислот семейства пикорнаиновых протеаз. Таким образом, решение структуры пикорнаина 3С HRV A28 экспериментальными методами является актуальной задачей дальнейших исследований. Несмотря на значительный прогресс в технологии и понимании процесса роста кристаллов, кристаллизация макромолекул продолжает оставаться эмпирической наукой рациональных проб и ошибок, направляемой результатами предыдущих попыток [17]. Поэтому

Таблица 1. Перспективные условия кристаллизации пикорнаина 3С HRV A28

Условия кристаллизации	Фотографии кристаллов
0.2 М хлорид кальция 20% ПЭГ 3350	
0.2 М хлорид кальция 0.1 М HEPES 28% ПЭГ 400 pH 7.5	
0.2 М калий-натриевый тартрат 2 М сульфат аммония 0.1 М цитратный буфер pH 5.6	

работы по кристаллизации и рентгеноструктурному анализу пикорнаина 3С HRV A28, полученного в рамках проведенного исследования, будут продолжаться, перспективные условия получения кристаллов в данный момент оптимизируются.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355) в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследова-

ний и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bizot E., Bousquet A., Charpié M. et al. // Front. Pediatr. 2021. V. 22. P. 643219. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.643219>
2. Ljubin-Sternak S., Meštrović T. // Viruses. 2023. V. 15 (4). P. 825. <https://doi.org/10.3390/v15040825>

3. *Flather D., Nguyen J.H.C., Semler B.L., Gershon P.D.* // PLoS Pathog. 2018. V. 14 (8). P. e1007277. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007277>
4. *Jensen L.M., Walker E.J., Jans D.A., Ghildyal R.* // Methods Mol. Biol. 2015. V. 1221. P. 129. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1571-2_10
5. *Matthews D.A., Dragovich P.S., Webber S.E. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96 (20). P. 11000. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11000>
6. *Bjorndahl T.C., Andrew L.C., Semenchenko V., Wis-hart D.S.* // Biochemistry. 2007. V. 46 (45). P. 12945–58. <https://doi.org/10.1021/bi7010866>
7. *Cui S., Wang J., Fan T. et al.* // J. Mol. Biol. 2011. V. 408 (3). P. 449. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.03.007>
8. *Yuan S., Fan K., Chen Z. et al.* // Virol. Sin. 2020. V. 35 (4). P. 445. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00196-4>
9. *Sun D., Chen S., Cheng A., Wang M.* // Viruses. 2016. V. 8 (3) P. 82. <https://doi.org/10.3390/v8030082>
10. *Ullah R., Shah M.A., Tufail S. et al.* // PLoS One. 2016. V. 11 (4) P. e0153436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153436>
11. *Wanga Q.M., Chen S.H.* // Curr. Protein Pept. Sci. 2007. V. 8 (1). P. 19. <https://doi.org/10.2174/138920307779941523>
12. *Jumper J., Evans R., Pritzel A. et al.* // Nature. 2021. V. 596 (7873). P. 583. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
13. *de Marco A.* // Nat Protoc. 2006. V. 1 (3). P. 1538. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.289>
14. *Brunelle J.L., Green R.* // Methods Enzymol. 2014. V. 541. P. 151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
15. *Akaberi D., Båhlström A., Chinthakindi P.K.* // Antiviral Res. 2021. V. 190. P. 105074. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105074>
16. *Fan X., Li X., Zhou Y. et al.* // ACS Chem Biol. 2020. V. 15 (1). P. 63. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00539>
17. *Timofeev V., Samygina V.* // Crystals. 2023. V. 13 P. 71. <https://doi.org/10.3390/cryst13010071>

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА ТРАНСАМИНАЗЫ
D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ БАКТЕРИИ *Aminobacterium colombiense*
С D-ЦИКЛОСЕРИНОМ© 2023 г. С. А. Шилова^{1,*}, И. О. Матюта¹, Е. Ю. Безсуднова¹, М. Е. Миняев³,
А. Ю. Николаева^{1,2}, В. О. Попов¹, К. М. Бойко¹¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы
биотехнологии” РАН, Москва, Россия²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия³Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

*E-mail: zavvalovasonya@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.11.2022 г.

После доработки 08.11.2022 г.

Принята к публикации 14.11.2022 г.

D-циклосерин ингибирует пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые ферменты как обратимо, так и необратимо. Как ингибитор аланинрацемазы D-циклосерин применяется в лекарственной терапии при лечении туберкулеза. Известны несколько продуктов взаимодействия D-циклосерина и PLP в активном центре фермента. Представлена кристаллическая структура комплекса PLP-зависимой трансаминазы D-аминокислот из бактерии *Aminobacterium colombiense* (Amico) с D-циклосерином, полученная с разрешением 1.9 Å, в которой впервые обнаружен аддукт PLP и D-циклосерина с раскрытым кольцом. Кроме того, взаимодействие D-циклосерина и Amico охарактеризовано кинетическими и спектральными методами, определены разнообразные продукты взаимодействия D-циклосерина и PLP в активном центре трансаминазы, проанализирована координация аддуктов D-циклосерина и PLP в активном центре Amico. В ходе исследований установлено, что продуктами взаимодействия D-циклосерина с PLP в активном центре Amico являются несколько соединений, в том числе аддукты PLP и DCS в циклической и разомкнутой формах, оксим, образованный PMP и β-аминоокси-D-аланином, а также PMP и β-аминооксипируват.

DOI: 10.31857/S0023476123600775, EDN: HYQYFH

ВВЕДЕНИЕ

D-циклосерин ((4R)-4-амино-1,2-оксазолидин-3-он, DCS) — циклический аналог серина (рис. 1) — эффективно взаимодействует с пиридоксаль-5'-фосфатом (PLP) как в буфере, так и в активном центре PLP-зависимых ферментов, трансаминаз, аланинрацемаз и т.д. [1–4]. Ранее считалось, что DCS необратимо ингибирует PLP-зависимые ферменты с образованием ароматического аддукта гидроксиизоксазола и пиридоксамин-5'-фосфата (гидроксиизоксазол-PMP) [1, 4, 5]. Однако в настоящее время показано, что DCS может ингибировать PLP-зависимые ферменты как необратимо, так и обратимо в зависимости от условий реакции [2, 3, 6]. Реактивация фермента возможна как высокими концентрациями субстрата, так и путем вытеснения аддукта DCS и PLP избытком свободного PLP при определенных значениях pH [2, 6, 7]. В лекарственной терапии DCS относят к антибиотикам: ингибируя PLP-зависимую аланинрацемазу, DCS подавляет формирование кле-

точной стенки бактерий [8, 9]. Применяется в лечении туберкулеза [10].

Охарактеризованные масс-спектрометрически и спектральными методами аддукты DCS и PLP представляют собой разнообразные по структуре соединения и включают в себя как производные циклической формы DCS (внешний альдимин 1, кетимин 1 и гидроксиизоксазол), так и продукты раскрытия цикла в результате гидролиза амидной связи и последующей перегруппировки (внешний альдимин 2, кетимин 2 и оксим, образованный PLP и β-аминоокси-D-аланином (оксим)) (рис. 1) [2, 6]. Аддукт гидроксиизоксазол-PMP наиболее стабильная из циклических форм DCS, которая, однако, находится в равновесии с внешним альдимином 1 (рис. 1) [2]. При взаимодействии DCS с PLP в форме внутреннего альдимина в аланинрацемазе образуется аддукт гидроксиизоксазол-PMP, который затем через ряд промежуточных соединений внешний альдимин 1, внешний альдимин 2 и т.д. превращается в

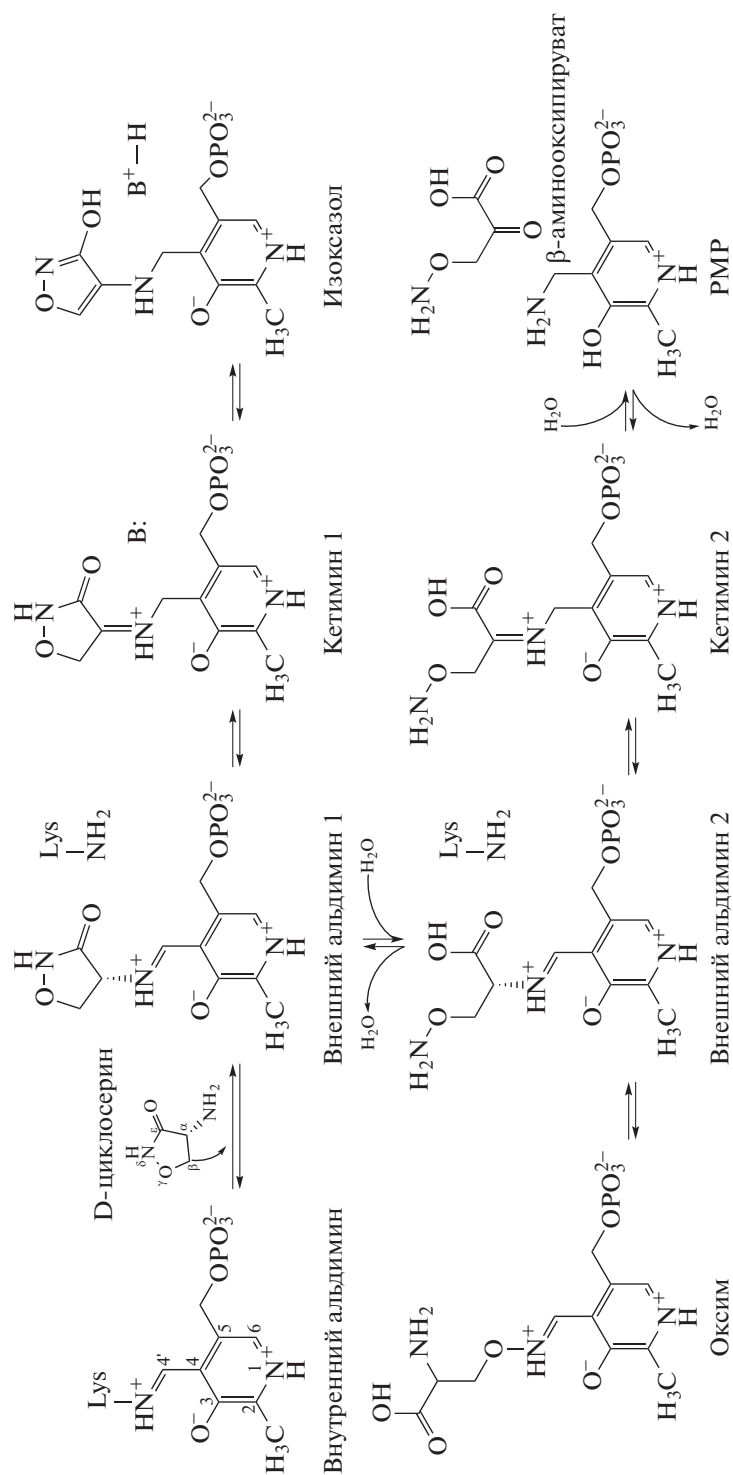


Рис. 1. Схема взаимодействия кофактора РЛР с DCS в активном центре РЛР-зависимых ферментов [4, 6].

оксим или изомеризуется в кетиминную форму и гидролизуется до РМР и β -аминооксипирувата (рис. 1) [2, 6].

Известны несколько кристаллических структур комплексов PLP-зависимых ферментов с DCS. Среди них комплексы с трансаминазой разветвленных L-аминокислот из *Mycobacterium tuberculosis* (PDB ID 5U3F), с аланинрацемазой из *M. tuberculosis* (PDB ID 1XFC) и *Streptomyces lavendulae* (PDB ID: 1VFS), а также с трансаминазой D-аминокислот из *Bacillus* sp.YM-1 (PDB ID 2DAA). Во всех структурах в активном центре ферментов находится аддукт гидроксиизоксазол-РМР. Также в результате сокристаллизации PLP-формы аланин:глиоксилат аминотрансферазы человека с DCS была получена структура фермента с кофактором в форме РМР в активном центре (PDB ID 6RV0) [6]. В настоящей работе в активном центре трансаминазы D-аминокислот из бактерии *Amicobacterium colombiense* (**Amico**) впервые обнаружен другой аддукт: соединение кофактора и DCS в разомкнутой форме в виде кетимина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование, экспрессия и очистка Amico. Нуклеотидная последовательность гена *Amico_1844* была взята из базы данных NCBI и оптимизирована для экспрессии в клетках *E. coli* с помощью Web-сервиса Optimizer (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>). На 5'- и 3'-концы последовательности добавляли сайты эндонуклеаз рестрикции NdeI и HindIII соответственно. Синтетический ген (ООО "АТГ Сервис Ген" (Санкт-Петербург, Россия)) в составе модифицированного вектора pET-21d [11] был встроен в клетки *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS. Трансформированные клетки растели в среде LB/ампициллин при 37°C до $A_{600} = 0.8$, индуцировали экспрессию 0.2 мМ изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) и инкубировали при 30°C в течение 18 ч. Далее клетки центрифугировали и ресуспендировали в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, 10% глицерина, 5 мМ β -меркаптоэтанола, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида, 0.5 М мочевины и 100 мкМ PLP, и разрушали ультразвуком. Клеточный экстракт центрифугировали при 18 500 g в течение 45 мин и наносили супернатант на колонку HisTrap HP (Cytiva, США), уравновешенную 50 мМ калий-фосфатным буфером, pH 8.0, содержащим 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида и 0.1% тритона X-100. Реконбинантный Amico с His₆TEV-тагом на N-конце элюировали линейным градиентом имидазола (20–500 мМ) в том же буфере без фенилметилсульфонилфторида и Тритона X-100. Собранную фракцию фермента инкубировали с 300 мкМ PLP при 25°C в течение 1 ч, затем добав-

ляли 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 10% глицерина, 5 мМ β -меркаптоэтанола и TEV-протеазу (1 мг на 10 мг белка), смесь инкубировали в течение 16 ч при 4°C, диализировали против 50 мМ калий-фосфатного буфера, pH 8.0, содержащего 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, 10% глицерина и 20 мкМ PLP при 25°C в течение 2 ч и далее Amico отделяли от TEV-протеазы и продуктов гидролиза повторной металл-хелатной хроматографией с помощью колонки HisTrap HP (Cytiva). Собранную фракцию Amico концентрировали и наносили на колонку Superdex 200 10/300 GL (Cytiva), уравновешенную 20 мМ HEPES-буфером, pH 8.0, содержащим 50 мМ NaCl и 100 мкМ PLP. Собранную фракцию Amico (димера по результатам гель-фильтрации) разбавляли в 20 мМ HEPES-буфере, pH 8.0, до 2 мг/мл, наносили на колонку MonoQ 10/100 GL (Cytiva), уравновешенную 20 мМ HEPES, pH 8.0, и элюировали линейным градиентом NaCl (20–500 мМ). Собранные фракции Amico переносили в 20 мМ HEPES-буфер, pH 8.0, содержащий 50 мМ NaCl, 100 мкМ PLP и 1 мМ дитиотреитола (ДТТ), и концентрировали до 17 мг/мл. Данную фракцию Amico хранили при –70°C и использовали для кристаллизации и биохимической характеристики.

Степень отщепления His₆-тага и чистоту белка анализировали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{280} = 0.615$ мл/мг·см, рассчитанный с помощью Web-сервиса ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Определение активности Amico в полной реакции трансаминирования. Активность Amico определяли в полной реакции трансаминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом в 50 мМ CHES-буфере, pH 9.0, при 60°C по накоплению продукта реакции – пирувата. За накоплением пирувата следили по сопряженной ферментативной реакции восстановления пирувата лактатдегидрогеназой (ЛДГ) из мышц кролика (Roche, США) при участии восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH). Скорость реакции определяли спектрофотометрически по наклону начального линейного участка убыви оптической плотности при 340 нм от времени. Убыль при 340 нм соответствовала окислению кофактора NADH ($\epsilon_{340}(\text{NADH}) = 6.22 \text{ мМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$). Эксперимент проводили с использованием спектрофотометра SPECTROstar Omega (BMG Labtech GmbH, Германия). За единицу ферментативной активности (U) принимали количество образованного пирувата (мкмоль) в минуту. Стандартная реакционная смесь содержала 50 мМ D-аланина,

Таблица 1. Кристаллографические данные и параметры съемки кристалла комплекса трансаминазы Amico с D-циклосерином

Пр. гр.	$P2_12_1$
$a, b, c, \text{\AA}$	61.97, 90.03, 100.29
α, β, γ , град	90.00, 90.00, 90.00
T , К	100
λ , $\text{\AA}$	0.9
Разрешение, $\text{\AA}$	21.15–1.90 (1.94–1.90)*
Число независимых рефлексов	44377 (2782)
Полнота набора, %	98.9 (94.7)
$I/\sigma(I)$	13.9 (0.5)
R_{pim} , %	5.7 (126)
$CC_{1/2}$, %	99.5 (41.7)

* В скобках приведены значения для последнего слоя высокого разрешения.

Таблица 2. Данные уточнения комплекса трансаминазы Amico с D-циклосерином

R_{fact} , %	21.9
R_{free} , %	26.2
Общий средний B -фактор	32.8
Средний B -фактор по белку	32.7
Средний B -фактор по лигандам	40.0
Средний B -фактор по растворителю	34.3
Число неводородных атомов	
Белок	4343
Лиганды	77
Растворитель	239
Всего	4659
Среднеквадратичные отклонения	
Длины связей, $\text{\AA}$	0.0116
Валентные углы, град	1.7570
График Рамачандрана	
Наиболее благоприятные, %	98.2
Допустимые, %	1.6
Код PDB	8AIE

5 мМ α -кетоглутарата, 60 мкМ PLP, 0.0025 мг/мл Amico, 0.33 мМ NADH и 4 U/мл ЛДГ. Реакцию запускали аминокислотой после прогревания реакционной смеси в течение 10 мин.

Ингибирование Amico DCS оценивали по значению концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) в стандартной реакции трансаминирования (описана выше). Концентрацию DCS варьировали в пределах 0.1–20 мМ.

Получение холоформы Amico. Amico (10 мг/мл) инкубировали с 600 мкМ PLP и 5 мМ пируватом при 25°C в течение 1 ч и далее переводили на колонке HiTrap (Cytiva) в 50 мМ CHES-буфер, pH 9.0.

Спектральный анализ взаимодействия Amico с DCS. Холоформу Amico (30 мкМ) инкубировали в 50 мМ CHES-буфере, pH 9.0, при 40°C в течение 1 ч с 30 мМ DCS. Продукты взаимодействия анализировали спектральными методами. Спектры поглощения регистрировали в диапазоне длин волн 300–500 нм с использованием спектрофотометра Evolution 300 UV-Vis (Thermo Scientific, США). Спектры флуоресценции регистрировали в диапазоне длин волн 350–570 нм при длине волны возбуждения 328 нм и в диапазоне длин волн 390–570 нм при длине волны возбуждения 380 нм с использованием спектрофлуориметра Fluoro-Max-4 (Horiba Scientific, Япония).

Кристаллизацию Amico проводили методом диффузии в парах (“висячая капля”) при 15°C. Состав противораствора: 0.2 М нитрата натрия, 0.1 М бис-трис-пропан, pH 6.5, 20% ПЭГ 3350. 17 мг/мл фермента смешивали с противораствором в отношении 1:1 (объем капли составлял 3 мкл). Кристаллы достигали максимального размера за 14 дней и представляли собой сростки неправильной огранки со средней длиной наибольшей грани ~100 мкм. Комплекс Amico с DCS получали путем настаивания кристалла холоформы в противорастворе, содержащем 100 мМ DCS, в течение 2 мин. Затем кристалл переносили в криораствор, содержащий противораствор и 20% этиленгликоля, и замораживали в парах жидкого азота.

Сбор данных, решение и уточнение. Дифракционный набор собирали при температуре 100 К на рентгеновском дифрактометре Rigaku XtaLAB Synergy-S в ИОХ РАН (Москва). Дифракционная картина фиксировалась детектором HyPix-3000. Обработку данных проводили при помощи программы CrysAlisPro [12] (табл. 1). Решение структуры проводили методом молекулярного замещения с использованием программы MOLREP [13] и структуры холоформы данного фермента (PDB ID – 8AHR) в качестве начальной модели. Для уточнения пространственной структуры использовали программу Refmac5 из комплекса CCP4 [14]. Визуальный контроль уточнения проводили в программе Coot [15]. Данные уточнения структуры приведены в табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Взаимодействие DCS с Amico. Ингибирование DCS стандартной реакции трансаминирования, катализируемой Amico, характеризовали величиной IC_{50} , которая составила 3.4 ± 1.1 мМ при 60°C в 50 мМ CHES-буфере, pH 9.0. Продукты взаимо-

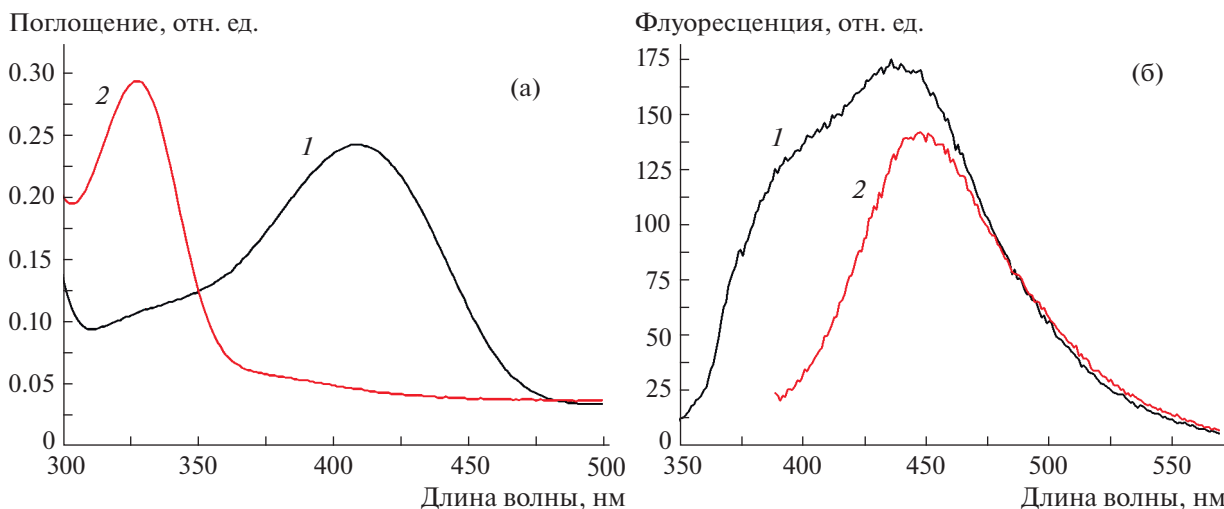


Рис. 2. Спектры поглощения и флуоресценции продуктов взаимодействия холоформы Amico с DCS: а – спектры поглощения 30 мкМ холоформы Amico (1) и 30 мкМ холоформы Amico после добавления 30 мМ DCS (2); б – спектры флуоресценции продуктов взаимодействия холоформы Amico (30 мкМ) и 30 мМ DCS при длине волны возбуждения 328 нм (1) и 380 нм (2).

действия DCS с холоформой Amico анализировали спектральными методами. Спектр поглощения холоформы Amico имеет максимум при 409 нм, соответствующий внутреннему альдиминому фермента (рис. 2). При добавлении DCS к холоформе Amico в спектре поглощения наблюдались снижение оптической плотности при 409 нм и появление максимума при 328 нм с плечом в области 380 нм (рис. 2а). Далее были проанализированы спектры флуоресценции продуктов взаимодействия DCS с холоформой Amico при длинах волн возбуждения, соответствующих максимумам на спектре поглощения – 328 и 380 нм. В спектрах флуоресценции смеси Amico с DCS наблюдались два максимума при 390 и 450 нм при длине волны возбуждения 328 нм и один максимум при 450 нм при длине волны возбуждения 380 нм (рис. 2б). Максимумы в спектре поглощения при 328 нм и в спектре флуоресценции при 390 нм (при возбуждении при 328 нм) соответствуют соединениям с sp^3 -гибридизацией C4'-атома кофактора [16], такими соединениями являются кофактор в форме пиридоксамин-5'-фосфата (PMP), аддукт гидроксиизоксазол-PMP, а также аддукты PLP и циклического или разомкнутого DCS в форме кетиминов (рис. 1). Плечо в спектре поглощения в области 380 нм и максимум в спектре флуоресценции при 450 нм соответствуют поглощению/эмиссии оксима, образованного PLP и β -аминоокси-D-аланином (рис. 1) [16]. Таким образом, из представленных на рис. 1 аддуктов PLP и DCS при взаимодействии DCS с PLP в активном центре Amico образуются кетимины (возможно кетимин 1 и кетимин 2), оксим и кофактор

в форме PMP, не исключено также образование аддукта гидроксиизоксазол-PMP.

Анализ структуры комплекса Amico с DCS. Кристаллы Amico относятся к орторомбической сингонии (пр. гр. $P2_12_12_1$). На независимую часть элементарной ячейки приходится две субъединицы фермента, образующие классический функциональный димер с двумя активными центрами [17]. Общая архитектура субъединицы Amico в комплексе с DCS совпадает с таковой у холоформы фермента (PDB ID: 8AHR) – RMSD по C α -атомам составляет 0.39 Å² (рис. 3а).

В обоих активных центрах димера Amico обнаружена электронная плотность, соответствующая аддукту кофактора PLP и DCS (рис. 3б, 3в). При взаимодействии DCS с внутренним альдимином происходит поворот плоскости кольца PLP относительно оси, проходящей через атомы N1 и C6, на 35° и 25° в сторону связываемого лиганда в субъединицах А и В соответственно (рис. 4а). Атом иминного азота отклонен от плоскости пиридинового кольца кофактора на 70° и 60° в субъединицах А и В соответственно, что исключает присутствие аддуктов в форме внутреннего альдимины [18, 19] и указывает на присутствие аддуктов – кетиминов. В субъединице А электронная плотность соответствует кетимину 1 (аддукту PLP и циклического DCS в лактамной форме, рис. 1) с заселенностью 0.65 (рис. 4б), а в субъединице В – кетимину 2 (аддукту PLP и разомкнутого DCS, рис. 1) с заселенностью 0.75 (рис. 4в). Второе состояние кофактора в обеих субъединицах одинаковое и соответствует молекуле PMP с заселенностями 0.35 и 0.25 в субъединицах А и В соответ-

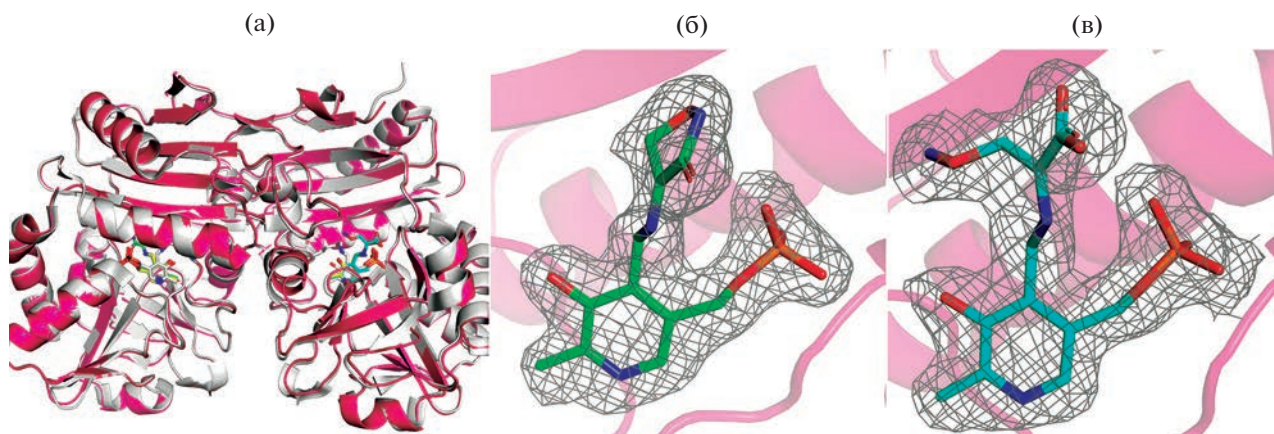


Рис. 3. Пространственная структура комплекса Amico с DCS: а — наложение функциональных димеров холоформы Amico (серый) и комплекса Amico с DCS (малиновый); б, в — электронные плотности аддуктов PLP и DCS в субъединицах А и В соответственно. Зеленым цветом показан аддукт PLP и циклического DCS, голубым — аддукт PLP и разомкнутого DCS, серым — omit-карта электронной плотности Fo-Fc с уровнем срезки 3σ .

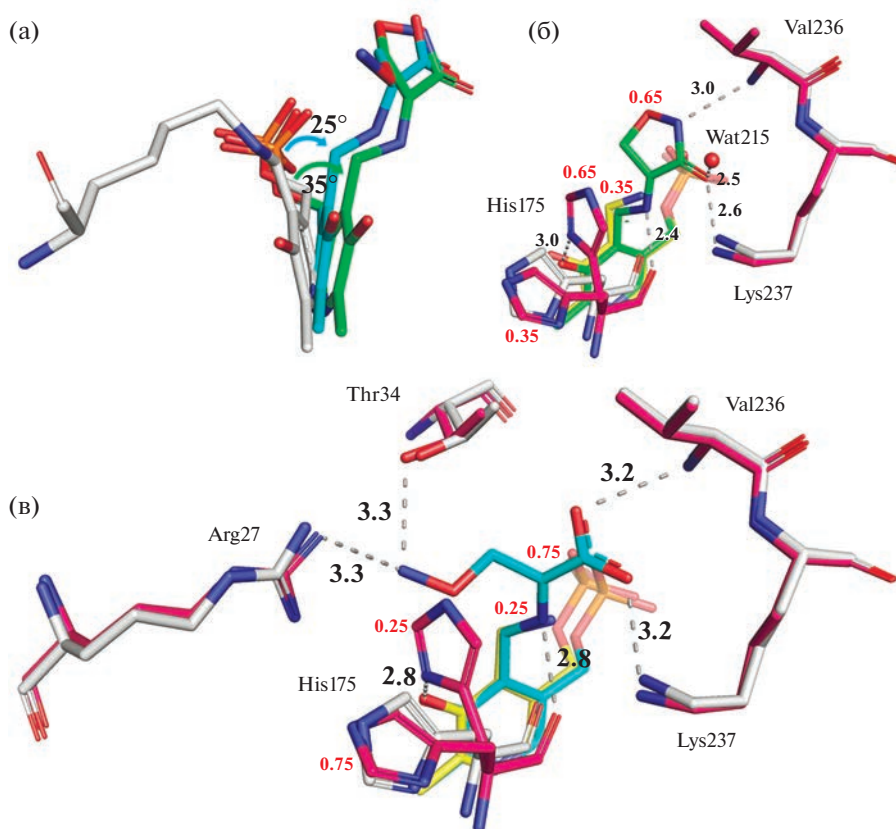


Рис. 4. Наложение пространственных структур активных центров холоформы Amico и его комплекса с DCS: а — наложение кофактора PLP в холоформе Amico и в комплексе Amico с DCS; б, в — активные центры комплекса Amico с DCS в субъединицах А и В соответственно. Серым цветом показаны аминокислотные остатки холоформы Amico, малиновым — остатки комплекса Amico с DCS, зеленым — аддукт PLP и циклического DCS, голубым — аддукт PLP и разомкнутого DCS, желтым — молекула PMP. Водородные связи показаны пунктирной линией, а соответствующие расстояния приведены в Å. Цифрами указана заселенность соответствующего состояния.

ственно (рис. 4б, 4в). По-видимому, за время настаивания кристалла холоформы Amico в растворе DCS амидная группа последнего частично

гидролизуется в активном центре фермента с образованием разомкнутого внешнего альдимины (внешний альдимин 2), который затем частично

превращается в кетимин 2 и гидролизуется до молекулы РМР (рис. 1).

Полученная структура комплекса Amico с DCS позволяет проанализировать связывание кетими- на 1 и кетимина 2 в активном центре фермента. Положения аминокислотных остатков в актив- ном центре в комплексе Amico с DCS не измени- лись по сравнению с холоформой Amico, за ис- ключением остатка His175 (рис. 4б, 4в). Для него наблюдается двойное положение боковой группы в каждой субъединице. В субъединице А состоя- нию кофактора в форме кетимина 1 соответствует положение His175, направленное в активный центр, тогда как состоянию кофактора в форме РМР соответствует положение His175, направ- ленное из активного центра (рис. 4б). В субъеди- нице В состоянию кофактора в форме кетимина 2 соответствует положение His175, направленное из активного центра, тогда как состоянию кофак- тора в форме РМР соответствует положение His175, направленное в активный центр (рис. 4в). Иминный азот кетимина в обеих субъединицах координируется карбонильной группой основ- ной цепи остатка His175. В случае кетимина 1 кар- бонильный кислород лактамной формы DCS ко- ординируется молекулой воды и ϵ -аминогруппой остатка Lys237, аминогруппа оксазолидинового кольца координируется атомом азота основной цепи остатка Val236 (рис. 4б). В субъединице В остатки Val236 и Lys237 также координируют карбоксильную группу кетимина 2, а здесь остат- ки Arg27 и Thr34 образуют водородные связи с аминогруппой разомкнутого кетимина, pK_a кото- рой составляет около 5 [20] (рис. 4в). В условиях кристаллизации Amico при pH 6.5 аминогруппа разомкнутого кетимина депротонирована и мо- жет образовывать водородную связь с гуанидино- вой группой аргинина.

Таким образом, при взаимодействии Amico с DCS в активном центре фермента образуются не- сколько промежуточных соединений, в том числе аддукты PLP и DCS в циклической и разомкну- той формах, продукт перегруппировки внешнего альдими- на 2 — оксим, образованный PLP и β -аминоокси-D-аланином, и РМР. Кетимины (ад- дукты PLP и DCS в циклической и разомкнутой формах) были обнаружены в активном центре Amico. Остатки активного центра Amico Arg27, Thr34, His175, Val236 и Lys237 вовлечены в связы- вание аддуктов PLP и DCS и могут быть функци- онально важными для катализа Amico.

Работы по экспрессии и выделению белка, а также уточнению пространственной структуры и ее анализу выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00164). Работы по кристаллизации и рентгено- структурному эксперименту выполнены при под-

держке Министерства науки и высшего образова- ния Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peisach D., Chipman D.M., Van Ophem P.W. et al. // J. Am. Chem. 1998. V. 120. P. 2268. <https://doi.org/10.1021/ja973353f>
2. Chiara C. de, Homšak M., Prosser G.A. et al. // Nat. Chem. Biol. 2020. V. 16. P. 686. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0498-9>
3. Soper T.S., Manning J.M. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 4263. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69428-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69428-7)
4. Amorim Franco T.M., Favrot L., Vergnolle O., Blanchard J.S. // ACS Chem. Biol. 2017. V. 12. P. 1235. <https://doi.org/10.1021/acschembio.7b00142>
5. Braunstein A.E. // The Enzymes / Ed. Boyer P.D. London: Academic Press, 1973. P. 379.
6. Dindo M., Grottelli S., Annunziato G. et al. // Biochem. J. 2019. V. 476. P. 3751. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190507>
7. Soper T.S., Jones W.M., Lerner B. et al. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 3170. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)40367-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40367-X)
8. Strominger J.L., Ito E., Threnn R.H. // J. Am. Chem. Soc. 1960. V. 82. P. 998. <https://doi.org/10.1021/ja01489a058>
9. Walsh C.T. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 2393. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)81624-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)81624-1)
10. Caminero J.A., Sotgiu G., Zumla A., Migliori G.B. // Lancet Infect. Dis. 2010. V. 10. P. 621. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70139-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70139-0)
11. Boyko K., Gorbacheva M., Rakitina T. et al. // Res. Commun. 2014. V. 71. P. 24. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14025333>
12. Agilent. CrysAlisPRO. Agilent Technologies UK Ltd, 2013.
13. Vagin A., Teplyakov A. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 22. <https://doi.org/10.1107/S09074444909042589>
14. Murshudov G.N., Skubak P., Lebedev A.A. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 355. <https://doi.org/10.1107/S09074444911001314>
15. Emsley P., Cowtan K. // Acta Cryst. D. 2004. V. 60. P. 2126. <https://doi.org/10.1107/S09074444904019158>
16. Beeler T., Churchich J.E. // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 5267. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)33156-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)33156-3)
17. Bezsudnova E.Y., Boyko K.M., Nikolaeva A.Y. et al. // Biochimie. 2019. V. 158. P. 130. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.12.017>
18. Marković-Housley Z., Schimer T., Hohenester E. et al. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 236. P. 1025. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1996.01025.X>
19. Okada K., Hirotsu K., Hayashi H., Kagamiyama H. // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 7453. <https://doi.org/10.1021/BI010384L>
20. Khomutov A.R., Vepsäläinen J.J., Shvetsov A.S. et al. // Tetrahedron. 1996. V. 52. P. 13751. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(96\)00836-8](https://doi.org/10.1016/0040-4020(96)00836-8)

ДИФРАКЦИЯ И РАССЕЯНИЕ
ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

УДК 539.219.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОРМЫ СПИРАЛЬНОЙ ЧАСТИЦЫ ПО ДАННЫМ
МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ:
МОДИФИКАЦИЯ АЛГОРИТМА “ИМИТАЦИИ ОТЖИГА”© 2023 г. В. А. Григорьев^{1,*}, П. В. Конарев¹, В. В. Волков¹¹Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

*E-mail: vasily.grigorev.1996@mail.ru

Поступила в редакцию 09.06.2023 г.

После доработки 05.07.2023 г.

Принята к публикации 05.07.2023 г.

Модифицированный алгоритм “имитации отжига”, реализованный в программе DAMMINV, позволяющий получать 10–15 различных моделей наночастицы, приближающих данные малоуглового рентгеновского рассеяния. Основой метода является режим перемежающихся весовых коэффициентов целевой функции, в котором балансируются вклады от штрафных коэффициентов, отвечающих за реалистичность модели, и вклад от невязки между экспериментальной и модельной кривыми рассеяния. Исследовано влияние шума на кривых рассеяния на качество восстановления трехмерной формы спирали, а также проведено сравнение результатов с полученными стандартными программами. Метод протестирован на модельных данных, свободных от шума и с наложением пуассоновского шума на примере спиральной частицы с толщиной витков, сопоставимой с характерным размером пространства между ними. Проведен сравнительный анализ восстановленных моделей с 3D-формами, полученными алгоритмами “имитации отжига” в стандартном режиме работы.

DOI: 10.31857/S0023476123600295, EDN: FZZKKV

ВВЕДЕНИЕ

Малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР) является мощным экспериментальным методом, позволяющим изучать структуру и динамику макромолекул, наночастиц, полимерных соединений, пористых материалов в масштабе от 1 до 200 нм. МУРР позволяет извлекать информацию о размере, форме, ориентации и взаимодействии структурных элементов наночастиц [1]. Поиск 3D-формы частицы в случае монодисперсной системы проводится по одномерным данным МУРР, измеренным в ограниченном угловом диапазоне. Отсюда вытекают такие проблемы, как неоднозначность определения формы и плохая обусловленность задачи поиска решения. В настоящий момент доступны различные пути решения данных проблем. В случае использования метода случайного поиска можно решать задачу десятки раз при одних и тех же начальных условиях и кластеризовать результаты по схожим признакам, как это делает, например, программа DAMCLUST [2].

Для поиска формы частицы распространенным является метод “имитации отжига” [3], который реализован в программе DAMMIN [4], а также в ее глубокой модификации DAMMIF [5], отличающейся тем, что максимальный размер ча-

стицы не ограничивается при поиске и трехмерная сетка модели является динамической величиной. Существуют и другие подходы, например в [6, 7] использована аппроксимация сферическими гармониками, которая в некоторых случаях может обеспечить однозначность восстановления формы [7], если число независимых параметров, описывающих форму, невелико (8–10) и больше числа шенноновских каналов N_{sh} ($N_{sh} = s_{max} D_{max} / \pi$, где s_{max} — максимальный модуль вектора рассеяния, D_{max} — максимальный размер частицы [8]). При этом число угловых отсчетов должно быть не меньше числа параметров. Однако в реальных данных из-за наличия шумов проблема однозначности возникает снова [7]. В [9] методом итеративного поиска структурных факторов вычислена электронная плотность различных биологических макромолекул. В [10] использовали метод машинного обучения на экспериментальных данных МУРР и автокодировщик 3D-моделей белков, обученный сжимать информацию о форме частицы в векторы 200-мерного пространства, которые оптимизируются с использованием генетических алгоритмов для построения 3D-моделей, приближающих данные МУРР.

Несмотря на разнообразие методов восстановления 3D-формы наночастиц по данным МУРР, проблему неоднозначности решений удается ограничить, а в некоторых случаях решить путем многократного запуска алгоритмов со случайными стартовыми параметрами модели. Работа [11] посвящена алгоритму поиска последовательного определения набора моделей формы частицы с одной стартовой случайной модели. В этом случае модифицированный режим работы алгоритма “имитации отжига” позволяет периодически варьировать параметры процедуры поиска таким образом, чтобы последовательно получить 10–15 потенциально различных моделей, соответствующих различным локальным минимумам целевой функции, включающей в себя невязку между экспериментальной и теоретической кривыми рассеяния и слагаемые, обеспечивающие компактность и связность модели. Находимые формы частиц нередко сильно зависят от баланса вкладов штрафных членов и, несмотря на близкие значения критерия качества подгонки к данным, могут в силу математической неоднозначности решения значительно различаться. Такое число моделей необходимо получать для того, чтобы была возможность выбирать из них те, которые наиболее соответствуют реальной форме частицы по другим косвенным данным. Однако из-за новизны метода имеется ряд требующих дополнительного исследования вопросов, таких как информация об оптимальном значении адаптированных параметров и о применении метода для поиска сложных форм частиц, например, имеющих высокую степень анизотропии с пропорциями 1 : 5–1 : 10. Отметим, что в [12] частично был решен вопрос нахождения оптимальных значений параметров модифицированного алгоритма “имитации отжига”, таких как число шенноновских каналов и степень весовой функции, на которую взвешивается кривая рассеяния, для спиральных структур.

Настоящая работа посвящена сравнительному анализу модифицированного (DAMMINV [11]) и стандартного алгоритмов “имитации отжига” (DAMMIN и DAMMIF) на примере трехвитковой спирали с толщиной витков, сопоставимой с характерным размером пространства между ними, а именно расстоянием между витками и внутренним диаметром. Такая геометрия усложняет восстановление трехмерной формы, что делает ее привлекательной для исследования. Также рассмотрено влияние уровня статистического шума в данных МУРР на реконструкцию 3D-формы спирали.

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ АЛГОРИТМ “ИМИТАЦИИ ОТЖИГА”

Форма частицы в программе DAMMIN и ее модификациях представляется в виде плотно упа-

кованных однородных шариков, размещенных в узлах гексагональной упаковки. Теоретическая кривая рассеяния рассчитывается по формуле Дебая:

$$I_{\text{mod}}(s) = n\Phi^2(sa) \left[1 + \frac{2}{n} \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \frac{\sin sr_{ij}}{sr_{ij}} \right], \quad (1)$$

где n , a – число и радиус шариков модели, r_{ij} – расстояние между центрами шариков, $\Phi^2(sa)$ – интенсивность рассеяния одним шариком [1]:

$$\Phi(t) = 3 \frac{\sin t - t \cos t}{t^3}, \quad t = sa. \quad (2)$$

Для ускорения расчетов расчет интенсивности рассеяния проводится с помощью математического аппарата сферических гармоник, в ряд по которым раскладывается амплитуда (2) до 20–50 номера гармоники [4].

Для стартовой модели рассчитывается целевая функция от вектора параметров $\mathbf{X}$:

$$\Phi(\mathbf{X}) = w_R R + w_D P_D + w_L P_L + w_C P_C + \dots,$$

где w_i – весовые коэффициенты, P_D , P_L , P_C – штрафы, отвечающие соответственно за разрывность, рыхлость частицы и отклонение центра тяжести частицы от центра области поиска, R – значение невязки между экспериментальной и теоретической кривыми рассеяния:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^N [(I_{\text{exp}}(s_i) - \xi I_{\text{mod}}(s_i)) W(s_i)]^2}{\sum_{i=1}^N [I_{\text{exp}}^2(s_i) W^2(s_i)]}, \quad (3)$$

где $\xi = (I_{\text{exp}} I_{\text{mod}}) / \|I_{\text{exp}}\|^2$ – шкалирующий множитель, $W(s)$ – весовая функция:

$$W(s) = \begin{cases} s^n, & n = 0, 1, 2, 3, 4 \\ \text{если} & s > s|_{\max[I_{\text{exp}}(s)s^n]}, \\ 0.5 \left\{ s^n + \frac{\max[I_{\text{exp}}(s)s^n]}{I_{\text{exp}}(s)} \right\} & \\ \text{если} & s \leq s|_{\max[I_{\text{exp}}(s)s^n]}. \end{cases}$$

Целевая функция минимизируется с помощью алгоритма “имитации отжига” в режиме переключения весовых коэффициентов, что и составляет основу модификации алгоритма (подробнее в [11]). В этом режиме после достижения минимума целевой функции весовые коэффициенты меняются так, чтобы на нечетных итерациях преобладала минимизация невязки (2), а на четных – минимизация вклада штрафных членов. Таким образом, после каждой температурной итерации рельеф целевой функции меняется, и текущее значение вектора $\mathbf{X}$ соответствует ненулевому градиенту целевой функции, что провоцирует

поиск нового минимума. К финальной итерации генерируется ансамбль из 10–15 моделей с наименьшими значениями целевой функции при некоторой комбинации весовых коэффициентов, каждую из которых можно рассматривать как исковую.

В данной работе начальные значения весовых коэффициентов брали следующие: вес штрафа за разрывность $w_D = 7.5 \times 10^{-4} - 1.5 \times 10^{-2}$, вес штрафа за рыхлость $w_L = 6.0 \times 10^{-3} - 6.0 \times 10^{-2}$. Степень весовой функции $n = 1.5, 2.0$. Данные значения лежат в диапазоне оптимальных значений, который был получен опытным путем, а также является результатом исследования [12]. Остальные параметры процедуры поиска установлены по умолчанию, определенные опытным путем на начальном этапе модификации алгоритма. В качестве частицы со сложной формой выбрана круговая спираль из трех витков с закругленными концами. Параметры модели следующие: шаг – 55 Å, высота – 165 Å, внешний и внутренний диаметры – 100 и 40 Å, толщина витка спирали – 30 Å, радиус шариков – 2.2 Å. Интенсивность рассеяния от модели была рассчитана по формуле (1) и взята в качестве экспериментальной на угловом диапазоне, соответствующем числу шенноновских каналов $N_{sh} = 28$. Шум на интенсивность накладывали в виде комбинации гауссовского и пуассоновского шумов согласно алгоритмам [13, 14], что соответствует системам регистрации большинства используемых рентгеновских детекторов. Для гауссовского шума, моделирующего шум системы регистрации, дисперсия была $\sigma = 0.5\%$ (отн.), для пуассоновского – 1, 3, 5%. При этом согласно критерию Дарбина–Ватсона [15, 16] (который оказался равным 1.9, 2.0, 1.95 соответственно) последовательность полученных значений шумов является случайной с вероятностью не менее 98%. Качество реконструкции модели оценивали с помощью критерия NSD (normalized spatial discrepancy) [17], количественно отражающего сходство двух структурных моделей, предварительно выравненных между собой по минимальному среднеквадратичному расстоянию (в идеальном случае $NSD = 0$, при полном несоответствии $NSD \gg 1$). В данной работе сходство оценивали между теоретической и восстановленной спиралями. Среди семи решений, полученных с помощью программы DAMMINV, выбиралось то, которое имеет наилучшее значение NSD.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эталонное значение NSD не равно нулю, поскольку радиусы шариков теоретической и восстановленной спиралей различаются. Теоретическая кривая была рассчитана от модели, содержащей 7800 шариков радиусом 2.2 Å, тогда как при

восстановлении формы спирали методом имитации отжига радиус шарика выбирался равным 3.5 Å. Это связано с тем, что использование слишком большого числа шариков малого радиуса приводит не только к существенному увеличению времени поиска, но и к увеличению числа локальных минимумов, т.е. к увеличению числа вариантов решений. В данной работе эталонное значение NSD между точными моделями спиралей (с радиусом шариков 2.2 и 3.5 Å) составляет 0.4504. На рис. 1 представлены графики зависимости значений NSD от уровня пуассоновского шума для спиралей, реконструированных при различных параметрах алгоритма: весе штрафов за разрывность и рыхлость, а также степенях весовой функции $W(s)$. Видно, что добавление шума при любом из заданных уровней повышает значение NSD (за исключением отдельных точек), т.е. решения ухудшаются. Однако при определенных значениях весов штрафов NSD достаточно близко к теоретическому (кривая 3 при уровне шума 1% на рис. 1а и кривые 4, 1 при уровне шума 1 и 3% соответственно на рис. 1б). Такое неоднозначное следствие наложения шума объясняется тем, что шум, с одной стороны, может приводить к смещению математического ожидания решения, с другой – расширяет коридор приближения теоретической кривой рассеяния к экспериментальной, что, возможно, сглаживает профиль целевой функции и облегчает поиск глобального экстремума. При этом диапазон возможных решений покрывает истинное решение, к которому алгоритм все еще может приблизиться. На рис. 2 для сравнения показаны значения NSD моделей, полученных с помощью программ DAMMIN и DAMMIF с параметрами по умолчанию ($w_D = w_L = 0.003$, $W \sim s^{-4}$ и $w_D = 0$, $w_L = 0.01$, $W \sim s^{-4}$ соответственно). Для DAMMINV показаны значения, усредненные по всем решениям, приведенным на рис. 1. Очевидно, что модифицированный алгоритм справляется с восстановлением данной спирали намного лучше, чем стандартные программы. На рис. 3 показаны наилучшие восстановленные модели среди полученных при разных уровнях шума с помощью программ DAMMIN и DAMMIF, а также наилучшие восстановления с помощью программы DAMMINV для каждого уровня шума. Соответствующие кривые рассеяния (теоретическая и модельные) отображены на рис. 4. Несмотря на хорошее соответствие кривых рассеяния, рассчитанных с помощью программ DAMMIN ($R_F = 3.61 \times 10^{-3}$), DAMMIF ($R_F = 2.2 \times 10^{-3}$) и DAMMINV ($R_F = 1.08 \times 10^{-3}$, $R_F = 1.15 \times 10^{-3}$, $R_F = 0.95 \times 10^{-3}$, $R_F = 1.58 \times 10^{-3}$ для кривых 3–6 на рис. 4), только последняя программа с достаточной точностью позволяет описать теоретическую модель, в то время как DAMMIN и DAMMIF позволяют восстанов-

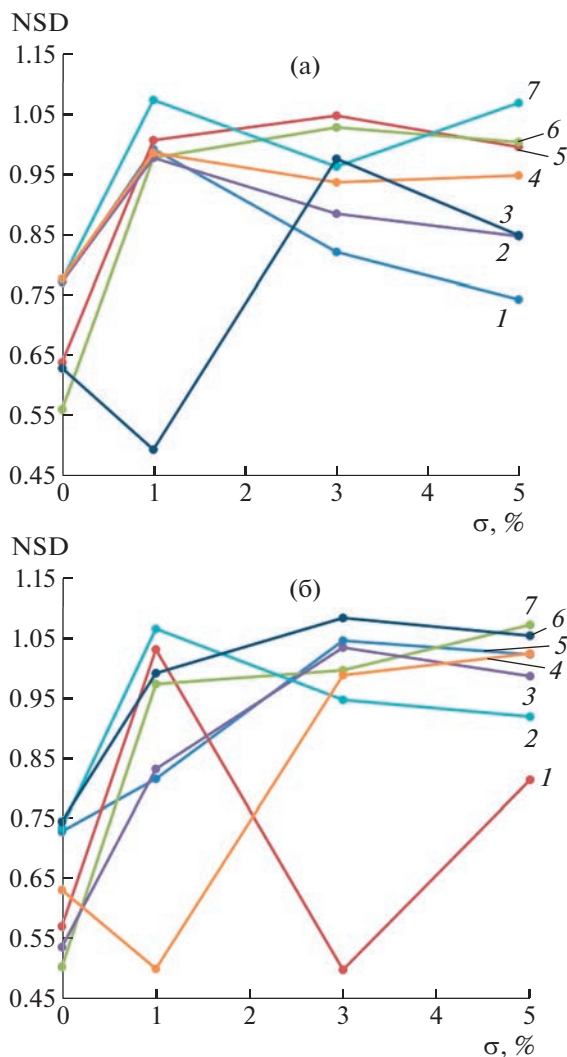


Рис. 1. Значения NSD для спиралей, восстановленных с помощью программы DAMMINV: а – весовая функция $W = s^{1.5}$, веса w_D , w_L : 1 – 0.005, 0.054, 2 – 0.003, 0.02, 3 – 7.5×10^{-4} , 0.03, 4 – 7.5×10^{-4} , 0.06, 5 – 0.005, 0.015, 6 – 0.003, 0.06, 7 – 0.0015, 0.012; б – $W = s^2$, веса w_D , w_L : 1 – 0.005, 0.048, 2 – 0.003, 0.036, 3 – 0.003, 0.042, 4 – 0.0015, 0.03, 5 – 0.015, 0.042, 6 – 0.0015, 0.02, 7 – 0.005, 0.036.

ливать не похожие на спираль структуры. Отметим, что для данных без шума и с пуассоновским шумом 1 и 3% спирали восстанавливаются практически идеально, тогда как для данных с шумом 5% на восстановленной модели (модель 7 на рис. 3) угадываются только некоторые характерные признаки спирали, а именно верхний и центральный витки, что указывает на неплохой результат, однако требующий повторного уточнения модели. Таким образом, наличие пуассоновского шума при числе точек на кривой рассеяния ~ 1000 – 2000 лишь незначительно влияет на хорошее качество восстановления структуры с помощью программы DAMMINV, которую не удастся восстановить

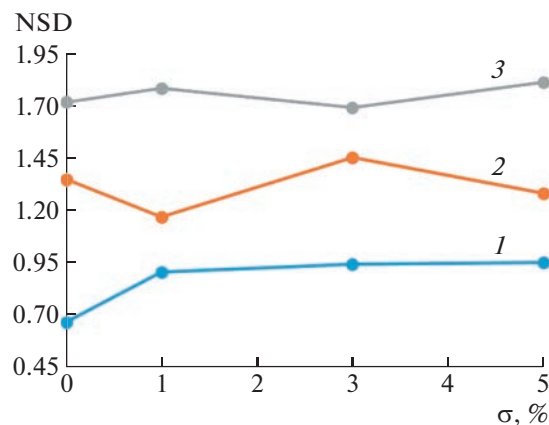


Рис. 2. Значения NSD по результатам расчетов с помощью программ DAMMINV (1), DAMMIN (2), DAMMIF (3). Для DAMMINV показаны значения, усредненные по данным на рис. 1.

программами DAMMIN и DAMMIF со значениями весов штрафов, задаваемыми по умолчанию. Несмотря на то что наличие умеренного уровня шума должно усложнять процесс восстановления

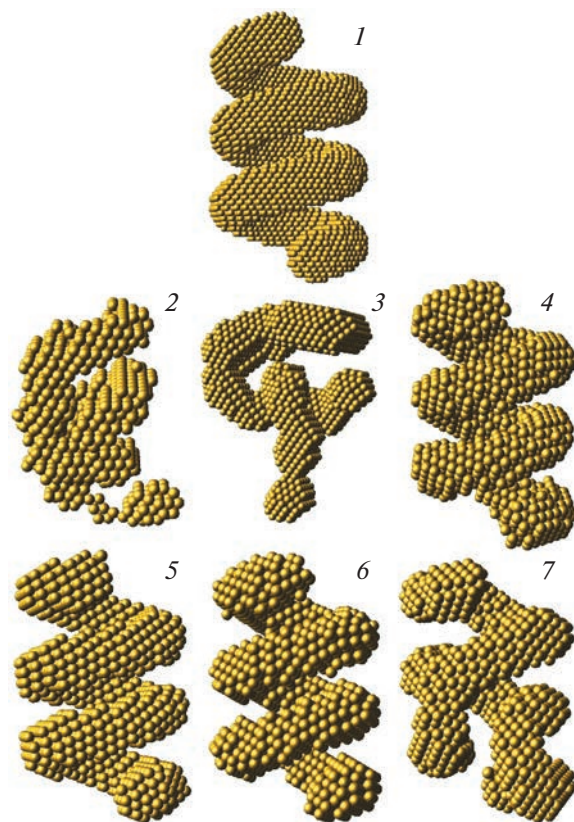


Рис. 3. Теоретическая (1) и восстановленные спирали с помощью программ DAMMIN (2), DAMMIF (3), DAMMINV (наилучшие решения): 4 – без шума, $W = s^2$, $w_D = 0.005$, $w_L = 0.036$, NSD = 0.50; 5 – $\sigma = 1\%$, $W = s^{1.5}$, $w_D = 7.5 \times 10^{-4}$, $w_L = 0.03$, NSD = 0.49; 6 – $\sigma = 3\%$, $W = s^2$, $w_D = 0.005$, $w_L = 0.048$, NSD = 0.50; 7 – $\sigma = 5\%$, $W = s^{1.5}$, $w_D = 0.005$, $w_L = 0.054$, NSD = 0.74.

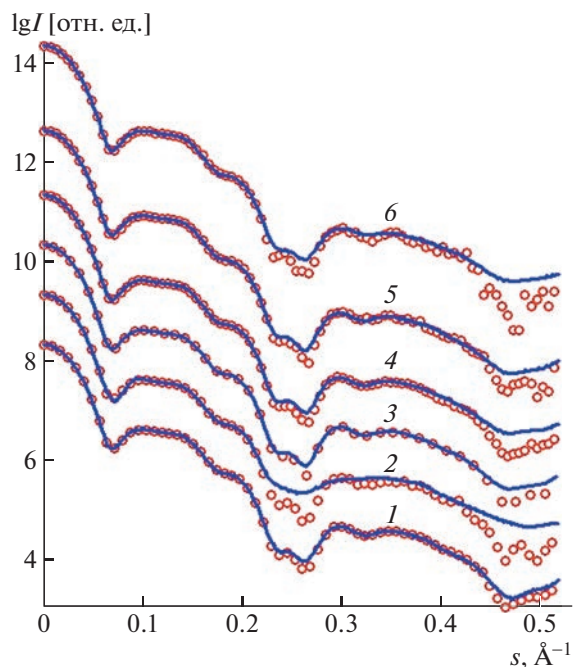


Рис. 4. Теоретические (кружки) и модельные (линии) кривые рассеяния: модельные кривые 1–6 ($R_F = 3.61 \times 10^{-3}$, 2.2×10^{-3} , 1.08×10^{-3} , 1.15×10^{-3} , 0.95×10^{-3} , 1.58×10^{-3}) соответствуют моделям 2–7 на рис. 3 соответственно.

модели, модифицированный алгоритм “имитации отжига” эффективно работает и в таких условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализировано восстановление спиральной структуры с помощью модифицированного алгоритма “имитации отжига” (DAMMINV), основанного на режиме перемежающихся штрафных весов целевой функции, и проведено сравнение с результатами, полученными программами DAMMIN и DAMMIF при стандартных параметрах поиска. Трехмерная форма спирали была восстановлена по модельным данным рассеяния без шума, а также с наложением пуассоновского шума с относительным уровнем 1, 3 и 5% и дополнительного гауссовского шума с уровнем 0.5%. Показано, что DAMMIN и DAMMIF при использовании параметров по умолчанию недостаточно эффективно восстанавливают пространственную форму спирали, тогда как DAMMINV позволяет получать решения, близкие к истинной модели для каждого уровня шума, рассмотренного в работе. Однако вопрос выбора оптималь-

ных параметров для того или иного уровня шума, определяющих целевую функцию, остается открытым и является предметом для дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Свергун Д.И., Фейгин Л.А. Рентгеновское и малоугловое рассеяние. М.: Наука, 1986. 280 с.
2. Petoukhov M.V., Franke D., Shkumatov A.V. et al. // J. Appl. Cryst. 2012. V. 45. P. 342. <https://doi.org/10.1107/S0021889812007662>
3. Kirkpatrick S., Gelatt C.D., Vecchi M.P. // Science. 1983. V. 220. P. 671. <https://doi.org/10.1126/science.220.4598.671>
4. Svergun D.I. // Biophys J. 1999. V. 78. P. 2879. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77443-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77443-6)
5. Franke D., Svergun D.I. // J. Appl. Cryst. 2009. V. 42. P. 342. <https://doi.org/10.1107/S0021889809000338>
6. Svergun D.I., Stuhrmann H.B. // Acta Cryst. A. 1991. V. 47. P. 736. <https://doi.org/10.1107/S0108767391006414>
7. Svergun D.I., Volkov V.V., Kozin M.B. et al. // Acta Cryst. A. 1996. V. 52. P. 419. <https://doi.org/10.1107/S0108767396000177>
8. Shannon C.E., Weaver W. The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press, 1949. 125 p.
9. Grant T.D. // Nature Methods. 2018. V. 15. P. 191. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4581>
10. He H., Liu C., Liu H. // iScience. 2020. V. 23. 100906.
11. Волков В.В. // Кристаллография. 2021. Т. 66. С. 793. <https://doi.org/10.31857/S0023476121050234>
12. Григорьев В.А., Конарев П.В., Волков В.В. // Успехи в химии и химической технологии. 2022. Т. 36. С. 53.
13. Marsaglia G., Tsang W.W. // SIAM J. Sci. Stat. Comput. 1984. V. 5. P. 349. <https://doi.org/10.1137/0905026>
14. Devroye L. // Computing. 1981. V. 26. P. 197. <https://doi.org/10.1007/BF02243478>
15. Durbin J., Watson G.S. // Biometrika. 1950. V. 37. P. 409. <https://doi.org/10.1093/biomet/37.3-4.409>
16. Durbin J., Watson G.S. // Biometrika. 1951. V. 38. P. 159. <https://doi.org/10.2307/2332325>
17. Kozin M., Svergun D. // J. Appl. Cryst. 2001. V. 34. P. 33. <https://doi.org/10.1107/S0021889800014126>

ДИФРАКЦИЯ И РАССЕЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

УДК 539.26

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПРОФИЛЕЙ ИНТЕНСИВНОСТИ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ ОТ ДВУХ КОНФОРМАЦИОННЫХ СОСТОЯНИЙ 3-ИЗОПРОПИЛМАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ С ПОМОЩЬЮ ЭВОЛЮЦИОННОГО ФАКТОРНОГО АНАЛИЗА

© 2023 г. П. В. Конарев^{1,2,*}, В. В. Волков^{1,2}

¹Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: peter_konarev@mail.ru

Поступила в редакцию 10.05.2023 г.

После доработки 25.05.2023 г.

Принята к публикации 25.05.2023 г.

Проведено моделирование разделения перекрывающихся вкладов в интенсивность малоуглового рассеяния от молекул 3-изопропилмалатдегидрогеназы из *Thermus thermophilus*, находящихся в растворе в двух конформационных состояниях, при использовании хроматографической колонки, присоединенной к измерительной кювете синхротронной станции малоуглового рентгеновского рассеяния. По теоретическим наборам малоугловых данных, к которым был добавлен пуассоновский шум в пределах 3–5%, восстановлены профили интенсивности рассеяния от открытой и закрытой форм молекул фермента методом эволюционного факторного анализа. Таким образом, подтверждена эффективность работы данного алгоритма при разделении вкладов компонентов в случае смесей, состоящих из частиц с одинаковой молекулярной массой.

DOI: 10.31857/S0023476123600155, EDN: XRTPYF

ВВЕДЕНИЕ

Малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР) является универсальным структурным методом исследования биологических макромолекул в растворе [1], позволяющим восстанавливать форму макромолекул в монодисперсных системах при разрешении $\sim 10\text{--}20$ Å. В последнее время в экспериментах МУРР широко применяется встроенная онлайн хроматографическая колонка (SEC-SAXS, SEC – Size Exclusion Chromatography, SAXS – Small-angle X-ray Scattering или МУРР), что помогает выделить сигнал от индивидуальных компонентов в белковых смесях или переходных комплексах. Однако даже при использовании SEC-SAXS-подхода не всегда удается полностью разделить компоненты и такие данные трудно интерпретировать.

Существуют разные подходы к решению задачи восстановления профилей рассеяния отдельных компонентов по данным МУРР, в частности это использование хемометрических методов [2] и эволюционного факторного анализа (EFA – Evolving Factor Analysis или ЭФА) [3, 4]. На основе последнего алгоритма разработали программу EFAMIX [5], которая позволяет в автоматическом режиме обрабатывать наборы SEC-SAXS данных

от белковых смесей и восстанавливать профили рассеяния от компонентов. Эффективность работы алгоритма была проверена на ряде теоретических и экспериментальных примеров в зависимости от количества компонентов, уровня шума в данных, степени асимметрии и соотношения амплитуд пиков концентрационных профилей компонентов для случая олигомерной белковой смеси. В частности, было показано, что по мере увеличения числа компонентов смеси увеличивается пороговое значение шума, выше которого восстановление индивидуальных профилей становится затруднительным.

Поскольку эффективность работы алгоритма ЭФА имеет определенные ограничения, зависящие от степени перекрывания концентрационных профилей компонентов, то в ряде случаев для определения вариантов “окон присутствия” компонентов и проверки результатов восстановления профилей рассеяния компонентов более удобно использовать интерактивный режим моделирования SEC-SAXS-данных. Это можно сделать с помощью программы CHROMIXS [6], ее графический интерфейс содержит специальное меню, задающее конфигурацию вызова для программы EFAMIX [5, 7].

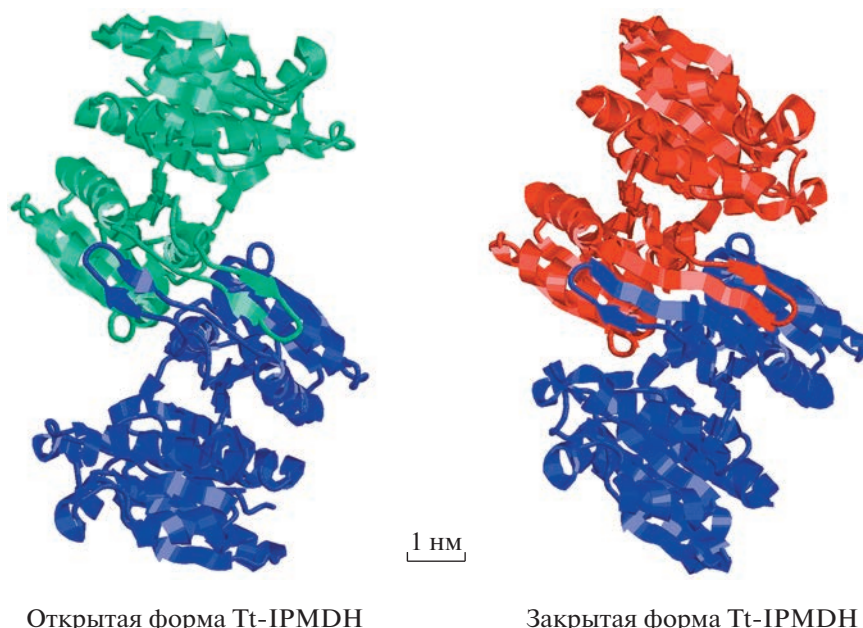


Рис. 1. Кристаллографические модели фермента Tt-IPMDH дикого типа (PDB ID: 2Y3Z) и его комплекса с субстратами Mn^{2+} , IPM и NADH (PDB ID: 4F7I). Ось симметрии второго порядка направлена перпендикулярно плоскости рисунка. Мономерные части структуры гомодимера выделены разными цветами.

Отметим, что обычно при использовании хроматографической колонки удастся разделять компоненты, молекулярные массы которых различаются в 2 и более раз. Например, это может быть олигомерная белковая смесь, содержащая мономеры, димеры и олигомеры более высоких порядков. В этом случае профили рассеяния от компонентов смеси сильно отличаются друг от друга (как по скорости спада кривых интенсивности рассеяния, так и по положению максимумов/минимумов на них). Но возникает вопрос, насколько эффективно будет работать алгоритм ЭФА, если кривые рассеяния достаточно близки друг к другу и соответствуют двум конформационным состояниям одного и того же белка.

В настоящей работе исследована такая белковая смесь с равными молекулярными массами компонентов на примере открытой (неактивной) и закрытой (активной) форм фермента 3-изопропилмалатдегидрогеназы (IPMDH – 3-isopropylmalate dehydrogenase) из *Thermus thermophilus* (Tt) [8].

СТРУКТУРА ФЕРМЕНТА 3-ИЗОПРОПИЛМАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Tt-IPMDH относится к классу β -гидроксикислотных окислительных декарбоксилаз и катализирует окисление и декарбоксилирование (2R,3S)-3-изопропилмалата (IPM) до 2-оксо-4-метилпентаноата в присутствии NAD и двухвалентного катиона (Mn^{2+} или Mg^{2+}) в биосинтетическом пути лейцина бактерий. Ранее были получены кри-

сталлографические модели Tt-IPMDH дикого типа (PDB ID: 2Y3Z) (открытая форма) и его комплекса с субстратами Mn^{2+} , IPM и NADH (PDB ID: 4F7I) (закрытая форма) [9, 10] (рис. 1). Они представляют собой димеры с общей молекулярной массой ~74 кДа, при этом каждый мономер состоит из двух примерно равных по размеру доменов. Данные модели были использованы для моделирования набора данных SEC-SAXS. Теоретические кривые рассеяния от моделей, рассчитанные с помощью программы CRY SOL [11], представлены на рис. 2. Кривая от открытой фор-

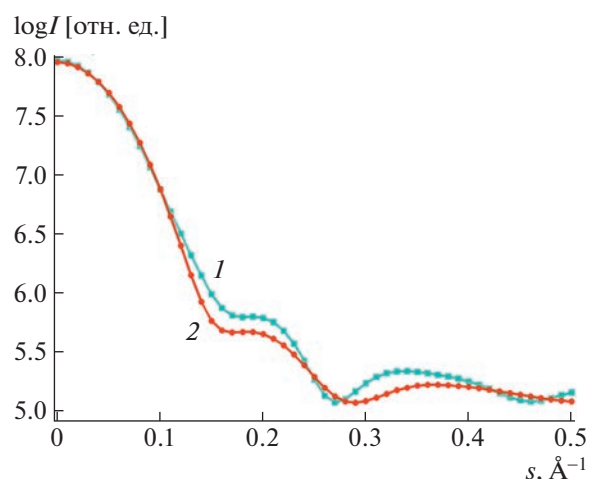


Рис. 2. Теоретические кривые рассеяния, рассчитанные от открытой (1) и закрытой (2) форм фермента Tt-IPMDH с помощью программы CRY SOL.

мы фермента Tt-IPMDH содержит более ярко выраженное “плечо” в угловом диапазоне $s = 0.15\text{--}0.25 \text{ \AA}^{-1}$ по сравнению с закрытой формой. В то же время радиусы инерции обоих структур близки и отличаются друг от друга всего на $1.5 \text{ \AA}$ ($R_g = 26.7 \text{ \AA}$ для закрытой формы и $R_g = 28.2 \text{ \AA}$ для открытой структуры). Ранее эксперименты МУРР подтвердили частичное закрытие доменов фермента Tt-IPMDH в присутствии ионов Mn^{2+} и Mg^{2+} , причем полученные данные хорошо приближались смесью активной и неактивной форм фермента [12].

МЕТОД ЭВОЛЮЦИОННОГО ФАКТОРНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ АНАЛИЗА НАБОРА ДАННЫХ МУРР, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ

Эволюционный факторный анализ — это модельно-независимый подход для анализа матриц данных, составленных из одномерных кривых (в рассматриваемом случае данных SEC-SAXS) от многокомпонентных систем, в которых наблюдается последовательное, но неполное временное разделение компонентов.

Набор данных SEC-SAXS, состоящий из нескольких профилей рассеяния, снятых в разные моменты времени, описывается матрицей $\mathbf{A} = \{A_{ik}\} = \{I^{(k)}(s_i)\}$ ($i = 1, \dots, N$, $k = 1, \dots, K$, где N — число экспериментальных точек, K — число кривых МУРР, например общее число временных кадров, $s = 4\pi \sin \theta / \lambda$ — модуль вектора рассеяния, 2θ — угол рассеяния, λ — длина волны рентгеновского излучения. С помощью сингулярного разложения (SVD — Singular Value Decomposition) эта матрица может быть представлена как $\mathbf{A} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T$, где матрица $\mathbf{S}$ диагональная, а столбцы ортогональных матриц $\mathbf{U}$ и $\mathbf{V}$ — собственные векторы матриц $\mathbf{A}\mathbf{A}^T$ и $\mathbf{A}^T\mathbf{A}$ соответственно [13]. Основная идея алгоритма ЭФА заключается в том, чтобы проследить за рангом матрицы данных $\mathbf{A}$ в зависимости от количества принятых во внимание временных кадров. Для этого проводят SVD-разложение набора данных в прямом и обратном (временных) направлениях с последовательным увеличением размера матрицы данных. Далее по графикам зависимости сингулярных значений матрицы $\mathbf{S}$ от числа включенных в матрицу кривых рассеяния оценивают временные “окна присутствия” компонентов, когда соответствующие сингулярные значения начинают резко расти выше некоторой базовой линии или резко снижаться, приближаясь к базовой линии.

Примем во внимание, что матрица данных имеет вид $\mathbf{A} = \mathbf{I}\mathbf{C}$, где столбцы матрицы $\mathbf{I}$ представляют собой профили рассеяния компонентов, а матрица концентрации $\mathbf{C}$ выражается как

$\mathbf{C} = (\mathbf{U}^T\mathbf{I})^{-1}\mathbf{S}\mathbf{V}^T = \mathbf{R}\mathbf{V}^T$, где $\mathbf{R}$ — так называемая матрица вращения размером $M \times M$, где M — число компонентов в исследуемой системе. Последняя матрица неизвестна, но может быть найдена с помощью информации об окнах присутствия компонентов, полученной на предыдущем этапе. Взяв только те элементы сингулярных векторов $\mathbf{V}^T$ и матрицы $\mathbf{C}$, которые находятся вне диапазона концентрационного окна m -го компонента, можно последовательно восстановить один за другим столбцы матрицы $\mathbf{R}$, а затем вычислить элементы матрицы $\mathbf{C}$ [3]. Последним шагом алгоритма ЭФА является расчет матрицы $\mathbf{I}$, который проводится с использованием псевдо-обратной матрицы Мура–Пенроуза $\mathbf{C}^{-1}$, умноженной на матрицу данных $\mathbf{A}$.

Описанный выше неитеративный метод нахождения матрицы вращения не имеет ограничений на получаемые значения матрицы концентраций $\mathbf{C}$ и в некоторых случаях может приводить к отрицательным значениям концентраций, когда необходимо перепроверять автоматическую оценку “окон присутствия” компонентов, сканируя различные временные области и сравнивая полученные результаты. Однако альтернативные итеративные методы оценки матрицы $\mathbf{R}$, накладывающие ограничения на положительность матрицы $\mathbf{C}$ в процессе поиска, не всегда сходятся и имеют риск “застрять” в локальных минимумах, далеких от истинного решения.

РАЗДЕЛЕНИЕ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ВКЛАДОВ В ИНТЕНСИВНОСТЬ МУРР ОТ ОТКРЫТОЙ И ЗАКРЫТОЙ ФОРМ ФЕРМЕНТА Tt-IPMDH С ПОМОЩЬЮ АЛГОРИТМА ЭФА

Взяв известные структуры фермента Tt-IPMDH, рассчитали набор данных SEC-SAXS в виде линейной комбинации их теоретических кривых рассеяния с большим временным перекрытием пиков выхода компонентов (рис 3а). Поскольку любые реальные экспериментальные данные содержат шум, то необходимо было соответствующим образом добавить его к теоретическим наборам данных SEC-SAXS. Современные пиксельные 2D-детекторы (например, Pilatus, Eiger и др.) считаются счетчиками одиночных фотонов, и регистрируемые сигналы подчиняются статистике Пуассона. При этом во время процедуры моделирования шума проводить вычитание буфера не требуется, так как сумма двух случайных величин с пуассоновским распределением также будет иметь пуассоновское распределение. Однако необходимо учесть распространение ошибок при азимутальном усреднении двумерных данных, для чего использовали алгоритм генерации пуассоновского псевдослучайного шума, описанный в [14]. Расчет распространения ошибок при ази-

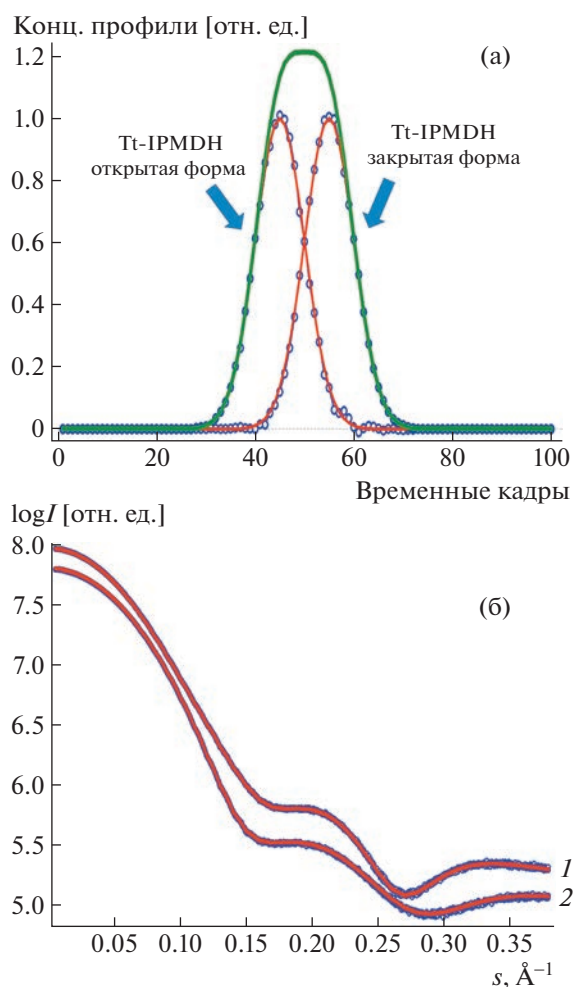


Рис. 3. Восстановление вкладов компонентов в интенсивность рассеяния по модельному набору данных SEC-SAXS с добавлением пуассоновского шума на уровне 5% с помощью алгоритма ЭФА. Концентрационные профили компонентов открытой и закрытой форм фермента Tt-IPMDH, теоретические (заданные) профили показаны сплошными линиями, профили, восстановленные с помощью программы EFAMIX, — кружками. Суммарный (оггибающий) концентрационный профиль показан сплошной линией (а). Теоретические (сплошные линии) и восстановленные программой EFAMIX (кружки) профили рассеяния открытой и закрытой форм фермента Tt-IPMDH. Профили рассеяния от открытой (1) и закрытой (2) форм фермента Tt-IPMDH смещены по вертикали для лучшей визуализации (б).

мутальном усреднении проводился для 2D-детектора с числом пикселей 2500×2500 . Для получения одномерных кривых рассеяния с различным отношением сигнал/шум исходные теоретические кривые масштабировали на коэффициент, соответствующий стандартным отклонениям пуассоновского шума в 1, 3, 5 и 10% в области максимальной интенсивности (начальная часть одномерной кривой). Рассматривая такие кривые как математические ожидания интенсивности,

для каждого пикселя 2D-детектора были рассчитаны псевдослучайные реализации пуассоновского шума. После этого значения интенсивности были усреднены в азимутальном направлении. Рассмотренные в работе уровни шума можно классифицировать как низкий шум (1%, что соответствует 10^4 фотонам в области, близкой к области прямого пучка на детекторе), умеренный (3 и 5% соответствуют 10^3 и 4×10^2 фотонам) и высокий (10% для 10^2 фотонов).

Для полученных наборов данных SEC-SAXS удалось с высокой точностью восстановить профили рассеяния двух конформационных состояний фермента с помощью программы EFAMIX в случае низкого и умеренного уровня шума (в пределах 1–5%), что подтверждает высокий потенциал метода ЭФА для разделения перекрывающихся вкладов компонентов в реальных наборах данных SEC-SAXS (рис. 36). При высоком уровне шума (10%) кривые рассеяния от открытой и закрытой форм фермента становятся уже практически неразличимыми, и в этом случае метод ЭФА не позволяет провести корректное разделение вкладов компонентов в интенсивность рассеяния.

Отметим, что в настоящее время использование хроматографических колонок, установленных непосредственно перед кюветой, входит в практику типичного оснащения синхротронных и даже лабораторных малоугловых станций. Разделение фракций с одинаковой молекулярной массой можно осуществлять за счет введения солевого градиента в буферном растворе, используя метод ионно-обменной хроматографии [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализированы модельные данные SEC-SAXS от белковой смеси двух конформационных состояний фермента Tt-IPMDH. Показано, что при наличии умеренного шума в данных на уровне 3–5% можно осуществить разделение вкладов в интенсивность малоуглового рассеяния отдельных компонентов смеси даже при наличии существенного перекрытия концентрационных профилей выхода компонентов из хроматографической колонки. Полученный результат демонстрирует высокую эффективность метода ЭФА при анализе данных SEC-SAXS от многокомпонентных систем.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 годы (соглашение № 075-15-2021-1355 от 12 октября 2021 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Svergun D.I., Koch M.H.J., Timmins P.A., May R.P.* Small angle X-ray and neutron scattering from solutions of biological macromolecules. Oxford University Press, 2013. 358 p.
2. *Herranz-Trillo F., Groenning M., van Maarschalkerweerd A. et al.* // *Structure*. 2017. V. 25. P. 5. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.10.013>
3. *Keller H.R., Massart D.L.* // *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 1992. V. 12. P. 209. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(92\)80002-L](https://doi.org/10.1016/0169-7439(92)80002-L)
4. *Hopkins J.B., Gillilan R.E., Skou S.J.* // *J. Appl. Cryst.* 2017. V. 50. P. 1545. <https://doi.org/10.1107/S1600576717011438>
5. *Konarev P.V., Graewert M.A., Jeffries C.Y. et al.* // *Protein Sci.* 2022. V. 31. P. 269. <https://doi.org/10.1002/pro.4237>
6. *Panjikovich A., Svergun D.I.* // *Bioinformatics*. 2018. V. 34. P. 1944. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx846>
7. *Konarev P.V., Volkov V.V.* // *Physics of Atomic Nuclei*. 2022. V. 85. P. 2127. <https://doi.org/10.1134/S1063778822090198>
8. *Hayashi-Iwasaki Y., Oshima T.* // *Methods Enzymol.* 2000. V. 324. P. 301. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)24240-7](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)24240-7)
9. *Graczer E., Merlin A., Singh R.K. et al.* // *Mol. Biosyst.* 2011. V. 7. P. 1646. <https://doi.org/10.1039/C0MB00346H>
10. *Pallo A., Olah J., Graczer E. et al.* // *FEBS J.* 2014. V. 281. P. 5063. <https://doi.org/10.1111/febs.13044>
11. *Svergun D.I., Barberato C., Koch M.H.J.* // *J. Appl. Cryst.* 1995. V. 28. P. 768. <https://doi.org/10.1107/S0021889895007047>
12. *Graczer E., Konarev P.V., Szimler. T. et al.* // *FEBS Lett.* 2011. V. 585. P. 3297. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.013>
13. *Golub G.H., Reinsch C.* // *Numer. Math.* 1970. V. 14. P. 403. <https://doi.org/10.1007/bf02163027>
14. *Ahrens J.H., Dieter U.* // *ACM Trans Math Software*. 1982. V. 8. P. 163. <https://doi.org/10.1145/355993.355997>

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 575.112

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕДКРИСТАЛЛИЗАЦИОННОГО РАСТВОРА ЛИЗОЦИМА МЕТОДОМ УСКОРЕННОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

© 2023 г. А. С. Ивановский^{2,*}, И. Гарипов², Ю. В. Кордонская^{1,2}, В. И. Тимофеев^{1,2},
М. А. Марченкова^{1,2}, Ю. В. Писаревский^{2,1}, Ю. А. Дьякова¹, М. В. Ковальчук^{1,2}

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника РАН”, Москва, Россия

*E-mail: a. Iwanowski@gmail.com

Поступила в редакцию 20.07.2023 г.

После доработки 17.08.2023 г.

Принята к публикации 17.08.2023 г.

С помощью метода ускоренной молекулярной динамики проведено моделирование поведения димера, выделенного из кристаллической структуры тетрагонального лизоцима. Моделируемое время составило 240 нс. Проведено сравнение полученных данных с данными, полученными ранее с применением классической молекулярной динамики. Показано, что исследуемый димер стабилен в обоих экспериментах, однако метод ускоренной молекулярной динамики позволил выявить дополнительные конформационные изменения молекул лизоцима.

DOI: 10.31857/S0023476123600635, EDN: HJUXNC

ВВЕДЕНИЕ

Белки являются одними из основных макромолекул, участвующих в биологических процессах. Функции белков в живых клетках крайне многообразны. Ферменты являются катализаторами, участвующими в различных биохимических реакциях. Ряд белков имеют транспортную функцию. Один из ярких примеров таких белков — гемоглобин. Некоторые белки имеют, например, сенсорную, двигательную, опорную и другие функции. Такое многообразие функций белков определяется тем, что их трехмерные структуры также весьма многообразны. Этим определяется важность исследования пространственных структур белков, знание их структуры важно как с фундаментальной, так и с практической точки зрения.

Пространственные структуры белков помогают установить механизм их функционирования, а также могут быть использованы для разработки лекарственных средств или создания биокатализаторов с заданными свойствами [1]. Основным экспериментальным способом установления пространственных структур белков является рентгеноструктурный анализ (РСА). Методом РСА установлено ~85% белков, депонированных в банк белковых данных [2]. Основным ограничением этого метода является необходимость получения достаточно совершенного кристалла белка. Несмотря на значительный прогресс последних лет, белковая кристаллизация остается весьма трудоемкой, а также в большей степени эмпирической

и наименее прогнозируемой стадией структурного исследования, направляемой результатами предыдущих попыток. Из-за доступности и простоты кристаллизации лизоцима, выделенного из куриного яйца, он часто используется как модельный объект для исследования механизмов кристаллизации белков [3]. Обнаружено [4], что в предкристаллизационном растворе лизоцима образуются его олигомеры, являющиеся прекурсорами кристаллов белка.

В исследовании процессов кристаллизации белков используется, в том числе, ряд подходов, основанных на молекулярной динамике (МД). Так, в [5, 6] оценивалось изменение свободной энергии при формировании кристаллических контактов и изменении концентрации осадителя. В [7, 8] исследовалась стабильность кристаллов белка в зависимости от концентрации и видов ионов осадителя, а также от зарядов аминокислотных остатков. В ряде работ предпринимались попытки исследования динамики решетки в кристалле белка [9]. Исследовались особенности динамики белка в кристаллическом состоянии по сравнению с раствором [10]. В [11, 12] оценивалась стабильность кластеров-прекурсоров кристаллов лизоцима и протеиназы К.

Несмотря на широкое применение подходов к изучению процессов кристаллизации белков, основанных на МД, данные подходы имеют существенное ограничение: расчет МД для сравнительно больших систем является ресурсоза-

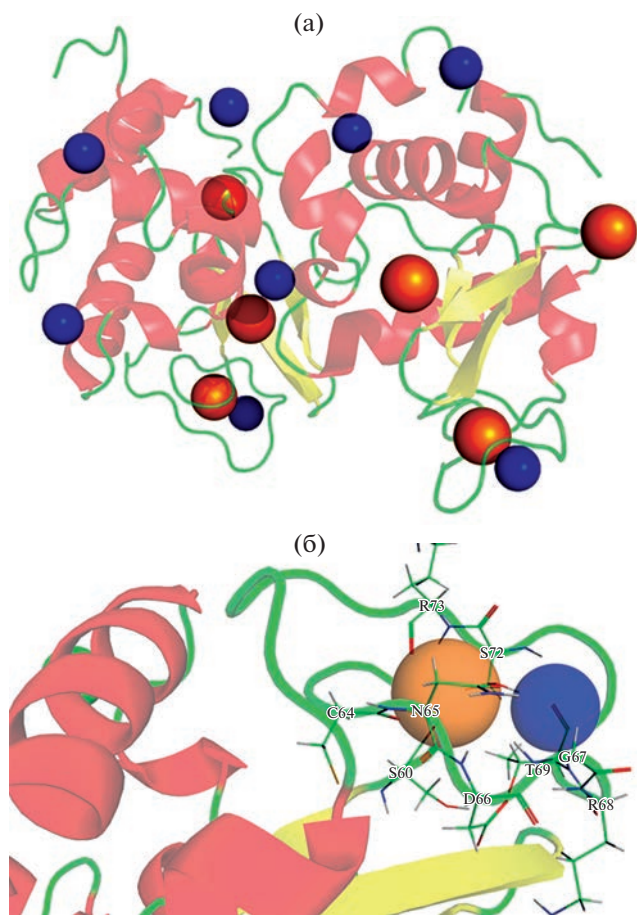


Рис. 1. Димер лизоцима, построенный как описано в [32]. α -спирали изображены красным, бета-листы — желтым, петли — зеленым цветом. Атомы натрия показаны сферами оранжевого цвета, атомы хлора — синего (а). Аминокислотные остатки подвижной петли 60–79 аминокислотного остатка молекулы лизоцима, расположенные на расстоянии не более 4 Å от соответствующих ионов натрия и хлора. Аминокислотные остатки показаны линиями, ион хлора — сферой синего цвета, ион натрия — сферой оранжевого цвета (б).

тратным. Для решения данной проблемы применяются подходы, позволяющие снизить объем расчетов. Одним из таких методов является расчет МД с неявным растворителем [13, 14]. За счет того что при таком подходе молекулы воды не задаются отдельно, объем вычислений существенно снижается.

Еще одним подходом, позволяющим существенно снизить объем вычислений, является так называемое крупнозернистое моделирование МД. Одним из силовых полей, в которых реализован данный метод, является силовое поле MARTINI [15]. Ускорение расчетов происходит за счет упрощения модели: четыре тяжелых атома и связанные с ними атомы водорода представлены одним центром взаимодействия. Данный подход широко используется для систем, содержащих липиды [16–20]. Метод ускоренной МД также

позволяет уменьшить объем расчетов. Ускоренная МД основана на модификации потенциала, введенной в [21]. Данная модификация снижает высоту локальных барьеров, позволяя проводить расчеты намного быстрее. Моделирование конформационных переходов, происходящих в микросекундном масштабе, сравнимо с миллисекундным обычным моделированием МД [22, 23].

В настоящей работе метод ускоренной МД использован для исследования стабильности димера лизоцима из предкристаллизационного раствора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Построение начальной модели димера. Модель димера с четырьмя ионами Cl и тремя ионами Na строили, как описано в [11]. Расчет ионизационных состояний аминокислотных остатков при pH 4.5, что соответствует экспериментальным данным [24], проводили с помощью сервера PROPKA [25].

Расчет ускоренной молекулярной динамики. Подготовку системы для расчета МД проводили с использованием пакета AmberTools20 [25]. В качестве силового поля выбрали поле ff19SB [26], в качестве модели воды — модель TIP3P [28], как наиболее подходящую для использования с силовым полем ff19SB [27]. С использованием tleap из пакета AmberTools20 [25] были заданы дисульфидные связи между следующими парами цистеинов: 6–127, 142–263, 30–115, 166–251, 64–80, 200–216, 76–94, 212–230. В систему было добавлено 0.4 М NaCl, а также 20 ионов Cl для нейтрализации заряда системы. Уравновешивание системы проводили в шесть этапов. На первом минимизировалась энергия только молекул воды. На атомы белка были наложены ограничения подвижности. На втором этапе молекулы воды могли свободно двигаться в стандартных условиях для температуры и давления. На третьем этапе минимизировалась энергия для молекул воды и белка. Четвертый этап представлял собой нагревание системы в NVT-ансамбле с наложенными на атомы белка ограничениями подвижности. Нагревание проводилось от 0 до 293 К. На пятом этапе проводили релаксацию системы в NPT-ансамбле с наложенными на тяжелые атомы белка ограничениями. На шестом ограничения снимались. В качестве термостата использовали термостат Ланжевена [26–28], в качестве баростата — баростат Берендсена [29]. Далее проводили 1 нс МД для вычисления средних потенциальной и торсионной энергий системы для того, чтобы задать необходимые коэффициенты в ускоренной МД. Моделировалось 240 нс с шагом 2 фс.

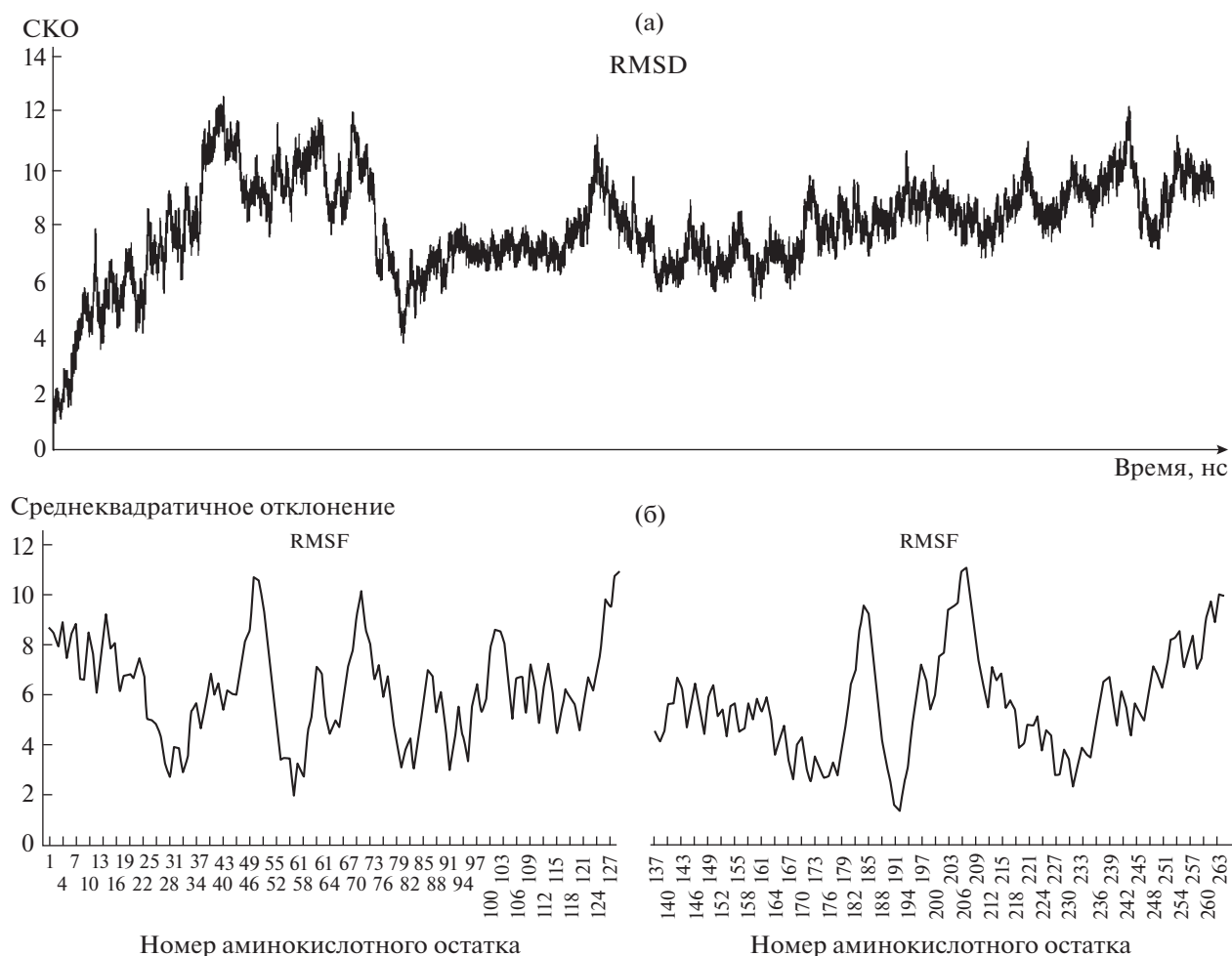


Рис. 2. СКО димера лизоцима (а); СКФ С- α атомов димера лизоцима (б).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемый димер лизоцима, построенный как описано в [11], изображен на рис. 1а. Данный димер содержит восемь ионов хлора и шесть ионов натрия. Отметим, что один из ионов натрия и один из ионов хлора образуют контакты с аминокислотными остатками подвижной петли 60–79 (рис. 1б). Во взаимодействия с ионами вовлечены следующие аминокислотные остатки: S60, C64, N65, D66, G67, R68, T69, S72 и R73. Можно предположить, что данные ионы участвуют в стабилизации петли 60–79 в кристалле.

Для результатов ускоренной МД с коэффициентами $\text{ethreshd}=2446$, $\text{alphad}=206$, $\text{ethreshp}=188640$, $\text{alphap}=8227$ были проанализированы зависимости среднеквадратичных отклонений (СКО) от моделируемого времени и значения среднеквадратичных флуктуаций (СКФ) С- α -атомов димера лизоцима. На рис. 2а представлен график зависимости СКО от моделируемого времени. Из сравнения с ранее полученными с использованием классической МД данными видно, что по харак-

теру обоих графиков исследуемый димер стабилен в 0.4 М растворе NaCl.

На рис. 2б представлен график СКФ С- α -атомов димера лизоцима. Значения, полученные методом ускоренной МД, отличаются от ранее полученных с использованием классической МД [30] прежде всего в районе N-конца. В [31] значения СКФ С- α -атомов для обоих мономеров в составе димера сходны, тогда как значения СКФ С- α -атомов аминокислотных остатков 1–20 различаются в 1.5–2 раза. Кроме того, различия наблюдаются в районе α -спирали 86–101. Такие результаты свидетельствуют о том, что ускоренная МД за счет увеличенного конформационного пространства позволяет более точно моделировать некоторые конформационные изменения белковых молекул, которые предположительно происходят во временном диапазоне порядка микросекунд, и может быть использована для исследования предкристаллизационных растворов белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод ускоренной молекулярной динамики в применении к моделированию ранее определенного кластера-прекурсора кристаллов тетрагонального лизоцима позволил выявить ряд аспектов поведения данного кластера, не выявленного методом классической молекулярной динамики. Показано, что метод ускоренной молекулярной динамики применим к исследованию механизмов кристаллизации белков.

Работа выполнена в рамках Тематического плана НИОКР НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Timofeev V., Samygina V.* // Crystals. 2023. V. 13 (1). P. 71.
<https://doi.org/10.3390/cryst13010071>
2. <https://www.rcsb.org/stats/summary>
3. *Pusey M., Witherow W., Naumann R.* // ScienceDirect. 1988. V. 90. P. 105.
[https://doi.org/10.1016/0022-0248\(88\)90304-1](https://doi.org/10.1016/0022-0248(88)90304-1)
4. *Kovalchuk M.V., Blagov A.E., Dyakova Y.A. et al.* // Cryst. Growth Des. 2016. V. 16. № 4. P. 1792.
<https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01662>
5. *Aaron Taudt, Axel Arnold, Jurgen Pleiss* // Phys. Rev. E. 2015. V. 91. 033311.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.91.033311>
6. *Kordonskaya Y.V., Timofeev V.I., Dyakova Y.A. et al.* // Crystals. 2021. V. 11 (1). P. 1121.
<https://doi.org/10.3390/cryst11091121>
7. *Antonija Kuzmanic, Bojan Zagrovic* // Biophys. J. 2014. V. 106. P. 677.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.12.022>
8. *Cerutti D.S., Trong I., Stenkamp R.E., Lybrand T.P.* // Biochemistry. 2008. V. 47–46. P. 12065.
<https://doi.org/10.1021/bi800894u>
9. *Meinhold L., Merzel F., Smith J.C.* // Phys. Rev. Lett. 2007. V. 99. 138101.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.99.138101>
10. *Cerutti D.S., Trong I., Stenkamp R.E., Lybrand T.P.* // J. Phys. Chem. B. 2009. V. 113. № 19. P. 6971.
<https://doi.org/10.1021/jp9010372>
11. *Kordonskaya Y.V., Marchenkova M.A., Timofeev V.I. et al.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2020 V. 39 (18). P. 7223.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1803138>
12. *Kordonskaya Y.V., Timofeev V.I., Marchenkova M.A., Konarev P.V.* // Crystals. 2022. V. 12. P. 484.
<https://doi.org/10.3390/cryst12040484>
13. *Nguyen H., Maier J., Huang H. et al.* // J. Am. Chem. Soc. 2014. V. 136 (40). P. 13959.
<https://doi.org/10.1021/ja5032776>
14. *Onufriev A.V., Case D.A.* // Annu. Rev. Biophys. 2019. V. 58. P. 275.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115325>
15. *Marrink S.J., Risselada H.J., Yefimov S. et al.* // J. Phys. Chem. B. 2007. V. 111. № 27. P. 7812.
<https://doi.org/10.1021/jp071097f>
16. *Sun F., Schroer C.F.E., Palacios C.R. et al.* // PLoS Comput. Biol. 2022. V. 16 (4). E. 1007777.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007777>
17. *Pezeshkian W., Marrink S.J.* // Curr. Opin. Cell Biol. 2021. V. 71. P. 103.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.02.009>
18. *Thallmair S., Javanainen M., Fábán B. et al.* // J. Phys. Chem. 2021. V. 125. (33). P. 9537.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c03665>
19. *Frallicciardi J., Melcr J., Siginou P. et al.* // Nat. Commun. 2022. V. 13. P. 1605. <https://www.nature.com/articles/s41467-022-29272-x>
20. *Korotkova P.D., Shumm A.B., Vladimirov Y.A. et al.* // Journal of Surface Investigation: X-Ray, Synchrotron and Neutron Techniques. 2021. V. 15. № 4. P. 652.
21. *Hamelberg D., Mongan J., McCammon J.A.* // J. Chem. Phys. 2004. V. 120 (24). P. 11919.
<https://doi.org/10.1063/1.175565>
22. *Shaw D.E. et al.* // Science. 2010. V. 330. P. 341.
<https://doi.org/10.1126/science.1187409>
23. *Marchenkova M.A. et al.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2020. V. 38. № 17. P. 5159.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1696706>
24. *Dolinsky T.J. et al.* // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. W665.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh381>
25. *Case D.A. et al.* // J. Comput. Chem. 2005. V. 26. P. 1668.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20290>
26. *Tian C. et al.* // J. Chem. Theory Comput. 2020. V. 16. P. 528.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00591>
27. *Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D. et al.* // J. Chem. Phys. 1983. V. 79 (2). P. 926.
<https://doi.org/10.1063/1.445869>
28. *Allen M.P., Tildesley D.J.* // Computer simulation of liquids. New York: Oxford university press, 1991.
29. *Hoover W.G., Ladd A.J.C., Phys B.M.* // Phys. Rev. Lett. 1982. V. 48. 1818.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.48.1818>
30. *Evans D.J., Chem J.* // Chem. Phys. 1983. V. 77 (1). P. 63.
[https://doi.org/10.1016/0301-0104\(83\)85065-4](https://doi.org/10.1016/0301-0104(83)85065-4)
31. *Berendsen H.J.C. et al.* // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. P. 3684.
<https://doi.org/10.1063/1.448118>
32. *Kordonskaya Y.V., Timofeev V.I., Dyakova Y.A. et al.* // Crystals. 2021. V. 11. P. 1534.
<https://doi.org/10.3390/cryst11121534>

ПРИМЕНЕНИЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ СПАЙКОВОГО БЕЛКА SARS-CoV-2 ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПЕПТИДНОЙ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ВАКЦИНЫ

© 2023 г. А. С. Ивановский^{2,*}, И. А. Колесников¹, Ю. В. Кордонская^{1,2}, А. В. Ермаков¹,
М. А. Марченкова^{1,2}, В. И. Тимофеев^{1,2}, Ю. В. Писаревский^{1,2}, Ю. А. Дьякова¹, М. В. Ковальчук¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника РАН, Москва, Россия

*E-mail: a. Iwanowski@gmail.com

Поступила в редакцию 20.06.2023 г.

После доработки 24.07.2023 г.

Принята к публикации 24.07.2023 г.

На основе спайкового белка вируса SARS-CoV-2 предсказан белок, который может вызывать иммунный ответ. Методом молекулярной динамики подтверждена стабильность белка в растворе. Иммуномоделирование показало, что данный белок вызывает иммунную реакцию и, соответственно, может служить прототипом вакцины.

DOI: 10.31857/S0023476123600349, EDN: ABZIFA

ВВЕДЕНИЕ

SARS-CoV-2 — это вирус, вызывающий заболевание COVID-19 [1–3], которое может иметь крайне тяжелые последствия вплоть до летального исхода [4]. SARS-CoV-2 относится к подроду *Sarbecovirus* рода *Betacoronavirus* [5] и представляет собой РНК-содержащий оболочечный вирус, геном которого состоит примерно из 30000 нуклеотидов [6]. В настоящее время разработано несколько прошедших клинические испытания вакцин, а также более двухсот прототипов вакцин [7–11]. Тем не менее вирус подвержен различного рода мутациям, поэтому разработанные ранее вакцины могут быть неэффективны против новых мутантных форм вируса. Одним из таких примеров может служить вариант вируса под названием “Омикрон”, который может заражать ранее вакцинированных людей [12], что делает актуальной задачу по созданию эффективной вакцины против как варианта “Омикрон”, так и против возмозможных последующих мутантных форм SARS-CoV-2.

Одной из главных иммуногенных детерминант SARS-CoV-2 является так называемый спайковый белок — особенность коронавирусов [13]. Данный белок является трансмембранным и отвечает за инвазию генетического материала вируса в клетку [13]. Для данного белка определена пространственная структура (PDB ID: 7WK3). Известно, что трансмембранные белки обычно не растворимы в воде и крайне сложны для получения. Поэтому в данной работе применен осно-

ванный на методах иммуноинформатики подход, заключающийся в том, что выделяется фрагмент белка, содержащий эпитопы и с большой вероятностью растворимый в воде.

В настоящей работе выделен фрагмент спайкового белка SARS-CoV-2, который насыщен эпитопами и может приводить к иммунному ответу. Методом молекулярной динамики (МД) оценена устойчивость выделенного фрагмента в водно-солевом растворе. С применением иммуномоделирования показано, что выделенный фрагмент вызывает иммунный ответ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделен фрагмент спайкового белка SARS-CoV-2 для дальнейшей работы с ним. Для получения модели фрагмента использовали программу PyMol [14].

Для МД-моделирования использовали пакет GROMACS [15] версии 2020.3.

В качестве силового поля выбран AMBER99SB-ILDN [16], модели воды — TIP3P. Кроме того, в систему было добавлено 0.15 М KCl. Для нейтрализации заряда системы были добавлены некоторые дополнительные ионы. Минимизацию энергии проводили с шагом 1 фс до максимальной силы 1000.0 кДж/моль/нм. Давление и температуру уравнивали до 1 атм и 310 К путем запуска моделирования в NVT- и NPT-ансамбле (100 пс каждый) соответственно. Давление и температуру

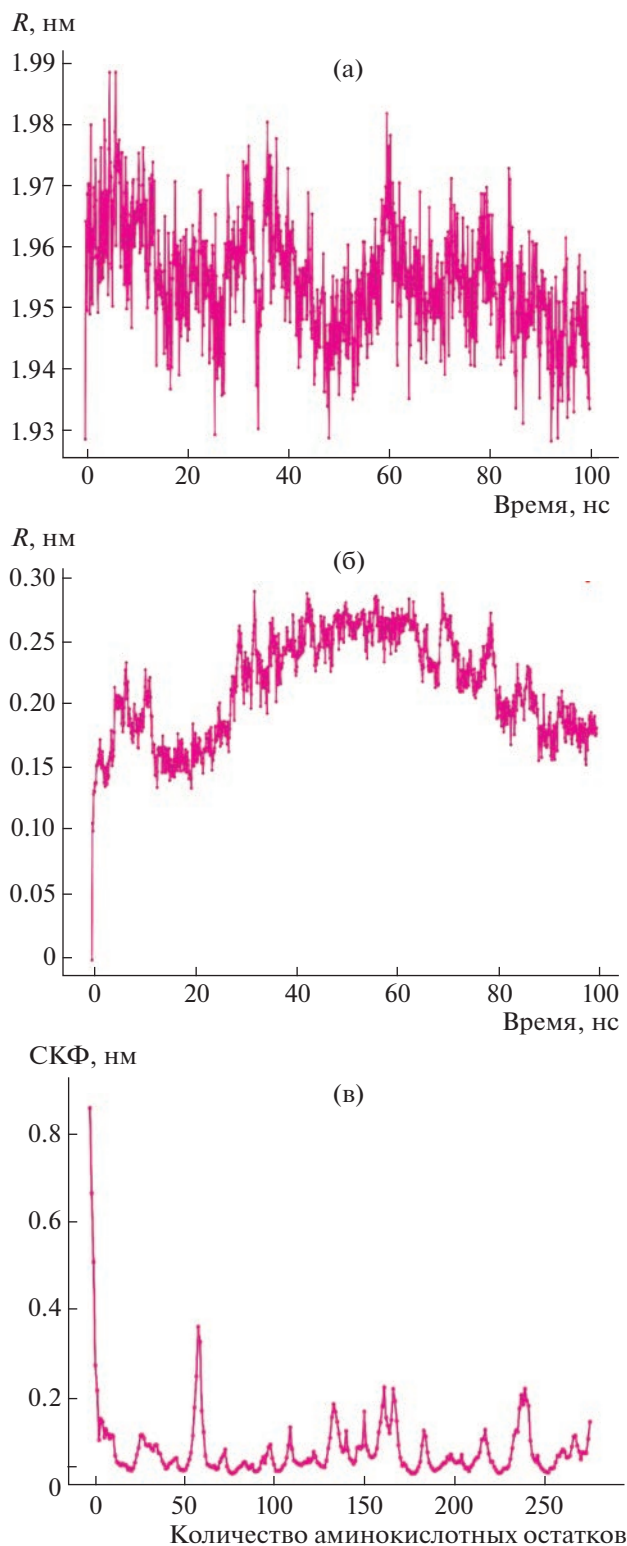


Рис. 1. Радиус гирации (а) и СКФ (б) СКФ атомов (в) фрагмента иммуногенного белка вируса SARS-CoV-2.

системы контролировали с помощью модифицированного термостата Берендсена [17] и баростата Паринелло–Рахмана [18]. Продуктивное 100 нс

МД-моделирование проводили в изотермическо-изобарическом ансамбле с временным шагом 2 фс. Алгоритм LINCS [19] использовали для ограничения связей с участием атомов водорода. Дальнействующие электростатические взаимодействия рассчитывали с использованием схемы суммирования Particle-Mesh Ewald [20].

Для предсказания иммунного ответа использовали приложение C-IMMSIMM [21]. Данный сервер — один из самых точных для предсказания иммунного ответа и прогнозирования адаптивного иммунитета. Сервер использует алгоритмы машинного обучения [22]. Наряду с методами машинного обучения применяли подход, основанный на позиционной весовой матрице (PSSM) [23]. Количество шагов моделирования сервера C-IMMSIMM [21] составляло 1000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ траекторий выполнен для 100 нс. Анализировали среднеквадратичные отклонения (СКО), радиус инерции и среднеквадратические флуктуации (СКФ). Соответствующие графики показаны на рис. 1. СКО показаны на рис. 1б. СКО стабилизируется между 0.1 и 0.15 нм, что с учетом размера моделируемой системы говорит о ее высокой стабильности. Рисунок 1а показывает, что радиус инерции имеет тенденцию к уменьшению, что свидетельствует о компактизации белка во время моделирования. СКФ атомов С- α -прототипа вакцины показаны на рис. 1в. Наиболее подвижные участки белка относятся к С-концевому участку и подвижной петле.

С использованием иммуномоделирования показано, что стойкий первичный и вторичный иммунный ответ вызывается прототипом вакцины. Иммуномоделирование проводили для двух доз антигена, вводимого с промежутком в 25 дней. Введение антигена приводит к повышению уровня активных В-клеток (рис. 2а), плазматических В-клеток (рис. 2б), Т-клеток (рис. 2в), а также иммуноглобулинов (рис. 2г). Кроме того, прототип вакцины стимулирует хелперные Т-клетки. При воздействии прототипа вакцины вырабатываются также интерферон гамма, интерлейкин-23, интерлейкин-10, интерферон бета и ряд цитокинов (рис. 2д). Такое повышение, в том числе, иммуноглобулинов, цитокинов, антигенпрезентирующих, активных В- и Т-клеток, указывает на эффективность предсказанного прототипа вакцины против варианта “Омикрон” SARS-CoV-2. Тем не менее разработанный прототип требует экспериментальной проверки, чтобы доказать его эффективность и отсутствие токсического эффекта.

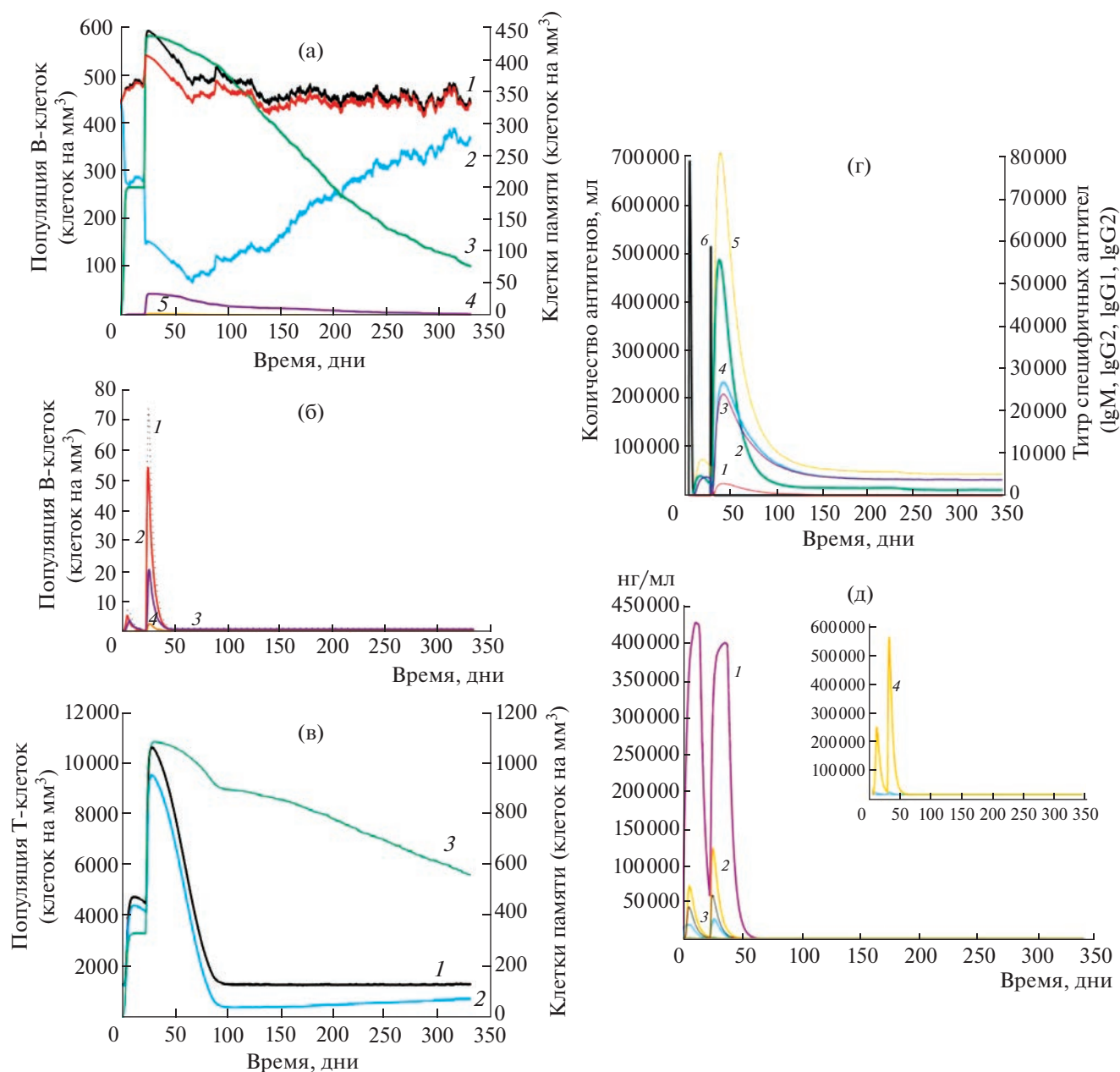


Рис. 2. Временные зависимости клеток, представляющих иммунный ответ организма человека на введение антигена: популяции В-клеток (а): 1 – общее значение, 2 – неактивированные В-клетки, 3 – В-клетки памяти, 4 – В-изотип IgG1, 5 – В-изотип IgG2. Особое внимание следует обратить на популяцию компетентных В-клеток (2); плазматических В-клеток (б): 1 – IgM + IgG, 2 – IgM, 3 – IgG1, 4 – IgG2; популяции Т-клеток (в): 1 – активные, 2 – апатические, 3 – покоящиеся, 4 – повторяющиеся; иммуноглобулинов (г): 1 – IgG2, 2 – IgM, 3 – IgG1, 4 – IgG1 + IgG2, 5 – IgM + IgG, 6 – Ag; концентрации цитокинов (врезка) и интерлейкинов (д): 1 – интерферон гамма, 2 – трансформирующий фактор роста бета, 3 – интерлейкин-10, 4 – интерлейкин-2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные результаты подтверждают возможность производить пептидные вакцины из фрагментов иммунокомпетентных белков. Показано, что выделенный фрагмент иммуногенного белка варианта “Омикрон” SARS-CoV-2 стабилен в водно-солевом растворе и способен вызы-

вать клеточный ответ. На основе полученного фрагмента будет проведена разработка вакцины против варианта “Омикрон” SARS-CoV-2.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструк-

туры на 2019–2027 годы (Соглашение № 075-15-2021-1355 (12 октября 2021 г.)).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chan J.F.-W., Yuan S., Kok K.-H. et al.* // *Lancet*. 2020. V. 395. № 10223. P. 514.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9)
2. *Zhu N., Zhang D., Wang W. et al.* // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 382. P. 727.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
3. WHO (2020) Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. World Heal. Organ.
4. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (2019-nCoV) infection is suspected: interim guidance, WHO, 2020, 28 January.
5. *Randhawa G.S., Soltysiak M.P.M., El Roz H. et al.* // *PLoS ONE*. 2020. V. 16 (1). E. 0232391.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232391>
6. *Dongwan K., Lee J.-Y., Yang J.-S. et al.* // *Cell*. 2020. V. 181. № 4. P. 914.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>
7. WHO Draft Landscape of COVID-19 Candidate Vaccines. WHO, Geneva-2020.
8. *Smith Trevor R.F., Patel A., Ramos S. et al.* // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 2610.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16505-0>
9. *Mulligan Mark J., Lyke K.E., Kitchin N. et al.* // *Nature*. 2020. V. 586. P. 589.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2639-4>
10. *Zhu F.-C., Guan X.-H., Li Y.-H. et al.* // *Lancet*. 2020. V. 396. № 10249. P. 479.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31605-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31605-6)
11. *Gao Q., Bao L., Mao H. et al.* // *Science*. 2020. V. 369. № 6499. P. 77.
12. *Cao Y., Yisimayi A., Jian F. et al.* // *Nature*. 2022. V. 608. P. 593.
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04980-y>
13. *Gallagher T.M., Buchmeier M.J.* // *Virology*. 2001. V. 279. № 2. P. 371.
<https://doi.org/10.1006/viro.2000.0757>
14. <https://pymol.org/2/>
15. *Abraham M.J., Murtola T., Schulz R. et al.* // *SoftwareX*. 2015. V. 1. P. 19.
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
16. *Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K. et al.* // *Proteins*. 2010. V. 78. P. 1950.
<https://doi.org/10.1002/prot.22711>
17. *Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F. et al.* // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. № 8. P. 3684.
<https://doi.org/10.1063/1.448118>
18. *Parrinello M., Rahman A.* // *J. Chem. Phys.* 1982. V. 76. № 5. P. 2662.
<https://doi.org/10.1063/1.443248>
19. *Hess B., Bekker H., Herman J.C. et al.* // *J. Comput. Chem.* 1997. V. 18. P. 1463.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096)
20. *Darden T., York D., Pedersen L.* // *J. Chem. Phys.* 1993. V. 98. № 12. P. 10089.
<https://doi.org/10.1063/1.464397>
21. <https://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM/index.php>
22. *Luckheeram R.V., Zhou R., Verma A.D., Xia B.* // *J. Immunol. Res.* 2012. Art. 925135.
<https://doi.org/10.1155/2012/925135>
23. *Rapin N., Lund O., Bernaschi M., Castiglione F.* // *PubMed*. 2010.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.000986>

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 575.112

ПОИСК НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ Т- И В-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ В СПАЙКОВОМ БЕЛКЕ SARS-CoV-2

© 2023 г. И. А. Колесников¹, В. И. Тимофеев^{1,2}, М. В. Николенко¹, А. В. Ермаков¹,
А. С. Ивановский^{2,*}, Ю. А. Дьякова¹, Ю. В. Писаревский^{2,1}, М. В. Ковальчук^{1,2}

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника РАН”, Москва, Россия

*E-mail: a. Iwanowski@gmail.com

Поступила в редакцию 19.04.2023 г.

После доработки 15.06.2023 г.

Принята к публикации 09.08.2023 г.

Современная эпидемиологическая обстановка, в том числе новый вирус SARS-CoV-2 и его высокая мутагенность, требуют принципиально новых сроков создания вакцин, что может быть достигнуто только за счет применения современных вычислительных технологий и моделирования. С использованием методов иммуноинформатики найдены эпитопы в спайковом белке вируса SARS-CoV-2, для найденных эпитопов предсказаны их аллергенность и иммуногенность, показано, что на основе данных эпитопов возможно сконструировать вакцину против SARS-CoV-2.

DOI: 10.31857/S0023476123600106, EDN: YEZWPO

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что SARS-CoV-2 [1] — это вирус, вызывающий чрезвычайно опасное заболевание COVID-19 [2], которое может протекать как в легкой форме [3], так и бессимптомно, а также в крайне тяжелой форме, приводящей к смерти [4]. Существуют подходы к лечению этого заболевания, в том числе ряд вакцин различного типа действия. Однако высокая мутагенность вируса приводит к тому, что старые вакцины становятся менее эффективными или вообще перестают действовать. Таким образом, существует необходимость быстро реагировать на появление новых штаммов SARS-CoV-2.

Накопление большого объема генетической информации в единой базе и развитие биоинформатических инструментов позволяют рассчитывать целевую модель вакцины с учетом прогноза иммунного ответа хозяина и генетической информации патогена. Создание вакцины на основе технологии рекомбинантной ДНК позволяет сократить срок создания вакцины.

НИЦ “Курчатовский институт” создает национальную базу генетической информации, которая включает в себя средства депонирования, поиска по метаданным и гомологического поиска генетической информации, а также средства для управления биоинформатическими платформами Galaxy и NextFlow. Это позволяет работать с существующими и создавать собственные биоин-

форматические инструменты. В [5, 6] предложен иммуноинформатический подход, который позволяет конструировать основанные на эпитопах белковые вакцины.

В настоящей работе применили модификацию этого подхода для SARS-CoV-2. Одним из последних вариантов коронавируса, вызывающего COVID-19, является так называемый “Омикрон” [7, 8]. Выявлены пять его подвариантов [9]. Известно, что некоторые подварианты “Омикрона” могут заражать ранее вакцинированных людей [10]. Таким образом, создание эффективной вакцины против данного варианта коронавируса является актуальной задачей.

Выбранный для исследования так называемый спайк-протеин варианта “Омикрон” (PDB ID: 7WK3) служит мишенью для поиска вакцин [11]. Трехмерная структура белка приведена на рис. 1, его топология относительно мембраны представлена на рис. 2. На основе смоделированной трехмерной структуры и первичной последовательности исследуемого белка был проведен поиск В- и Т-клеточных эпитопов. Первичная последовательность взята из Национальной базы генетической информации (<https://nbg.ru/>).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Т-клеточные эпитопы найдены с помощью программы NetCTL [12]. Сервер позволяет пред-

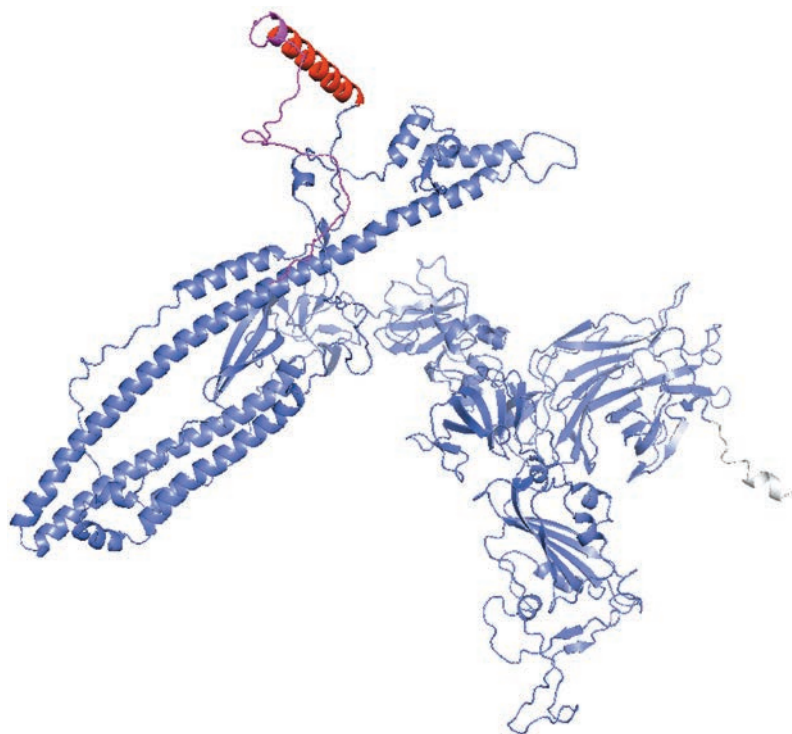


Рис. 1. Трехмерная структура белка мишени.

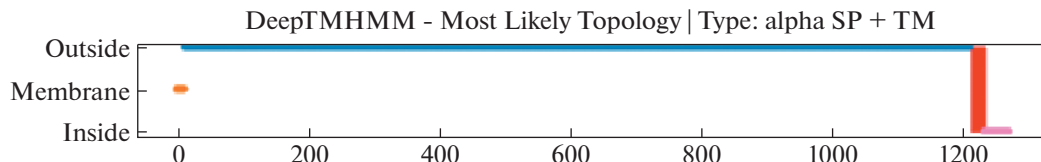


Рис. 2. Топологии белка относительно мембраны. Синим цветом выделен участок снаружи мембраны, красным – трансмембранный участок, розовым – участок внутри мембраны.

сказывать эпитопы CTL, ограниченные 12 супер-типами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I. Связывание пептидов с МНС класса I и протеасомное расщепление были предсказаны с помощью искусственных нейронных сетей [12–14].

С использованием NetCTL получен прогноз Т-клеточных эпитопов (выделены оранжевым цветом на рис. 3). Настройки, с которыми проводился прогноз, следующие:

- weight of tap – 0.05;
- weight of МНС – 1;
- weight of Cleavage – 0.15;
- порог идентификации эпитопов – 0.75.

В-клеточные эпитопы предсказаны с помощью инструмента прогнозирования ElliPro

(<http://tools.iedb.org/ellipro/>) сервера IEDB [15, 16]. При работе с этим методом используются доступность растворителя и гибкость для прогнозирования эпитопов. Инструмент прогнозирования ElliPro выбирает антигенные остатки из известной трехмерной структуры белка. Нижняя оценка и максимальное расстояние были откалиброваны с использованием значений по умолчанию с minimum score – 0.5 Å и maximum distance – 6 Å соответственно. 3D-модель белка S1 использовали для предсказания как конформационных (прерывистых), так и линейных В-клеточных эпитопов.

Для анализа аллергенности найденных эпитопов использовали программу AllerTOP [17], для анализа токсичности – ToxinPred [18]. Для оценки перспективности данного белка как антигена была применена программа VaxiJen [19].

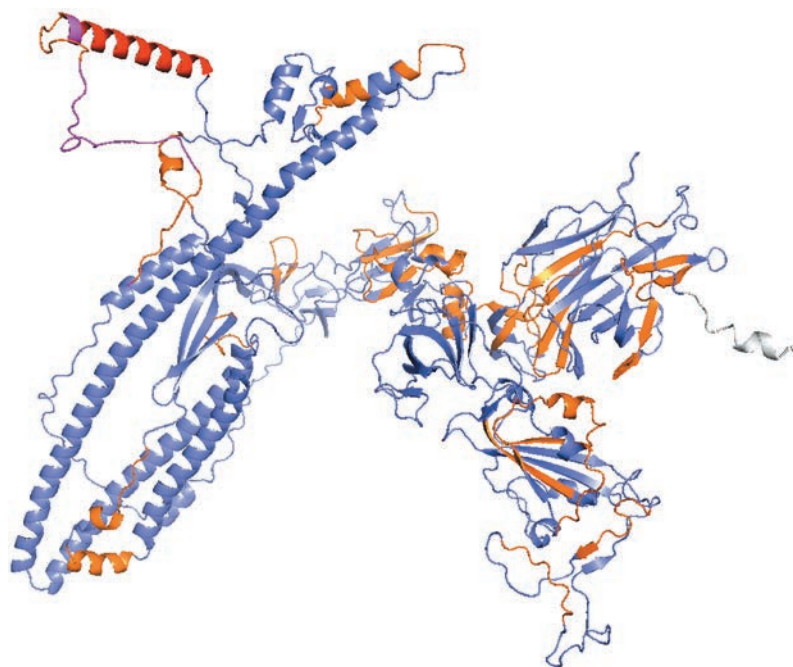


Рис. 3. Т-клеточные эпитопы (показаны оранжевым цветом).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спайковый белок вируса SARS-CoV-2 (СБ CoV) является главной антигенной детерминантой ви-

руса и поэтому был выбран в качестве объекта исследования [11]. Данный белок подвержен мутациям в новых вариантах вируса SARS-CoV-2, что приводит к тому, что разработанные ранее вакци-

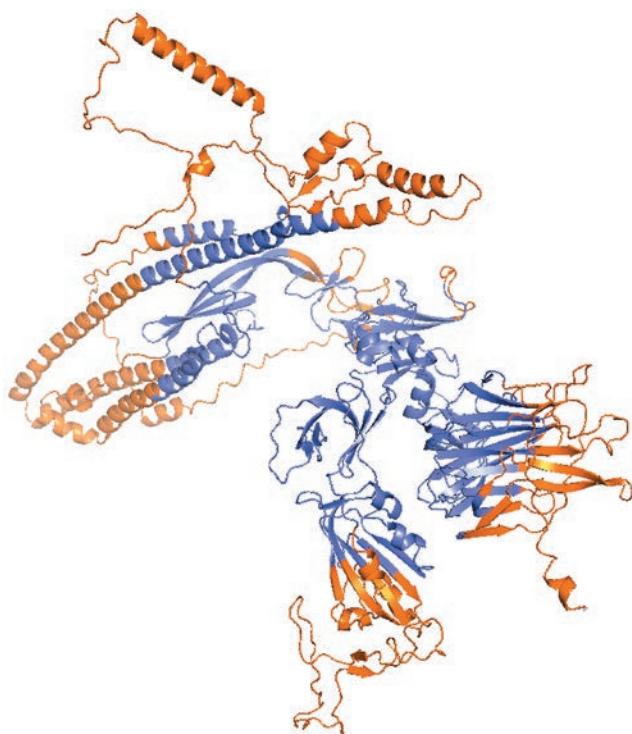


Рис. 4. Линейные В-эпитопы (показаны оранжевым цветом).

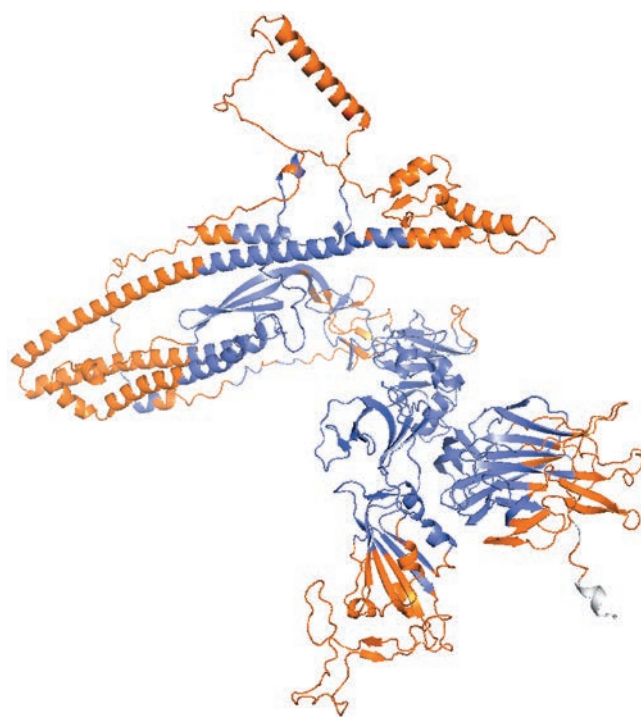


Рис. 5. Прерывистые В-эпитопы (показаны оранжевым цветом).

Таблица 1. Предсказанные Т-клеточные эпитопы

ID	Первичная последовательность	Аффинность	Оценочная функция
865	LTDEMIAQY	0.7953	3.6616
258	WTAGAAAYY	0.6735	3.1128
604	TSNQVAVLY	0.6559	3.0758
361	CVADYSVLY	0.5348	2.5759
746	STECNLLL	0.5136	2.3492
733	KTSVDCTMY	0.4908	2.3795
652	GAEHVNNSY	0.4042	1.996
160	YSSANNCTF	0.3975	1.9531
196	NIDGYFKIY	0.3921	1.9606
152	WMESEFRVY	0.3902	1.9232
162	SANNCTFEY	0.3737	1.8739
687	VASQSIIAY	0.3529	1.7978
30	NSFTRGVYY	0.3389	1.6915
392	FTNVYADSF	0.2704	1.3208
136	CNDPFLGVY	0.2613	1.3355
285	ITDAVDCAL	0.235	1.168
1237	MTSCCCLK	0.226	1.0963
261	GAAAYYVGY	0.2253	1.2194
357	RISNCVADY	0.2106	1.2032
465	ERDISTEIY	0.2097	1.1687
1039	RVDFCGKGY	0.2036	1.1403
1096	VSNGTHWV	0.2012	0.9574
50	STQDLFLPF	0.1974	1.0468
343	NATRFASVY	0.1955	1.1138
370	NSASFSTFK	0.1671	0.8165
880	GTITSGWTF	0.1656	0.9433
612	YQDVNCTEV	0.1531	0.7502
296	LSETKCTLK	0.1515	0.7879
815	RSFIEDLLF	0.1421	0.8441
748	ECSNLLLQY	0.1413	0.8171
192	FVFKNIDGY	0.1358	0.7837
1264	VLKGVKLHY	0.1262	0.8253
1095	FVSNGTHWF	0.1232	0.7622
628	QLTPTWRVY	0.1189	0.7887
372	ASFSTFKCY	0.118	0.8085
445	VGGNYNYLY	0.1164	0.7698
83	VLPFNDGVY	0.113	0.7675

Таблица 2. Предсказанные линейные В-клеточные эпитопы

Эпитоп	Chain	Начало	Конец	Первичная последовательность	Количество а.о.	Score
1	A	1204	1273	GKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMTIMLCCMTSCCSCL KGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT	70	0.9
2	A	435	511	AWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQ AGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYPYRVV	77	0.827
3	A	946	1017	GKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDL KVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAE	72	0.821
4	A	730	775	SMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLNRAL TGIAVEQD	46	0.8
5	A	1	23	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTTRTQ	23	0.731
6	A	1123	1184	SGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTS PDVDLGDISGINASVVNIQKEID	62	0.73
7	A	243	262	ALHRSYLTPGDSSSGWTAGA	20	0.725
8	A	809	905	PSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDCLGDIAARD LICAQKFNGLTVPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWT FGAGAALQIPFAMQMAYR	97	0.706
9	A	67	80	AIHVSGTNGTKRFD	14	0.646
10	A	699	711	LGAENSVAYSNNS	13	0.644
11	A	134	166	QFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNC	33	0.636
12	A	336	356	CPFGEVFNATRFASVYAWNRK	21	0.632
13	A	397	425	ADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKL	29	0.623
14	A	676	686	TQTNSPRRARS	11	0.618
15	A	1097	1102	SNGTHW	6	0.606
16	A	168	188	FEYVSQPFLMDLEGKQGNFKN	21	0.602
17	A	1073	1087	KNFTTAPAICHDGKA	15	0.58
18	A	121	127	NNATNVV	7	0.551
19	A	209	215	PINLVRD	7	0.538
20	A	97	102	KSNIIR	6	0.53

Примечание. а. о. — аминокислотные остатки.

ны оказываются неэффективными [20]. Для поиска антигенных детерминант спайкового белка варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2 использовали подход, основанный на алгоритмах глубокого машинного обучения [12, 16–18]. Учитывая, что СБ CoV является трансмембранным белком,

была определена его топология относительно цитоплазматической мембраны.

Для этого использовали основанный на алгоритмах глубокого машинного обучения веб-сервис DeepTMHMM [21] proteins using deep neural networks. Показано, что аминокислотные остатки

Таблица 3. Предсказанные конформационные В-клеточные эпитопы

Эпитоп	Аминокислотный остаток	Количество а.о.	Score
1	A:S1239, A:C1240, A:C1241, A:S1242, A:C1243, A:L1244, A:K1245	7	0.993
2	A:T1231, A:M1233, A:L1234, A:C1235, A:C1236, A:M1237, A:T1238	7	0.988
3	A:L1218, A:G1219, A:F1220, A:I1221, A:A1222, A:G1223, A:L1224, A:I1225, A:A1226, A:I1227, A:V1228, A:M1229, A:V1230, A:I1232	14	0.955
4	A:I818, A:G1246, A:C1247, A:C1248, A:S1249, A:C1250, A:G1251, A:S1252, A:C1253, A:C1254, A:F1256, A:D1257, A:E1258, A:D1259, A:D1260, A:S1261, A:E1262, A:P1263, A:V1264, A:L1265, A:K1266, A:G1267, A:V1268	23	0.906
5	A:S1161, A:P1162, A:D1163	3	0.904
6	A:W1212, A:P1213, A:W1214, A:Y1215, A:I1216	5	0.896
7	A:K1269, A:L1270, A:H1271, A:Y1272	4	0.892
8	A:S884, A:G885, A:W886, A:T887	4	0.885
9	A:R457, A:K458, A:S459, A:N460, A:L461, A:K462, A:P463, A:F464, A:E465, A:R466, A:D467, A:I468, A:S469, A:T470, A:E471	15	0.819
10	A:S730, A:M731, A:K733, A:S735, A:V736, A:D737, A:C738, A:T739, A:M740, A:Y741, A:I742, A:C743, A:G744, A:D745, A:S746, A:T747, A:E748, A:C749, A:S750, A:N751, A:L752, A:L753, A:L754, A:Q755, A:Y756, A:G757, A:S758, A:F759, A:C760, A:T761, A:Q762, A:L763, A:N764, A:R765, A:A766, A:L767, A:T768, A:G769, A:I770, A:A771, A:V772, A:E773, A:Q774, A:D775, A:S943, A:G946, A:K947, A:L948, A:Q949, A:D950, A:V951, A:V952, A:N953, A:Q954, A:N955, A:A956, A:Q957, A:A958, A:L959, A:N960, A:T961, A:L962, A:V963, A:K964, A:Q965, A:L966, A:S967, A:S968, A:N969, A:F970, A:G971, A:A972, A:I973, A:S974, A:S975, A:V976, A:L977, A:N978, A:D979, A:I980, A:L981, A:S982, A:R983, A:L984, A:D985, A:K986, A:E988, A:A989, A:E990, A:Q992, A:I993, A:D994, A:R995, A:L996, A:I997, A:T998, A:G999, A:R1000, A:L1001, A:Q1002, A:S1003, A:L1004, A:Q1005, A:Y1007, A:V1008, A:Q1011, A:L1012, A:R1014, A:A1015, A:A1016, A:E1017, A:D1165, A:L1166, A:G1167, A:D1168, A:I1169, A:S1170, A:G1171, A:I1172, A:N1173, A:A1174, A:S1175, A:V1176, A:V1177, A:N1178, A:I1179, A:K1181, A:E1182	128	0.804
11	A:L7, A:L8, A:P9, A:L10	4	0.793
12	A:L1145, A:D1146, A:S1147, A:F1148, A:K1149, A:E1150, A:E1151, A:L1152, A:D1153, A:F1156	10	0.787
13	A:I1130, A:G1131, A:I1132, A:V1133	4	0.746
14	A:C336, A:P337, A:G339, A:E340, A:V341, A:F342, A:N343, A:A344, A:T345, A:R346, A:F347, A:A348, A:S349, A:V350, A:Y351, A:A352, A:W353, A:N354, A:R355, A:K356, A:S371, A:A372, A:S373, A:F374, A:S375, A:A397, A:D398, A:S399, A:F400, A:V401, A:I402, A:R403, A:G404, A:D405, A:E406, A:V407, A:R408, A:Q409, A:I410, A:G416, A:K417, A:I418, A:A419, A:D420, A:Y421, A:Y423, A:A435, A:W436, A:N437, A:S438, A:N439, A:N440, A:L441, A:D442, A:S443, A:K444, A:V445, A:G446, A:G447, A:N448, A:Y449, A:N450, A:Y451, A:L452, A:Y453, A:R454, A:L455, A:F456, A:I472, A:Y473, A:Q474, A:A475, A:G476, A:S477, A:T478, A:P479, A:C480, A:N481, A:G482, A:V483, A:E484, A:G485, A:F486, A:N487, A:C488, A:Y489, A:F490, A:P491, A:L492, A:Q493, A:S494, A:Y495, A:G496, A:F497, A:Q498, A:P499, A:T500, A:N501, A:G502, A:V503, A:G504, A:Y505, A:Q506, A:P507, A:Y508, A:R509, A:V510, A:V511	108	0.744
15	A:L821, A:L822, A:F823, A:K825, A:V826, A:T827, A:L828, A:A829, A:D830, A:A831, A:G832, A:F833, A:I834, A:K835, A:Q836, A:Y837, A:G838, A:D839, A:C840, A:L841, A:G842, A:D843, A:I844, A:A845, A:A846, A:R847, A:D848, A:L849, A:I850, A:C851, A:A852, A:Q853, A:K854, A:F855, A:N856, A:G857, A:L858, A:T859, A:V860, A:L861, A:P862, A:P863, A:L864, A:L865, A:T866, A:D867, A:E868, A:M869, A:I870, A:A871, A:Q872, A:Y873, A:T874, A:S875, A:A876, A:L877, A:L878, A:A879, A:G880, A:T881, A:I882, A:T883, A:G889, A:A890, A:G891, A:A892, A:A893, A:L894, A:I896, A:P897, A:F898, A:A899, A:M900, A:Q901, A:A903, A:Y904, A:R905, A:V911, A:Y1206, A:E1207, A:Q1208, A:Y1209	82	0.704

Таблица 3. Окончание

Эпитоп	Аминокислотный остаток	Количество а.о.	Score
16	A:N1134, A:N1135, A:T1136	3	0.674
17	A:S12, A:S13, A:Q14, A:C15, A:N17, A:L18, A:T19, A:R21, A:T22, A:A67, A:I68, A:H69, A:V70, A:S71, A:G72, A:T73, A:N74, A:G75, A:T76, A:K77, A:R78, A:F79, A:D80, A:N81, A:K97, A:S98, A:N99, A:I100, A:R102, A:N121, A:N122, A:A123, A:T124, A:N125, A:V127, A:Q134, A:F135, A:C136, A:N137, A:D138, A:P139, A:F140, A:L141, A:G142, A:V143, A:Y144, A:Y145, A:H146, A:K147, A:N148, A:N149, A:S151, A:W152, A:M153, A:E154, A:S155, A:E156, A:F157, A:R158, A:V159, A:Y160, A:S161, A:S162, A:A163, A:N164, A:N165, A:C166, A:T167, A:V171, A:S172, A:Q173, A:P174, A:F175, A:L176, A:M177, A:D178, A:L179, A:E180, A:G181, A:K182, A:Q183, A:G184, A:N185, A:F186, A:K187, A:N188, A:N211, A:L212, A:V213, A:R214, A:D215, A:A243, A:L244, A:H245, A:R246, A:S247, A:Y248, A:L249, A:T250, A:P251, A:G252, A:D253, A:S254, A:S255, A:S256, A:G257, A:W258, A:T259, A:A260, A:G261, A:A262	111	0.635
18	A:S698, A:L699, A:G700, A:A701, A:E702, A:N703, A:S704, A:V705, A:A706, A:Y707, A:S708, A:N709, A:N710, A:S711, A:T716, A:K1073, A:N1074, A:F1075, A:T1076, A:T1077, A:A1078, A:P1079, A:A1080, A:I1081, A:C1082, A:H1083, A:D1084, A:G1085, A:K1086, A:A1087, A:S1097, A:N1098, A:G1099, A:T1100, A:H1101, A:W1102, A:S1123, A:G1124, A:N1125, A:C1126, A:D1127, A:V1128	42	0.61
19	A:N679, A:S680, A:P681, A:A684, A:S686, A:V687	6	0.56
20	A:Q1180, A:I1183, A:D1184	3	0.552
21	A:Q1142, A:P1143, A:E1144	3	0.551
22	A:D808, A:P809, A:S810, A:K811, A:P812, A:S813, A:K814	7	0.524

1214–1273 относятся к трансмембранному и внутриклеточному фрагменту белка, что затрудняет их использование для конструирования пептидной вакцины.

Далее провели поиск эпитопов. Выявлены как Т-, так и В-клеточные эпитопы СБ CoV (табл. 1–3). Всего выявлено 37 Т-клеточных эпитопов высокоаффинных лигандов главного комплекса гистосовместимости первого типа (МНС-1). Из них 35 находятся в надмембранной части. Каждый из найденных пептидов состоит из девяти аминокислот, что характерно для лигандов МНС-1. В табл. 1 Т-клеточные эпитопы перечислены в порядке убывания их аффинности к МНС-1. Наиболее аффинные и, следовательно, более многообещающие с точки зрения иммуногенности отличаются от менее аффинных в 4–7 раз. Отметим, что согласно [12] использованный метод позволяет предсказать, является ли пептид высокоаффинным лигандом МНС-1 с вероятностью 95%. В-клеточные эпитопы можно разделить на два типа в зависимости от пространственной структуры эпитопов: непрерывные (линейные) и прерывистые (конформационные) эпитопы [15]. Список линейных В-клеточных эпитопов приведен в табл. 2. Всего найдено 20 линейных В-кле-

точных эпитопов, все они относятся к надмембранной части СБ CoV. Наиболее иммуногенные из них представляют собой достаточно длинные пептиды (до 97 аминокислотных остатков). Конформационных эпитопов найдено 22 (табл. 3), из них 20 находятся в надмембранном фрагменте белка.

Оценка аллергенности найденных пептидов с использованием AllerTOP [17] показала, что ни один из них не является аллергеном.

Токсичность найденных пептидов оценивали с использованием ToxinPred [18]. Выявлено, что два Т-эпитопа и два конформационных В-эпитопа, вероятно, являются токсинами (табл. 4–6).

Отметим, что оба конформационных В-эпитопа и один из Т-эпитопов относятся к трансмембранному и внутриклеточному фрагментам белка. Алгоритмы, использованные для предсказания токсичности и аллергенности, разработаны с применением глубокого машинного обучения. Для алгоритма предсказания токсичности использовали три выборки: 8233 токсичных и 8233 нетоксичных пептида, 1924 токсичных и 1924 нетоксичных пептида, 1924 токсичных и 19240 нетоксичных пептидов. Выборки разделяли на тестовую и обучающую в соотношении 80:20 [22].

Таблица 4. Предсказание токсичности Т-клеточных эпитопов

ID	Белок	SV Score
865	LTDEMIAQY	−0.52
258	WTAGAAAYY	−1.07
604	TSNQVAVLY	−1.17
361	CVADYSVLY	−0.52
746	STECNLLL	−0.52
733	KTSVDCTMY	0.12
652	GAEHVNNSY	−0.58
160	YSSANNCTF	−0.48
196	NIDGYFKIY	−1.13
152	WMESEFRVY	−1.68
162	SANNCTFEY	−0.49
687	VASQSIIAY	−1.09
30	NSFTRGVYY	−0.73
392	FTNVYADSF	−1.1
136	CNDPFLGVY	−0.82
285	ITDAVDCAL	−0.67
1237	MTSCCCLK	0.13
261	GAAAYYVGY	−1.17
357	RISNCVADY	−0.78
465	ERDISTEIY	−1.79
1039	RVDFCGKGY	−0.34
1096	VSNGTHWV	−0.92
50	STQDLFLPF	−1.49
343	NATRFASVY	−0.64
370	NSASFSTFK	−1.04
880	GTITSGWTF	−1.1
612	YQDVNCTEV	−0.82
296	LSETKCTLK	−1.22
815	RSFIEDLLF	−0.82
748	ECSNLLQY	−0.39
192	FVFKNIDGY	−0.75
1264	VLKGVKLHY	−1.26
1095	FVSNGTHWF	−0.92
628	QLTPTWRVY	−1.5
372	ASFSTFKCY	−0.66
445	VGGNYNYLY	−0.82
83	VLPFNDGVY	−1.29

Примечание. Токсичными являются только KTSVDCTMY, MTSCCCLK.

Таблица 5. Предсказание токсичности линейных В-эпитопов

Эпитоп	Белок	SVM score
1	GKYEQYIKWPWYIWLGFIAIVMTIMLCCMTSCCCLKGCCSCGSCCKF DEDDSEPVLLKGVKLHYT	−0.33
2	AWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGF NCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVV	−0.98
3	GKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDLKVEAEVQIDRLIT GRLQSLQTYVTQQLIRAAE	−0.23
4	SMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQD	−0.63
5	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTRTQ	−1.07
6	SGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINA SVVNIQKEID	
7	ALHRSYLTPGDSSSGWTAGA	−0.58
8	PSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGTLVL PPLLTDEM IAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAAALQIPFAMQMAYR	
9	AIHVS GTNGTKRFD	−1.25
10	LGAENSVAYSNNNS	−0.61
11	QFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNC	−0.93
12	CPFGEVFNATRFASVYAWNRK	−0.95
13	ADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKL	−0.48
14	TQTNSPRRARS	−1.26
15	SNGTHW	−0.71
16	FEYVSQPFLMDLEGKQGNFKN	−1.55
17	KNFTTAPAICHGDKA	−0.99
18	NNATNVV	−0.68
19	PINLVRD	−0.90
20	KSNIIR	−0.83

Примечание. Токсичными являются эпитопы 6 и 8.

Такая модель позволила достичь высокой степени достоверности результата [22]. Модель для предсказания аллергенности имела обучающую выборку из 2427 аллергенных и столько же неаллергенных пептидов, что позволило получить достоверность предсказания выше 90% [17].

Полученные результаты позволят как сконструировать вакцину к данному варианту SARS-CoV-2, так и использовать предложенный подход в слу-

чае необходимости разработки вакцин к новым вариантам SARS-CoV-2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предсказаны В- и Т-клеточные эпитопы спайкового белка SARS-CoV-2. Проведена оценка их иммуногенности, аллергенности и токсичности. Показано, что они не являются аллергенами, большинство из них не являются токсинами. Таким

Таблица 6. Предсказание токсичности конформационных В-эпитопов

Эпитоп	Аминокислотный остаток	SVM-Score
1	A:S1239, A:C1240, A:C1241, A:S1242, A:C1243, A:L1244, A:K1245	−0.14
2	A:T1231, A:M1233, A:L1234, A:C1235, A:C1236, A:M1237, A:T1238	0.56
3	A:L1218, A:G1219, A:F1220, A:I1221, A:A1222, A:G1223, A:L1224, A:I1225, A:A1226, A:I1227, A:V1228, A:M1229, A:V1230, A:I1232	−0.85
4	A:I818, A:G1246, A:C1247, A:C1248, A:S1249, A:C1250, A:G1251, A:S1252, A:C1253, A:C1254, A:F1256, A:D1257, A:E1258, A:D1259, A:D1260, A:S1261, A:E1262, A:P1263, A:V1264, A:L1265, A:K1266, A:G1267, A:V1268	1.21
5	A:S1161, A:P1162, A:D1163	−0.80
6	A:W1212, A:P1213, A:W1214, A:Y1215, A:I1216	−0.53
7	A:K1269, A:L1270, A:H1271, A:Y1272	−0.79
8	A:S884, A:G885, A:W886, A:T887	−0.84
9	A:R457, A:K458, A:S459, A:N460, A:L461, A:K462, A:P463, A:F464, A:E465, A:R466, A:D467, A:I468, A:S469, A:T470, A:E471	−1.63
10	A:S730, A:M731, A:K733, A:S735, A:V736, A:D737, A:C738, A:T739, A:M740, A:Y741, A:I742, A:C743, A:G744, A:D745, A:S746, A:T747, A:E748, A:C749, A:S750, A:N751, A:L752, A:L753, A:L754, A:Q755, A:Y756, A:G757, A:S758, A:F759, A:C760, A:T761, A:Q762, A:L763, A:N764, A:R765, A:A766, A:L767, A:T768, A:G769, A:I770, A:A771, A:V772, A:E773, A:Q774, A:D775, A:S943, A:G946, A:K947, A:L948, A:Q949, A:D950, A:V951, A:V952, A:N953, A:Q954, A:N955, A:A956, A:Q957, A:A958, A:L959, A:N960, A:T961, A:L962, A:V963, A:K964, A:Q965, A:L966, A:S967, A:S968, A:N969, A:F970, A:G971, A:A972, A:I973, A:S974, A:S975, A:V976, A:L977, A:N978, A:D979, A:I980, A:L981, A:S982, A:R983, A:L984, A:D985, A:K986, A:E988, A:A989, A:E990, A:Q992, A:I993, A:D994, A:R995, A:L996, A:I997, A:T998, A:G999, A:R1000, A:L1001, A:Q1002, A:S1003, A:L1004, A:Q1005, A:Y1007, A:V1008, A:Q1011, A:L1012, A:R1014, A:A1015, A:A1016, A:E1017, A:D1165, A:L1166, A:G1167, A:D1168, A:I1169, A:S1170, A:G1171, A:I1172, A:N1173, A:A1174, A:S1175, A:V1176, A:V1177, A:N1178, A:I1179, A:K1181, A:E1182	
11	A:L7, A:L8, A:P9, A:L10	−1.00
12	A:L1145, A:D1146, A:S1147, A:F1148, A:K1149, A:E1150, A:E1151, A:L1152, A:D1153, A:F1156	−1.34
13	A:I1130, A:G1131, A:I1132, A:V1133	−0.76
14	A:C336, A:P337, A:G339, A:E340, A:V341, A:F342, A:N343, A:A344, A:T345, A:R346, A:F347, A:A348, A:S349, A:V350, A:Y351, A:A352, A:W353, A:N354, A:R355, A:K356, A:S371, A:A372, A:S373, A:F374, A:S375, A:A397, A:D398, A:S399, A:F400, A:V401, A:I402, A:R403, A:G404, A:D405, A:E406, A:V407, A:R408, A:Q409, A:I410, A:G416, A:K417, A:I418, A:A419, A:D420, A:Y421, A:Y423, A:A435, A:W436, A:N437, A:S438, A:N439, A:N440, A:L441, A:D442, A:S443, A:K444, A:V445, A:G446, A:G447, A:N448, A:Y449, A:N450, A:Y451, A:L452, A:Y453, A:R454, A:L455, A:F456, A:I472, A:Y473, A:Q474, A:A475, A:G476, A:S477, A:T478, A:P479, A:C480, A:N481, A:G482, A:V483, A:E484, A:G485, A:F486, A:N487, A:C488, A:Y489, A:F490, A:P491, A:L492, A:Q493, A:S494, A:Y495, A:G496, A:F497, A:Q498, A:P499, A:T500, A:N501, A:G502, A:V503, A:G504, A:Y505, A:Q506, A:P507, A:Y508, A:R509, A:V510, A:V511	
15	A:L821, A:L822, A:F823, A:K825, A:V826, A:T827, A:L828, A:A829, A:D830, A:A831, A:G832, A:F833, A:I834, A:K835, A:Q836, A:Y837, A:G838, A:D839, A:C840, A:L841, A:G842, A:D843, A:I844, A:A845, A:A846, A:R847, A:D848, A:L849, A:I850, A:C851, A:A852, A:Q853, A:K854, A:F855, A:N856, A:G857, A:L858, A:T859, A:V860, A:L861, A:P862, A:P863, A:L864, A:L865, A:T866, A:D867, A:E868, A:M869, A:I870, A:A871, A:Q872, A:Y873, A:T874, A:S875, A:A876, A:L877, A:L878, A:A879, A:G880, A:T881, A:I882, A:T883, A:G889, A:A890, A:G891, A:A892, A:A893, A:L894, A:I896, A:P897, A:F898, A:A899, A:M900, A:Q901, A:A903, A:Y904, A:R905, A:V911, A:Y1206, A:E1207, A:Q1208, A:Y1209	

Таблица 6. Окончание

Эпитоп	Аминокислотный остаток	SVM-Score
16	A:N1134, A:N1135, A:T1136	-0.80
17	A:S12, A:S13, A:Q14, A:C15, A:N17, A:L18, A:T19, A:R21, A:T22, A:A67, A:I68, A:H69, A:V70, A:S71, A:G72, A:T73, A:N74, A:G75, A:T76, A:K77, A:R78, A:F79, A:D80, A:N81, A:K97, A:S98, A:N99, A:I100, A:R102, A:N121, A:N122, A:A123, A:T124, A:N125, A:V127, A:Q134, A:F135, A:C136, A:N137, A:D138, A:P139, A:F140, A:L141, A:G142, A:V143, A:Y144, A:Y145, A:H146, A:K147, A:N148, A:N149, A:S151, A:W152, A:M153, A:E154, A:S155, A:E156, A:F157, A:R158, A:V159, A:Y160, A:S161, A:S162, A:A163, A:N164, A:N165, A:C166, A:T167, A:V171, A:S172, A:Q173, A:P174, A:F175, A:L176, A:M177, A:D178, A:L179, A:E180, A:G181, A:K182, A:Q183, A:G184, A:N185, A:F186, A:K187, A:N188, A:N211, A:L212, A:V213, A:R214, A:D215, A:A243, A:L244, A:H245, A:R246, A:S247, A:Y248, A:L249, A:T250, A:P251, A:G252, A:D253, A:S254, A:S255, A:S256, A:G257, A:W258, A:T259, A:A260, A:G261, A:A262	
18	A:S698, A:L699, A:G700, A:A701, A:E702, A:N703, A:S704, A:V705, A:A706, A:Y707, A:S708, A:N709, A:N710, A:S711, A:T716, A:K1073, A:N1074, A:F1075, A:T1076, A:T1077, A:A1078, A:P1079, A:A1080, A:I1081, A:C1082, A:H1083, A:D1084, A:G1085, A:K1086, A:A1087, A:S1097, A:N1098, A:G1099, A:T1100, A:H1101, A:W1102, A:S1123, A:G1124, A:N1125, A:C1126, A:D1127, A:V1128	-0.72
19	A:N679, A:S680, A:P681, A:A684, A:S686, A:V687	-0.43
20	A:Q1180, A:I1183, A:D1184	-0.80
21	A:Q1142, A:P1143, A:E1144	-0.84
22	A:D808, A:P809, A:S810, A:K811, A:P812, A:S813, A:K814	-0.78

Примечание. Токсичными являются эпитопы 2, 4, 10, 14, 15, 17.

образом, большинство найденных эпитопов могут быть использованы при конструировании прототипа пептидной вакцины против SARS-CoV-2.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 гг. (Соглашение № 075-15-2021-1355 (12 октября 2021 г.)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses // *Nat Microbiol.* 2020. V. 5 (4). P. 536.
<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
2. Beeching N.J., Fletcher T.E., Flower R. // *BMJ Best Practice Coronavirus Disease (COVID-19).*
3. Heymann D.L., Shido N. // *Lancet.* 2020. V. 395 (10224). P. 542.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30374-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30374-3)
4. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (2019-nCoV) infection is suspected: interim guidance, WHO, 2020, 28 January.
5. Araf Y., Moin A.T., Timofeev V.I. et al. // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. 863234.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.863234>
6. Abass O.A., Timofeev V.I., Sarkar B. et al. // *J. Biomolecular Structure and Dynamics.* 2021. V. 40 (16). P. 7283.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1896387>
7. Quarleri J., Galvan V., Delpino M.V. // *GeroScience.* 2022. V. 44 (1). P. 53.
<https://doi.org/10.1007/s11357-021-00500-4>
8. Gowrisankar A., Priyanka T.M., Banerjee S. // *Eur. Phys. J. Plus.* 2022. V. 137. P. 100.
<https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-021-02321-y>
9. Yao L., Zhu K. L., Jiang X. L. et al. // *Lancet. Infectious Diseases.* 2022. V. 22. № 8. P. 1116.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00410-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00410-8)
10. Cao Y., Yisimayi A., Jian F. et al. // *Nature.* 2022. V. 608 (7923). P. 593.
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04980-y>
11. Gallagher T.M., Buchmeier M.J. // *Virology.* 2001. V. 279. № 2. P. 371.
12. Larsen M.V., Lundegaard C., Lamberth K. et al. // *BMC Bioinformatics.* 2007. V. 8. 424.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-424>

13. *Buus S., Lauemoller S.L., Worning P. et al.* // *Tissue Antigens*. 2003. V. 62. № 5. P. 378.
14. *Potocnakova L., Bhide M., Pulzova L.B.* // *J. Immunol. Res.* 2016. 6760830.
<https://doi.org/10.1155/2016/6760830>
15. *Ponomarenko J., Bui H.H., Li W. et al.* // *BMC Bioinformatics*. 2008. V. 9. 514.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-514>
16. *Dimitrov I., Bangov I., Flower D.R., Doytchinova I.* // *J. Mol. Model.* 2014. V. 20. 2278.
<https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5>
17. *Gupta S., Kapoor P., Chaudhary K. et al.* // *PLoS ONE*. 2013 V. 8 (9). № 73957.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>
18. *Doytchinova I.A., Flower D.R.* // *BMC Bioinformatics*. 2007. V. 8 (4).
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>
19. *Kudriavtsev A.V., Vakhrusheva A.V., Novoseletsky V.N. et al.* // *Viruses*. 2022. V. 14 (8). 1603.
<https://doi.org/10.3390/v14081603>
20. *Hallgren J., Konstantinos D.T., Pedersen M.D. et al.* // *bioRxiv*. 2022.
<https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
21. *Sharma N., Naorem L.D., Jain S., Raghava G.P.S.* // *Briefings in bioinformatics*. 2022. V. 23. № 5. 174.
<https://doi.org/10.1093/bib/bbac174>

ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЭПИТОПОВ В ОБОЛОЧЕЧНОМ БЕЛКЕ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

© 2023 г. И. А. Колесников¹, В. И. Тимофеев^{1,2}, А. В. Ермаков¹, А. С. Ивановский^{2,*},
Ю. А. Дьякова¹, Ю. В. Писаревский^{2,1}, М. В. Ковальчук^{1,2}

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника РАН”, Москва, Россия

*E-mail: a. Iwanowski@gmail.com

Поступила в редакцию 19.04.2023 г.

После доработки 23.05.2023 г.

Принята к публикации 09.08.2023 г.

Смоделирована пространственная структура оболочечного белка вируса африканской чумы свиней, рассчитана его топология относительно клеточной мембраны, предсказаны В- и Т-клеточные эпитопы для этого белка, проведена оценка их иммуногенности, аллергенности, токсичности. Изучены вариабельность аминокислот в белке и консервативность найденных эпитопов. Показано, что на основе найденных эпитопов возможна разработка новой пептидной вакцины против африканской чумы свиней.

DOI: 10.31857/S0023476123600179, EDN: HJNXSQ

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) — это вирусная болезнь свиней, которая характеризуется лихорадкой, цианозом кожи, обширными кровоизлияниями во внутренние органы [1]. Источником заболевания являются больные животные и вирусоносители. Заболевание не представляет опасности для человека. В настоящее время не существует эффективных вакцин и методов лечения данного заболевания, в результате все зараженное поголовье свиней погибает [2]. С целью борьбы с распространением АЧС все поголовье в обнаруженном очаге заражения умерщвляется бескровным методом и сжигается. Таким образом, АЧС является заболеванием, наносящим существенный ущерб животноводству: на территории России уничтожено около миллиона зараженных свиней, экономический ущерб превысил 30 млрд рублей [3].

Возбудителем АЧС является ДНК-содержащий вирус африканской чумы свиней, единственный представитель рода асфивирусов и семейства асфаровирусов [4, 5]. Данный вирус содержит более 180 генов, причем количество генов немного различается для различных изолятов [6]. Как и при других вирусных геморрагических лихорадках, основными клетками-мишенями для репликации являются клетки моноцитарного и макрофагального происхождения. Проникновение вируса в клетку-хозяина опосредуется рецептором, но точный механизм эндоцитоза в настоя-

щее время неясен [7]. Резервуарами вируса африканской чумы свиней (ВАЧС) являются некоторые виды клещей и дикие африканские свиньи [8].

Одним из основных антигенов ВАЧС является кодируемый геном EP402R белок, гомологичный рецептору адгезии Т-клеток, CD2. Известно, что этот белок непосредственно вовлечен в явление гемадсорбции, вызванное инфицированием восприимчивых клеток ВАЧС [9, 10].

Существуют подходы, основанные на алгоритмах иммуноинформатики, позволяющие идентифицировать эпитопы вирусных антигенов и разрабатывать на их основе пептидные вакцины [11, 12]. В данной работе белок ВАЧС, кодируемый геном EP402R, использован для поиска Т- и В-клеточных эпитопов. Показано, что предсказанные эпитопы являются иммуногенными, нетоксичными и неаллергенными и могут быть использованы для конструирования вакцины на их основе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Анализ аминокислотной последовательности. Первичная последовательность белка ВАЧС, кодируемого геном EP402R (CD2p), получена из НБГИ (Национальная база генетической информации) [13]. Для анализа консервативности найденных эпитопов использовали аминокислотные последовательности CD2p из пяти различных изолятов ВАЧС, взятых из НБГИ. Данные после-

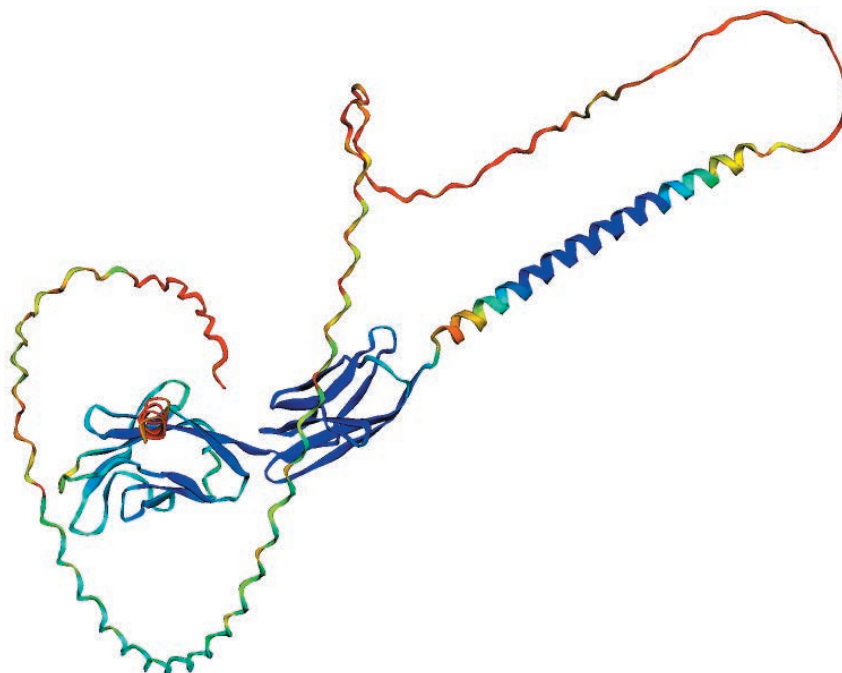


Рис. 1. Трехмерная структура белка CD2p, смоделированная AlphaFold. Окраска соответствует достоверности предсказания структуры. Надмембранный фрагмент предсказан надежно.

достоверности найдены с использованием алгоритма BLAST [14]. Для анализа встречаемости найденных эпитопов в протеоме ВАЧС был выбран один из аннотированных протеомов ВАЧС из НГБИ.

Пространственная структура белка CD2p смоделирована с использованием AlphaFold2 [15]. Для изучения топологии белка относительно клеточной мембраны использовали программу ТМНММ [16].

Предсказание Т- и В-клеточных эпитопов. Т-клеточные эпитопы предсказывали с помощью NetCTL [17]. Использовали следующие параметры: фактор ТАР-зависимого транспорта — 0.05, тип главного комплекса гистосовместимости — 1, порог протеасомного расщепления — 0.15, порог идентификации эпитопов — 0.75. Как прерывистые (конформационные), так и линейные эпитопы предсказаны с помощью инструмента прогнозирования ElliPro [18], сервера IEDB [19]. Нижайшая оценка и максимальное расстояние были откалиброваны с использованием значений по умолчанию с minimum score — 0.5 Å и maximum distance — 6 Å соответственно. Для предсказания конформационных (прерывистых) и линейных В-клеточных эпитопов использовали смоделированную трехмерную структуру белка.

Анализ биологических свойств найденных эпитопов. Для анализа аллергенности найденных эпитопов использовали программу AllerTOP [20], для

анализа токсичности — ToxinPred [21]. Иммуногенность оценивали с использованием VaxiJen [22].

Анализ консервативности найденных эпитопов в различных изолятах ВАЧС и встречаемости в протеоме одного из изолятов проводили с использованием Epitope Conservacy Analysis [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования была выбрана аминокислотная последовательность белка с идентификатором UniProt A0A7T0LXP0. Последовательность содержит 402 аминокислотных остатка (а.о.). Для оценки перспективности данного белка как антигена была применена программа VaxiJen [22]. В результате моделирования выявлено, что исследованный белок, вероятно, является антигеном.

На первом этапе исследования на основе данной последовательности смоделировали трехмерную структуру исследуемого белка (рис. 1). Из рисунка видно, что надежно смоделированы два домена, состоящие преимущественно из β -слоев и α -спиралей. Кроме того, последовательность содержит участок, который не удалось надежно смоделировать, что следует из данных Alpha Fold 2.

Анализ топологии белка относительно клеточной мембраны с использованием ТМНММ [16] показал, что а.о. с 16 по 206 являются надмембранными, а.о. 207–227 представляют трансмембранный фрагмент, а.о. 228–402 — внутриклеточ-

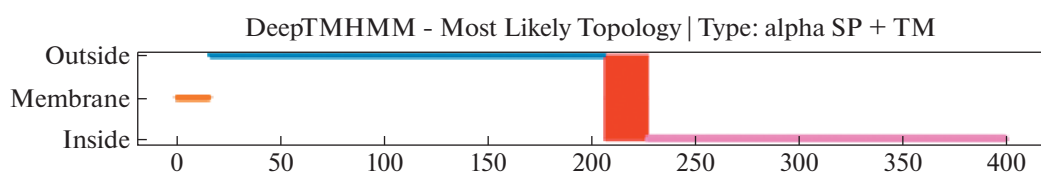


Рис. 2. Топология белка CD2p относительно клеточной мембраны. Получена с использованием системы искусственного интеллекта.

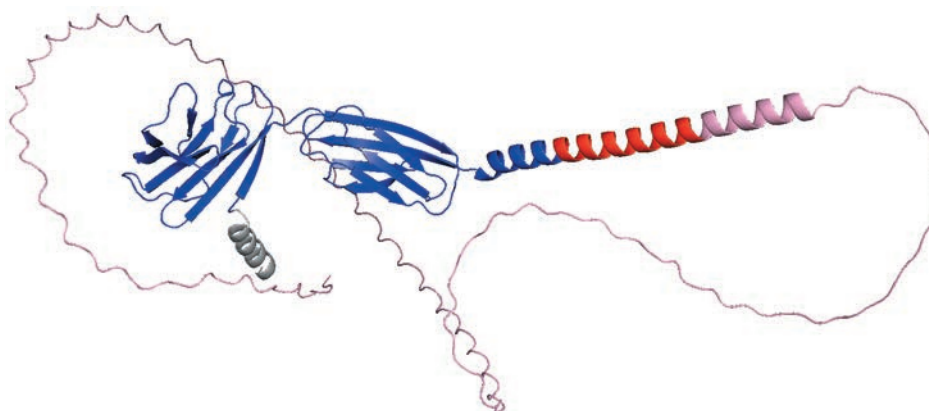


Рис. 3. Топология белка CD2p относительно клеточной мембраны, наложенная на трехмерную структуру белка. Синим показан надмембранный фрагмент, красным – трансмембранный, розовым – внутриклеточный.

ный фрагмент белка (рис. 2, 3). Внеклеточный участок представлен β -доменами и началом α -спирали и является наиболее перспективным для поиска эпитопов.

Для поиска Т-клеточных эпитопов использовали первичную последовательность белка. Поиск проводили с использованием программы NetCTL [24] только для ГКГ (главный комплекс гистосовместимости) класса I [25]. Вся последовательность была разделена на 394 пептида по 9 аминокислот, из них 12 были идентифицированы как антигенные детерминанты (табл. 1).

В-клеточные эпитопы можно разделить на два типа в зависимости от их пространственной структуры: непрерывные (линейные) и прерывистые (конформационные) эпитопы [26]. Эпитопы были предсказаны с помощью ElliPro [18] и модели трехмерной структуры белка. При работе с этим методом используются доступность растворителя и гибкость для прогнозирования эпитопов. Инструмент прогнозирования ElliPro выбирает антигенные остатки из известной трехмерной структуры белка. Найденные прерывистые эпитопы представлены в табл. 2.

На рис. 4 выделены фрагменты белка CD2p, являющиеся эпитопами. Из рисунка видно, что основная часть антигенных детерминант находится в N-концевом β -доме белка CD2p. Таким

образом, данный домен может быть использован как основа пептидной субъединичной вакцины против ВАЧС.

Таблица 1. Т-клеточные эпитопы

ID	Первичная последовательность белка	Аффинность	Оценочная функция
90	NTEIFNRITY	0.717	3.3352
116	SVDSPTITY	0.5894	2.8012
154	DTNGDILNY	0.4773	2.281
32	NIFTINDTY	0.2081	1.1817
279	YQYNTPIYY	0.15	0.9481
389	STQNISLIH	0.2162	0.9027
78	TTNCSLII	0.2006	0.8936
271	LLPKPYSRY	0.1377	0.8704
68	CCGHNISLY	0.1546	0.8689
203	STLFYIIF	0.1279	0.7746
40	YGGLFWNTY	0.116	0.757
21	WSTLNQTVF	0.135	0.7535

Таблица 2. В-клеточные эпитопы

Аминокислотные остатки	Количество остатков	Значение
A:S243, A:P244, A:P245, A:P246, A:S247, A:E248, A:S249, A:N250, A:E251, A:E252, A:D253, A:I254, A:S255, A:H256, A:D257, A:D258, A:T259, A:T260, A:S261, A:I262, A:H263, A:E264, A:P265, A:S266, A:P267, A:R268	26	0.939
A:K236, A:H237, A:E239, A:E240	4	0.915
A:K374, A:P375, A:L376, A:P377, A:S378, A:I379, A:P380, A:L381, A:L382, A:P383, A:N384	11	0.863
A:R335, A:P336, A:P337, A:K338, A:P339, A:C340, A:P341, A:P342, A:P343, A:K344, A:P345, A:C346, A:P347, A:P348, A:P349, A:K350, A:P351, A:C352, A:P353, A:P354, A:P355, A:K356, A:P357, A:C358, A:P359, A:P360, A:P361, A:K362, A:P363, A:C364, A:P365, A:S366, A:P367, A:E368, A:S369, A:Y370, A:S371, A:P372, A:P373	39	0.816
A:Q293, A:P294, A:L295, A:N296, A:P297, A:F298, A:P299, A:L300, A:P301, A:K302, A:P303, A:C304, A:P305, A:P306, A:P307, A:K308, A:P309, A:C310, A:P311, A:P312, A:P313, A:K314, A:P315, A:C316, A:P317, A:P318, A:P319, A:K320, A:P321, A:C322, A:P323, A:P324, A:P325, A:K326, A:P327, A:C328, A:S329, A:P330, A:P331, A:K332, A:P333, A:C334	42	0.757
A:G219, A:I220, A:F221, A:I222, A:S223, A:I224, A:I225, A:S226, A:V227, A:L228, A:S229, A:I230, A:R231, A:K233, A:R234	15	0.672
A:R289, A:P290, A:S291, A:T292	4	0.652
A:E269, A:P270, A:L271, A:L272, A:P273, A:K274, A:P275, A:Y276, A:S277	9	0.625
A:I385, A:P386, A:P387, A:L388, A:S389, A:T390, A:Q391, A:N392	8	0.604
A:F211, A:S214, A:G215, A:L216, A:I217, A:I218	6	0.56
A:R278, A:Y279, A:Q280, A:Y281, A:N282, A:T283, A:P284, A:I285	8	0.539
A:H397, A:D399, A:R400	3	0.53

Анализ биологических свойств эпитопов, найденных с использованием соответствующих алгоритмов, показал, что они нетоксичны, не аллергенны и являются перспективными иммунными детерминантами (табл. 3, 4). Достоверность полу-

ченных результатов определяли с помощью систем искусственного интеллекта.

С использованием BLAST были найдены пять штаммов ВАЧС (UniProt ID: Q89501, P0C9V8, P0C9V6, P0C9V9, P0C9V7), с использованием

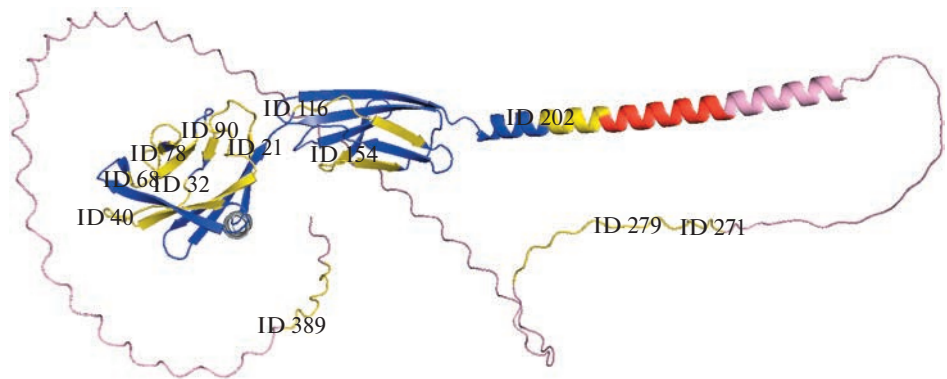


Рис. 4. Т-клеточные эпитопы на трехмерной структуре, отмеченные желтым цветом с указанными ID (табл. 1).

Таблица 3. Результат проверки токсичности Т-эпитопов

Пептидная последовательность	Значение машины опорных векторов
NTEIFNRTY	–1.1
SVDSPTITY	–1.13
DTNGDILNY	–0.66
NIFTINDTY	–0.81
YQYNTPIYY	–1.12
STQNISLIH	–1.39
TTNNCSLIH	–0.44
LLPKPYSRY	–0.7
CCGHNISLY	0.5
STLFYIIIF	–0.89
YGGLFWNTY	–0.83
WSTLNQTVF	–1.2

Примечание. Ни у одной последовательности нет мутации. Токсином является только CCGHNISLY.

Таблица 4. Результат проверки токсичности В-эпитопов

Пептидная последовательность	Значение машины опорных векторов
SPPPSSESNEEDISHDDTTSIH EPSPR	–0.95
KHEE	–0.76
KPLPSIPLLPN	–1.26
RPPKPCPPKPCPPKPCPP KPCPPKPCSPESYSPP	–1.26
GIFISIISVLSIRKA	–1.29
RPST	–0.79
EPLLPKPYS	–1.27
IPPLSTQN	–0.6
FSGLII	–1.14
RYQYNTPI	–0.63
HDR	–0.83

Примечание. Ни одна из последовательностей не имеет мутации и не является токсином.

Epitope Conservacy Analysis [23] проверена консервативность найденных эпитопов в данных пяти штаммах. Результат приведен в табл. 5, 6. Достоверность полученных результатов определяли с помощью систем искусственного интеллекта.

Установлено, что эпитопы со следующими аминокислотными последовательностями: YQYNTPIYY, STQNISLIH, LLPKPYSRY встречаются во всех вариантах белка CD2p ВАЧС, что говорит о том,

что данный белок подходит для конструирования вакцины.

Проанализирована консервативность эпитопов в другом протеоме – UP000101566 (African swine fever virus (ASFV)), со следующими белками: A0A0C5BCP6, A0A0C5AWT8, A0A0C5AWM9, A0A0C5AZ99, A0A0C5AZW1, A0A0C5B2J6, A0A0C5AZA5, A0A0C5AZJ5, B7TBE9, A0A0C5AWM3, A0A0C5AWP7, A0A0C5AZ57, A0A0C5B2H4, A0A0C5B2U2, A0A0C5BCJ7, A0A0C5AWJ1. Ре-

Таблица 5. Общие показатели консервативности найденных эпитопов

Эпитоп	Пептидная последовательность	Совпадение белковой последовательности, %	Процент сходства	
			минимальный	максимальный
1	NTEIFNRTY	60 (3/5)	44.44	100
2	SVDSPTITY	80 (4/5)	44.44	100
3	DTNGDILNY	100 (5/5)	55.56	100
4	NIFTINDTY	60 (3/5)	44.44	100
5	YQYNTPIYY	100 (5/5)	100	100
6	STQNISLIH	100 (5/5)	100	100
7	TTNNCSLIH	100 (5/5)	55.56	100
8	LLPKPYSRY	100 (5/5)	100	100
9	CCGHNISLY	20 (1/5)	44.44	100
10	STLFYIIIF	100 (5/5)	66.67	100
11	YGGLFWNTY	60 (3/5)	33.33	100
12	WSTLNQTVF	40 (2/5)	44.44	100

Таблица 6. Уточненные значения консервативности найденных эпитопов

Белок	Позиция	Белковая подпоследовательность	Процент сходства	Белок	Позиция	Белковая подпоследовательность	Процент сходства
1. NTEIFNRTY				7. TTNNCSLII			
Q89501	90–98	NTEIFNRTY	100	Q89501	78–86	TTNNCSLII	100
P0C9V8	87–95	NTSIYNVTN	55.56	P0C9V8	93–101	VTNNCSLTI	77.78
P0C9V6	86–94	NTKIFNTTY	77.78	P0C9V6	74–82	ITNNCSLTI	77.78
P0C9V9				P0C9V9	77–85, 362–370	IAHNCSLTI, STQNISLIH	55.56
P0C9V7				P0C9V7	89–97	ITNNCSLTI	77.78
2. SVDSPTITY				8. LLPKPYSRY			
Q89501	116–124	SVDSPTITY	100	Q89501	271–279	LLPKPYSRY	100
P0C9V8	130–138	PVTSPNITY	66.67	P0C9V8	291–299	LLPKPYSRY	100
P0C9V6	112–120	PVTSPHITY	66.67	P0C9V6	274–282	LLPKPYSRY	100
P0C9V9	113–121	PVTTPNITY	55.56	P0C9V9	274–282	LLPKPYSRY	100
P0C9V7				P0C9V7	287–295	LLPKPYSRY	100
3. DTNGDILNY				9. CCGHNISLY			
Q89501	154–162	DTNGDILNY	100	Q89501	68–76	CCGHNISLY	100
P0C9V8	168–176	HTNQDILTY	66.67	P0C9V8			
P0C9V6	150–158	YTNKSFLNY	55.56	P0C9V6			
P0C9V9	151–159	YTNESILEY	55.56	P0C9V9			
P0C9V7	165–173	YTNESILNY	66.67	P0C9V7			
4. NIFTINDTY				10. STLFYIIIF			
Q89501	32–40	NIFTINDTY	100	Q89501	203–211	STLFYIIIF	100
P0C9V8	162–170	NNITINHTN	55.56	P0C9V8	224–232	HTLFYIIIF	88.89
P0C9V6				P0C9V6	207–215	HTLFYMIIF	77.78
P0C9V9	140–148	IYFNINDTN	55.56	P0C9V9	206–214	SYMFYMIIF	66.67
P0C9V7				P0C9V7	221–229	SYIFYMIIF	66.67
5. YQYNTPIYY				11. YGGLFWNTY			
Q89501	279–287	YQYNTPIYY	100	Q89501	40–48	YGGLFWNTY	100
P0C9V8	299–307	YQYNTPIYY	100	P0C9V8	40–48	ELGIFWNSY	55.56
P0C9V6	282–290	YQYNTPIYY	100	P0C9V6	37–45	TEGIFWNFY	55.56
P0C9V9	282–290	YQYNTPIYY	100	P0C9V9			
P0C9V7	295–303	YQYNTPIYY	100	P0C9V7			
6. STQNISLIH				12. WSTLNQTVF			
Q89501	389–397	STQNISLIH	100	Q89501	21–29	WSTLNQTVF	100
P0C9V8	391–399	STQNISLIH	100	P0C9V8			
P0C9V6	368–376	STQNISLIH	100	P0C9V6			
P0C9V9	362–370	STQNISLIH	100	P0C9V9			
P0C9V7	379–387	STQNISLIH	100	P0C9V7	194–202	ISTSNTTEF	55.56

Таблица 7. Общие показатели консервативности эпитопов к белкам протеома UP000101566

Эпитоп	Первичная последовательность эпитопа	Совпадение белковой последовательности, %	Процент сходства	
			минимальный	максимальный
1	NTEIFNRTY	0.00% (0/16)	22.22	44.44
2	SVDSPTITY	0.00% (0/16)	33.33	44.44
3	DTNGDILNY	0.00% (0/16)	22.22	44.44
4	NIFTINDTY	6.25% (1/16)	22.22	55.55
5	YQYNTPIYY	6.25% (1/16)	22.22	100
6	STQNISLIH	6.25% (1/16)	22.22	100
7	TTNNCSLII	12.50% (2/16)	22.22	100
8	LLPKPYSRY	6.25% (1/16)	33.33	100
9	CCGHNISLY	0.00% (0/16)	22.22	44.44
10	STLFYIIIF	18.75% (3/16)	33.33	88.89
11	YGGLFWNTY	6.25% (1/16)	22.22	55.56
12	WSTLNQTVF	0.00% (0/16)	22.22	44.44

зультат анализа консерватизма эпитопов для перечисленных белков приведен в табл. 7, 8. Достоверность полученных результатов определяли с помощью систем искусственного интеллекта.

Таблица 8. Уточненные значения консервативности эпитопов к белкам протеома UP000101566

Белок	Позиция	Белковая подпоследовательность	Процент сходства
4. NIFTINDTY			
A0A0C5AWP7	108–116	EIFLINGTH	55.56
5. YQYNTPIYY			
A0A0C5AZA5	300–308	YQYNTPIYY	100
6. STQNISLIH			
A0A0C5AZA5	372–380	STQNISLIH	100
7. TTNNCSLII			
A0A0C5AZA5	91–99	TTNNCSLII	100
A0A0C5B2H4	247–255	TTNSCDSIQ	55.56
8. LLPKPYSRY			
A0A0C5AZA5	292–300	LLPKPYSRY	100
10. STLFYIIIF			
A0A0C5AWT8	810–818	NTAFLIKIF	55.56
A0A0C5AZA5	224–232	HTLFYIIIF	88.89
A0A0C5AWP7	1137–1145	SALLYSIEF	55.56
11. YGGLFWNTY			
A0A0C5AZA5	47–55	LNGIFWNIY	55.56

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты анализа найденных *in silico* антигенных детерминант белка CD2p ВАЧС позволяют сделать вывод о перспективности использования ряда из них для создания пептидной вакцины против ВАЧС. Некоторые из найденных детерминант являются консервативными для всех проанализированных изолятов вируса, следовательно, данные эпитопы могут быть использованы для конструирования вакцин для каждого из вариантов вируса ВАЧС.

Исходя из того, что больше всего антигенных детерминант представлено в N-концевом β-доме CD2p, можно сделать вывод о перспективности его использования как компонента субъединичной вакцины против ВАЧС.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mettenleiter T.C., Sobrino F. // Animal Viruses: Molecular Biology. 2008. V. 14. P. 5.
<https://doi.org/10.3201/eid1405.080077>
2. Anderson E.C., Hutchings G.H., Mukarati N., Wilkinson P.J. // Veterinary Microbiology. 1998. V. 62 (1). P. 1.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00187-4)
3. Khomenko S., Beltrán-Alcrudo D., Rozstalnyy A. et al. // Empress Watch. 2013. V. 28. P. 1
4. Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G., Niemczuk K. // Sci Rep. 2019. V. 9. № 4556.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36823-0>

5. Colson P., De Lamballerie X., Yutin N. et al. // Arch Virol. 2013. V. 158. P. 2517.
<https://doi.org/10.1007/s00705-013-1768-6>
6. Dixon L.K., Chapman D.A., Netherton C.L., Upton C. // Virus Res. 2013. V. 173 (1). P. 3.
7. Netherton C.L., Wileman T.E. // Virus Res. 2013. V. 173 (1). P. 76.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.014>
8. Gaudreault N.N., Madden D.W., Wilson W.C. et al. // Front. Vet. Sci. 2020. V. 7. 215.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00215>
9. Rodríguez J.M., Yáñez R.J., Almazán F. et al. // J. Virol. 1993. V. 67. № 9. P. 5312.
<https://doi.org/10.1128/jvi.67.9.5312-5320.1993>
10. Ruiz-Gonzalvo F., Rodríguez F., Escribano J.M. // Virology. 1996. V. 218 (1). P. 285.
<https://doi.org/10.1006/viro.1996.0193>
11. Abass O.A., Timofeev V.I., Sarkar B. et al. // J. Biomol. Struct. Dynamics. 2021. V. 40 (16). P. 7283.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1896387>
12. Araf Y., Moin A.T., Timofeev V.I. et al. // Front. Immunol. 2022. V. 13. 863234.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.863234>
13. Q89501. <https://nbg.ru/>
14. Altschul S.F., Gish W., Miller W. et al. // J. Mol. Biol. 1990. V. 215 (3). P. 403.
15. Jumper J., Evans R., Pritzel A. et al. // Nature. 2021. V. 596. P. 583.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
16. Jeppe H., Trigos K.D., Pedersen M.D. et al. // bioRxiv. 2022.
<https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
17. Larsen M.V., Lundegaard C., Lamberth K. et al. // BMC Bioinformatics. 2007. V. 8. 424.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-424>
18. <http://tools.iedb.org/ellipro/>
19. Ponomarenko J., Bui H.H., Li W. et al. // BMC Bioinformatics. 2008. V. 9. 514.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-514>
20. Dimitrov I., Bangov I., Flower D.R. et al. // J. Mol. Model. 2014. V. 20 (5). 2278.
<https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5>
21. Gupta S., Kapoor P., Chaudhary K. et al. // PLoS ONE. 2020. V. 8 (9). e73957.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>
22. Doytchinova I.A., Flower D.R. // BMC Bioinformatics. 2007. V. 8. 4.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>
23. Bui H., Sidney J.H., Li W. et al. // BMC Bioinformatics. 2007. V. 8 (1). 361.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-361>
24. Larsen M.V., Lundegaard C., Lamberth K. et al. // BMC Bioinformatics. 2007. V. 8. 424.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-424>
25. Choo S.Y. // Yonsei Med J. 2007. V. 48 (1). P. 11.
<https://doi.org/10.3349/ymj.2007.48.1.11>
26. Potocnakova L., Bhide M., Pulzova L.B. // J. Immunol. Res. 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/6760830>

ПРИМЕНЕНИЕ ДАННЫХ БЕЛКОВОЙ КРИСТАЛЛОГРАФИИ И МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПЕПТИДНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

© 2023 г. А. С. Ивановский^{2,*}, И. А. Колесников¹, Ю. В. Кордонская^{1,2}, А. В. Ермаков¹,
М. А. Марченкова^{1,2}, В. И. Тимофеев^{1,2}, Ю. В. Писаревский^{1,2},
Ю. А. Дьякова¹, М. В. Ковальчук¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника РАН, Москва, Россия

*E-mail: a. Iwanowski@gmail.com

Поступила в редакцию 22.04.2023 г.

После доработки 20.06.2023 г.

Принята к публикации 20.06.2023 г.

Проанализирован геном африканской чумы свиней и выявлен белок, способный служить иммуногеном. Для водорастворимого фрагмента данного белка методом молекулярной динамики показано, что он стабилен в водно-солевом растворе. Иммуномоделирование показало, что данный фрагмент вызывает клеточный ответ, следовательно, может быть использован в качестве прототипа вакцины.

DOI: 10.31857/S0023476123600805, EDN: YEINQY

ВВЕДЕНИЕ

При разработке пептидных вакцин используются антигены патогенов, в качестве которых обычно выступают трансмембранные белки, проблемы использования которых заключаются в их нерастворимости в воде и практической невозможности экспрессии.

В последнее время эти трудности обходят за счет выделения насыщенного эпитопами водорастворимого и легко экспрессируемого фрагмента иммуногенного белка.

В настоящей работе такой подход применен к вирусу африканской чумы свиней (ВАЧС).

Одной из основных антигенных детерминант ВАЧС является кодируемый геном EP402R белок, гомологичный рецептору адгезии Т-клеток, CD2 [1].

Африканская чума свиней — это вирусная болезнь свиней, для которой характерны лихорадка, цианоз кожи и обширные кровоизлияния во внутренние органы [2]. Распространителями заболевания являются больные животные и вирусносители. Болезнь не поражает человека, однако в настоящее время не существует эффективных методов профилактики и лечения данного заболевания, а все зараженные животные погибают [3]. Для борьбы с распространением африканской чумы свиней все поголовье в обнаруженном очаге и радиусе 20 км от него умерщвляется бес-

кровным методом и сжигается, что наносит существенный ущерб животноводству [4].

Возбудителем африканской чумы свиней является ДНК-содержащий вирус, представитель рода асфивирусов и семейства асфаровирусов [5, 6]. Вирус содержит ~180 генов [7]. Как и при других вирусных геморрагических лихорадках, основными клетками-мишенями для репликации являются клетки моноцитарного и макрофагального происхождения. Проникновение вируса в клетку-хозяина опосредуется рецептором, но точный механизм эндоцитоза в настоящее время неясен [8]. Резервуарами ВАЧС являются некоторые виды клещей и дикие африканские свиньи [9].

Разработка пептидной вакцины против ВАЧС состояла из двух этапов.

На первом этапе [10] смоделировали пространственную структуру оболочечного белка ВАЧС, рассчитали его топологию относительно клеточной мембраны, предсказали эпитопы для этого белка, провели оценку их иммуногенности, аллергенности, токсичности, изучили вариабельность аминокислот в белке и консервативность найденных эпитопов.

В настоящей работе, представляющей второй этап разработки вакцины, проведена оценка стабильности этого белка в водном растворе методом молекулярной динамики, а также иммуномо-

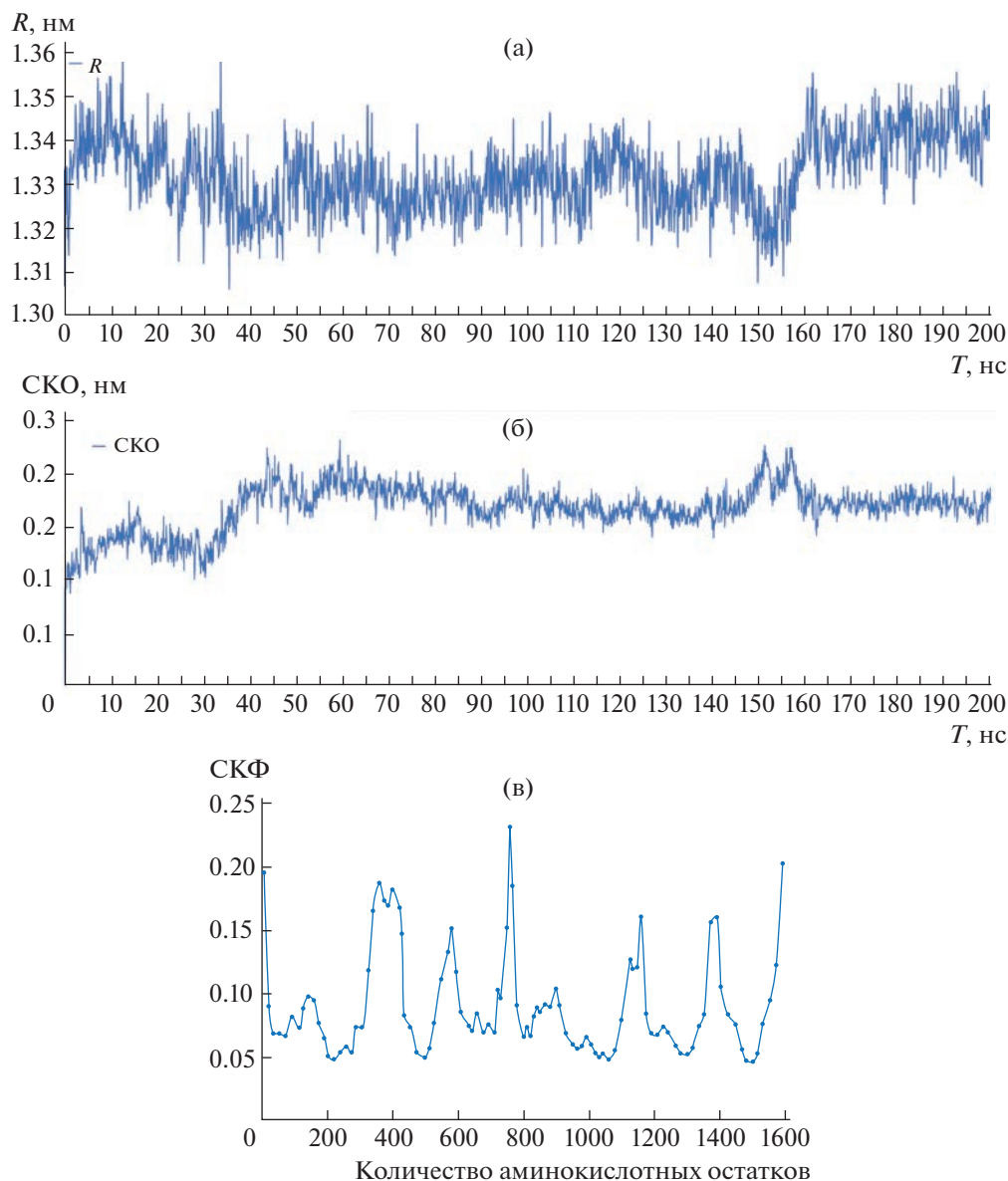


Рис. 1. Радиус гирации фрагмента иммуногенного белка вируса африканской чумы свиней R_g nm (а), СКО фрагмента иммуногенного белка ВАЧС (б), СКФ атомов фрагмента иммуногенного белка ВАЧС (в).

делирование клеточного ответа на данный антиген. Выявлен богатый эпитопами фрагмент белка, который с помощью вычислительного эксперимента был также проверен на стабильность в водно-солевом растворе и на иммуногенность. Показано, что данный антиген может быть использован для разработки вакцины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фрагмент белка для дальнейшей работы с ним выделен из целевого белка с использованием программы PyMol [11].

Молекулярно-динамическое (МД) моделирование выполнено для вакцины с использованием версии 2020.3 пакета динамического моделирования GROMACS [12].

Силовое поле AMBER99SB-ILDN [13] использовали с моделью воды TIP3P и добавлением 0.15 М KCl к системе. Для нейтрализации общего заряда системы к ней были добавлены некоторые дополнительные ионы. Чтобы расслабить структуру и избежать стерических столкновений в дальнейшем моделировании, минимизацию энергии проводили с шагом 1 фс до максимальной силы 1000.0 кДж/моль/нм. После этого давление и температура системы были уравнове-

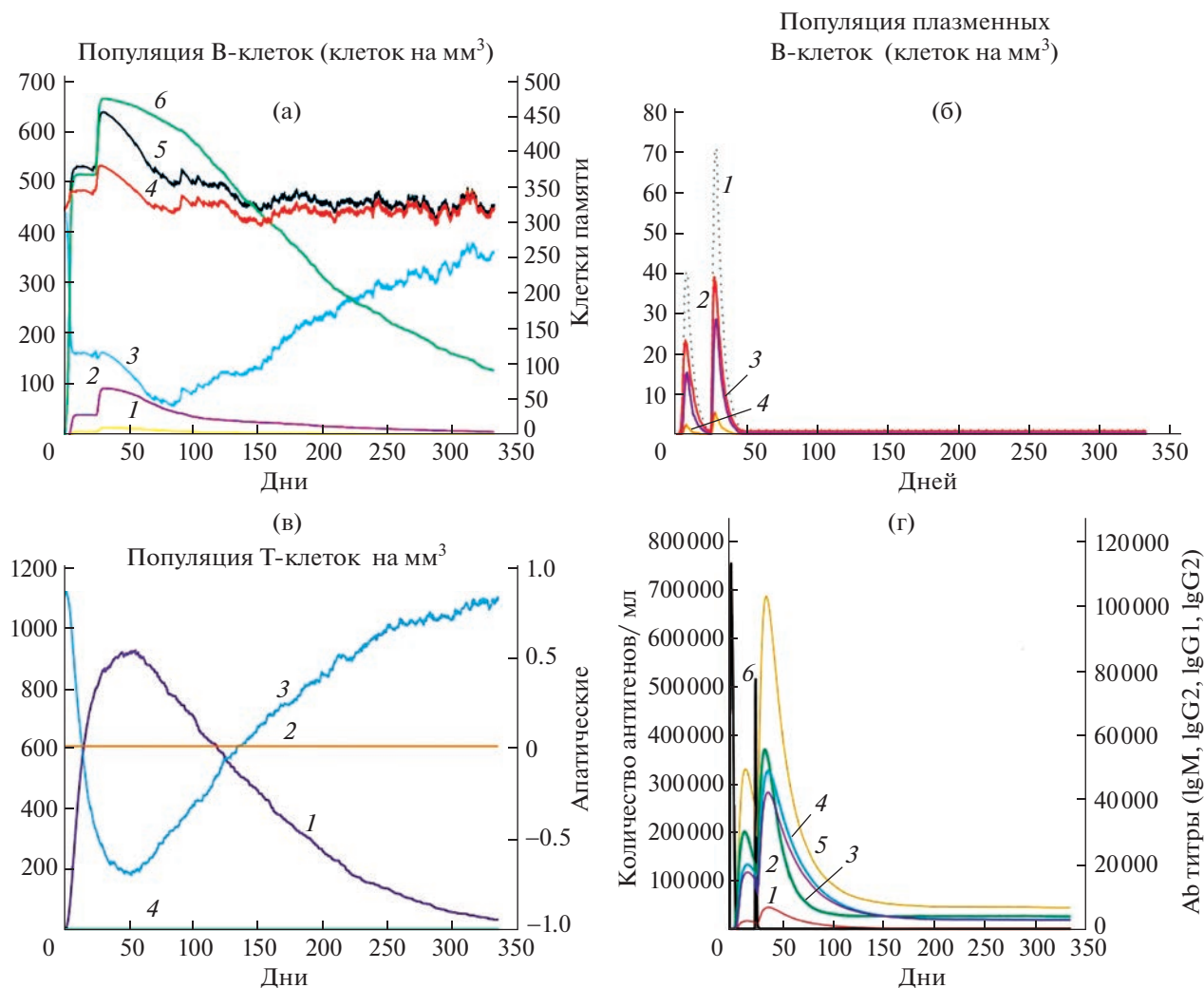


Рис. 2. Временные зависимости клеток, представляющих иммунный ответ организма свиньи на введение антигена: популяции В-клеток (а): 1 – В-изотип IgG2, 2 – В-изотип IgG1, 3 – В-изотип IgM, 4 – В-клетки памяти, 5 – неактивированные В-клетки, 6 – общее значение. Особое внимание следует обратить на популяцию компетентных В-клеток (2); плазматических В-клеток (б): 1 – IgM + IgG, 2 – IgM, 3 – IgG1, 4 – IgG2; популяции Т-клеток (в): 1 – активные, 2 – апатические, 3 – поющие, 4 – повторяющиеся; иммуноглобулинов (г): 1 – IgG2, 2 – IgM, 3 – IgG1, 4 – IgG1 + IgG2, 5 – IgM + IgG, 6 – Ag.

шены до 1 атм и 310 К путем запуска моделирования в NVT- и NPT-ансамбле (100 пс каждый) соответственно. Кроме того, давление и температуру системы контролировали с помощью модифицированного термостата Берендсена [14] и баростата Паринелло–Рахмана [15] с постоянной времени $\tau_{\text{t}} 1/4 0.1$ пс и $\tau_{\text{p}} 1/4 2$ пс соответственно. Продуктивное 200 нс МД-моделирование проводили в изотермическо-изобарическом ансамбле с временным шагом 2 фс. Алгоритм LINCS [16] использовали для ограничения связей с участием атомов водорода. Дальнейшие электростатические взаимодействия рассчитывали с использованием схемы суммирования Particle-Mesh Ewald [17].

Для иммуномоделирования клеточного ответа применяли приложение C-IMMSIMM [18]. Данный сервер – один из самых точных для исследования иммунного моделирования и прогнозирования адаптивного иммунитета. Сервер следует методам машинного обучения, аналогичным для прогнозирования иммунных взаимодействий, специфичных к эпитопам-мишеням [19]. Наряду с методами машинного обучения применяли технологию матрицы оценки позиции (PSSM) [20]. Количество шагов моделирования сервера C-IMMSIMM [18] составляло 1000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ траекторий был выполнен для 100 нс. Поскольку при моделировании использовались

периодические граничные условия, рецентрированием белковой молекулы осуществлялся ее возврат в ячейку моделирования. После этого проводили первичный анализ траекторий, включая расчет среднеквадратичных отклонений (СКО), радиуса инерции и среднеквадратических флуктуаций (СКФ). Соответствующие графики показаны на рис. 1. Изменения СКО показаны на рис. 1б, где видим, что СКО стабилизируется между 40 и 55 нм, что с учетом размера моделируемой системы говорит о ее высокой стабильности. Рисунок 1а показывает, что радиус гирации имеет тенденцию к уменьшению для прототипа вакцины, что свидетельствует о его уплотнении во время моделирования. СКФ атомов C- α -прототипа вакцины показаны на рис. 1в.

С использованием иммуномоделирования обнаружено, что стойкий первичный иммунный ответ вызывается вакциной против чумы свиней наряду со вторичным иммунным ответом. Две дозы вызвали естественный ответ против типичной вакцины. Иммуномоделирование показало, что введение вакцины приводит к повышению уровня активных В-клеток (рис. 2а), плазматических В-клеток (рис. 2б), Т-клеток (рис. 2в) наряду с постепенным повышением уровня различных иммуноглобулинов (рис. 2г). При этом вакцина стимулирует хелперные Т-клетки, указывая на лучшую адаптивность иммунитета [21]. Показано, что интерферон- γ , интерлейкин-23, интерлейкин-10 и интерферон- β , а также ряд разнообразных цитокинов, вызывающих иммунный ответ и защищающих организм от вирусов, вырабатываются при воздействии вакцины [22]. Полученные многообещающие показатели, в том числе повышение иммуноглобулинов, цитокинов, антиген-презентирующие, активных В-клеток, а Т-клетки указывают на эффективность разработанного прототипа вакцины против африканской чумы свиней. Тем не менее разработанный прототип требует экспериментальной проверки, чтобы доказать его эффективность, а также отсутствие токсического эффекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные результаты показывают возможность производить пептидные вакцины из фрагментов иммунокомпетентных белков. Выявлено, что выделенный фрагмент иммуногенного белка ВАЧС стабилен в водно-солевом растворе, а также способен вызывать клеточный ответ. На основе полученного фрагмента будет проведена разработка вакцины против африканской чумы свиней.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rodríguez J.M., Yáñez R.J., Almazán F. et al.* // J. Virol. 1993. V. 67 (9). P. 5312.
2. *Mettenleiter T.C., Sobrino F.* // Animal Viruses: Molecular Biology. 2008. V. 14. P. 5.
<https://doi.org/10.3201/eid1405.080077>
3. *Anderson E.C., Hutchings G.H., Mukarati N., Wilkinson P.J.* // Veterinary Microbiology. 1998. V. 62 (1). P. 1.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00187-4)
4. *Khomenko S., Beltrán-Alcrudo D., Rozstalnyy A. et al.* // Empress Watch. 2013. V. 28. P. 1
5. *Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G., Niemczuk K.* // Sci Rep. 2019. V. 9. P. 4556.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36823-0>
6. *Colson P., De Lamballerie X., Yutin N. et al.* // Arch Virol. 2013. V. 158. P. 2517.
<https://doi.org/10.1007/s00705-013-1768-6>
7. *Dixon L.K., Chapman D.A., Netherton C.L., Upton C.* // Virus Res. 2013. V. 173 (1). P. 3.
8. *Netherton C.L., Wileman T.E.* // Virus Res. 2013. V. 173 (1). P. 76.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.014>
9. *Gaudreault N.N., Madden D.W., Wilson W.C. et al.* // Front. Vet. Sci. 2020. V. 7. P. 215.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00215>
10. *Колесников И.А., Тимофеев В.И., Николенко М.В. и др.* // Кристаллография. 2023. Т. 68. № 6. С. 971.
<https://doi.org/10.31857/S0023476123600179>
11. <https://pymol.org/2/>
12. *Abraham M.J., Murtola T., Schulz R. et al.* // SoftwareX. 2015. V. 1. P. 19.
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
13. *Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K. et al.* // Proteins. 2010. V. 78. P. 1950.
<https://doi.org/10.1002/prot.22711>
14. *Berendsen H.J. C., Postma J.P. M., van Gunsteren W.F. et al.* // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. P. 3684.
<https://doi.org/10.1063/1.448118>
15. *Parrinello M., Rahman A.* // J. Chem. Phys. 1982. V. 76. P. 2662.
<https://doi.org/10.1063/1.443248>
16. *Hess B., Bekker H., Herman J.C. et al.* // J. Comput. Chem. 1997. V. 18. P. 1463.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12%3C1463::AID-JCC4%3E3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12%3C1463::AID-JCC4%3E3.0.CO;2-H)
17. *Darden T., York D., Pedersen L.* // J. Chem. Phys. 1993. V. 98 (12). P. 10089.
<https://doi.org/10.1063/1.464397>
18. <https://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM/index.php>
19. *Luckheeram R.V., Zhou R., Verma A.D., Xia B.* // Clin. Dev. Immunol. 2012.
<https://doi.org/10.1155/2012/925135>
20. *Rapin N., Lund O., Bernaschi M., Castiglione F.* // PubMed. 2010.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009862>
21. *Carvalho L., Sano Gi., Hafalla J. et al.* // Nat Med. 2002. V. 8. P. 166.
<https://doi.org/10.1038/nm0202-166>
22. *Abass O.A., Timofeev V.I., Sarkar B et al.* // J. Biomol. Struct. Dynamics. 2021. V. 40 (16). P. 7283.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1896387>

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 57.085.23+677.494+66.022.6

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМЕННОЙ ОБРАБОТКИ БИОМЕДИЦИНСКИХ МАТРИКСОВ НА АДГЕЗИЮ НЕЙРОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК

© 2023 г. А. М. Азиева¹, Е. В. Ястремский^{1,2}, Д. А. Кириллова¹, Т. Д. Пацаев¹, А. А. Михуткин¹,
Р. В. Шариков¹, Р. А. Камышинский^{1,2}, К. И. Луканина¹, Н. А. Шарикова¹,
Т. Е. Григорьев¹, А. Л. Васильев^{1,2,3,*}

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

³Московский физико-технический институт, Москва, Россия

*E-mail: a.vasiliev56@gmail.com

Поступила в редакцию 31.03.2023 г.

После доработки 31.03.2023 г.

Принята к публикации 21.04.2023 г.

Адгезивные свойства матриксов, преимущественно зависящие от химических и структурных особенностей их поверхности, играют важнейшую роль в тканевой инженерии. С помощью флуоресцентной и растровой электронной микроскопии в режиме окружающей среды исследована адгезия клеток диссоциированной нейрональной культуры на изотропных и анизотропных нетканых и губчатых матриксах из полилактида. Нейроны, полученные из головного мозга новорожденных мышей, демонстрировали улучшенную адгезию на матриксах всех типов после обработки плазмой, при этом наиболее выраженный эффект наблюдался на неориентированных матриксах.

DOI: 10.31857/S0023476123600210, EDN: JJWTPR

ВВЕДЕНИЕ

Первичные нейрональные культуры используются не только для фундаментальных исследований, но и для разработки методов лечения неврологических патологий и травм [1–3]. Рост и имплантация культуры нейронов требуют подходящих матриксов. Основными требованиями к таким матриксам являются биосовместимость, биodeградация, высокая клеточная адгезия, способствующая пролиферации, дифференцировке клеток и обеспечению нейрональной активности [4]. В большинстве случаев матриксы из синтетических полимеров демонстрируют определенные преимущества за счет легкости формообразования, высокой прочности и устойчивости к растяжению. Рекомендуется использовать для имплантатов многочисленные синтетические полимеры, в том числе полистирол, полилактид (ПЛА), полигликолевую кислоту и полилактид-гликолевую кислоту [5–7]. Эксперименты по регенерации тканей [8] продемонстрировали хорошую биосовместимость матриксов из ПЛА, несмотря на гидрофобную природу соединения. ПЛА разлагается в тканях организма до молочной кислоты путем гидролиза и метаболизируется до углекислого газа и воды.

Проблему плохой смачиваемости поверхности матрикса из ПЛА, препятствующую адгезии кле-

ток, можно решить несколькими способами. Поверхность может быть предварительно обработана поли-Д-лизиновыми или полиэтиленовыми пептидами, которые придают ей положительный заряд и способствуют адгезии клеток [9]. Другим способом является плазменная обработка, увеличивающая шероховатость и гидрофильность поверхности матрикса на основе ПЛА [10], оставляя практически неизменными другие характеристики материала. Изучение эффекта плазменной обработки поверхностей матриксов (в том числе, матриксов из ПЛА) и ее положительного влияния на адгезию и пролиферацию клеток рассмотрено в ряде обзоров и научных работ [11–15]. В частности, существенное влияние обработки плазмой поверхности матрикса на адгезию, пролиферацию и дифференцировку нейрональных стволовых клеток отмечено в [13–15]. Однако эксперименты со стволовыми клетками продемонстрировали и ряд отрицательных результатов, таких как низкий уровень жизнеспособности клеток и плохой контроль их дифференцировки. В настоящем исследовании использовались первичные нейрональные клетки, прошедшие дифференцировку, и эксперимент был направлен исключительно на изучение клеточной адгезии и пролиферации.

Таблица 1. Список и обозначения образцов матриксов из ПЛА

Тип матрикса	Без обработки плазмой	Обработанные плазмой
Неориентированная губка	ГН	ГН*
Ориентированная губка	ГО	ГО*
Неориентированный нетканый волокнистый материал	НН	НН*
Ориентированный нетканый волокнистый материал	НО	НО*

Таким образом, в настоящей работе представлены результаты исследования адгезии культуры клеток первичных нейронов мыши на различных матриксах из ПЛА, а именно, ориентированных и неориентированных нетканых и губчатых матриксах до и после обработки плазмой в разреженной атмосфере воздуха.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление и обработка матриксов. Для получения образцов матриксов различных типов использовали ПЛА марки 4032D (NatureWorks, США). В качестве растворителей использовали диоксан (ЧДА, “Компонент-Реактив”), хлороформ и этиловый спирт (ХЧ, “Компонент-Реактив”).

Для получения пористых материалов на основе ПЛА полимер растворяли в 1,4-диоксане при постоянном перемешивании в магнитной мешалке в течение 24 ч. Концентрация раствора составила 3 мас. %. Затем раствор замораживали при температуре, -22°C в холодильнике и перемешивали дважды в процессе заморозки для равномерного распределения кристаллов растворителя. После этого образцы лиофилизировали в течение 48 ч на установке Alpha 2-4LSC (Martin Christ, Германия). Диаметр образца составлял 25 ± 1 мм при высоте 3 ± 1 мм.

Нетканые материалы получали методом электроформования из 9 мас. % раствора ПЛА в смеси растворителей: хлороформа и этилового спирта (90 : 10). Электроформование проводили на установке, разработанной в НИЦ “Курчатовский институт”, при комнатной температуре и следующих технологических параметрах: прикладываемое напряжение 12 ± 1 кВ, расстояние между капилляром и осадительным электродом 25 ± 1 см, объемный расход полимерного раствора 5 мл/ч. Характерный геометрический размер нетканого волокнистого материала составлял 50×50 мм при толщине 550 ± 50 мкм.

Все образцы подвергали плазменной обработке в атмосфере воздуха (при давлении воздуха 1.1–0.2 мбар) с одной из сторон в установке PELCO easiGlow (Ted Pella, США) при силе тока 20 мА в течение 60 мин.

В табл. 1 представлены описание и аббревиатуры всех используемых образцов матриксов из ПЛА с различной архитектурой и обозначено наличие/отсутствие плазменной обработки.

Культивирование клеточной культуры. Чтобы получить по 10 образцов адгезированных нейронов на каждом типе матриксов, использовали диссоциированные культуры клеток головного мозга новорожденных мышей. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, данным в Приказе Минздрава России № 267 от 19.06.03 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”.

Диссоциирование клеток достигалось путем обработки фрагментов ткани мозга 0.25% трипсином (Invitrogen 25200-056, США). Осаждение полученных клеток из суспензии осуществлялось при помощи центрифуги при 1800 об./мин. в течение 5 мин. Клетки ресуспендировали в нейробазальной среде Neurobasal A без фенолового красного (Gibco™ 12349015, США) в комплексе с биоактивной добавкой B27 (Invitrogen 17504-044), глутамином (Invitrogen 25030-024, США) и смесью антибиотиков (Gibco™ 15070063, США). Плотность клеточной культуры составляла не менее 1200 клеток/мм². Культивирование клеток проводили на поверхности матриксов, помещенных в чашки Петри с двумя миллилитрами культуральной среды. Матриксы предварительно замачивали в 96%-ном этаноле в течение 1 мин и промывали водой, затем обрабатывали 0.05%-ным полиэтиленгликолем в течение 20 мин. Адгезия нейронов на матриксах без покрытия (без обработки ПЛА) была существенно ниже. Поддержание жизнеспособности культуры осуществлялось в условиях CO₂-инкубатора при температуре 37°C и газовой смеси (95% воздуха и 5% CO₂). Смену культуральной среды осуществляли через сутки после посадки на матриксах и далее 1 раз в 3 дня. Время культивирования *in vitro* составляло 5–7 сут. Интервал времени выбирали из расчета, что именно на этом этапе у нейронов начинают формироваться дендриты [16] и появляется электрическая активность [17].

Для максимального ингибирования экспрессии генов и других процессов жизнедеятельности клеточных культур их перемещали на лед, сразу отмывали от культуральной среды и фиксировали с помощью 4%-ного параформальдегида (Sigma P6148, Германия) в течение 7–10 мин. После фиксации клетки отмывали 3 раза в течение 5 мин в однократном растворе PBS (Invitrogen 70011036, США).

Флуоресцентная микроскопия. Для флуоресцентной микроскопии после фиксации ядра клеток окрашивали с помощью ДНК-специфического маркера Hoechst 33342 Solution (Thermo Scientific™ 62249, США) в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте, после чего клет-

ки отмывали раствором PBS в течение 3–5 мин. Затем матриксы с клетками переносили на предметные стекла, покрывали водной заливочной средой Fluoromount (Sigma F4680, Германия) и накрывали покровными стеклами.

Для исследований образцов методом флуоресцентной микроскопии использовали универсальный биологический микроскоп Carl Zeiss Axio Imager.Z1 (Zeiss, Германия). Микрофотографии всех исследуемых образцов получали в одних и тех же условиях интенсивности возбуждающего света и экспозиции при использовании объектива 60 (увеличение $\times 600$) с одновременным получением изображений по методу фазового контраста.

Подсчет ядер нейрональной культуры проводили при помощи программного обеспечения Fiji [18]. В табл. 2 представлены количества исследованных полей зрения для каждого из образцов.

Растровая электронная микроскопия в режиме естественной среды (ЕРЭМ). Исследования методами ЕРЭМ проводили на микроскопе Versa 3D DualBeam SEM (ThermoFisher Scientific, США). Образцы помещали на столик с пельтье-охлаждением при 10°C и 100%-ной влажности, давление в камере опускалось до низкого вакуума (1220 Па). Сначала все образцы исследовали при 100%-ной влажности, но при таких условиях поверхность частично или полностью была покрыта слоем воды из образца, поэтому в течение эксперимента давление в камере опускалось до 980 Па, что позволяло полностью изучить их морфологию, а также значительно улучшало отношение сигнала к шуму при получении изображений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Флуоресцентная микроскопия. На рис. 1 представлено сравнение флуоресцентных фотографий ядер нейронов на всех четырех типах матриксов без обработки (левая колонка) и после обработки плазмой (правая колонка).

Флуоресцентная микроскопия выявила, что адгезия нейрональной культуры на каждом из четырех типов матриксов была разной. На губчатом матриксе ГН нейроны располагались неравномерно, в основном на поверхности и в виде небольших монослойных скоплений (рис. 1а). Небольшое количество клеток на поверхности матрикса может быть связано с их проникновением в поры матрикса. На более плотных губчатых матриксах ГО (рис. 1в) адгезия была значительно более равномерной и без выраженных скоплений клеток.

На нетканом матриксе НН клетки распределялись равномерным монослоем по всей поверхности без кластеризации (рис. 1д). Расстояние между клетками варьировалось в диапазоне от 5 до 50 мкм. Однако на ориентированном нетканом матриксе НО адгезия нейронов была неравно-

Таблица 2. Среднее количество клеток по полям зрения

Образец	Количество клеток	Образец	Количество клеток	Прирост клеток, %
ГН	22.2	ГН*	73.30	230
ГО	92.5	ГО*	95.50	3
НО	71.2	НО*	89.1	25
НН	64.2	НН*	105.6	64

мерной, в виде скоплений близкорасположенных друг к другу клеток (рис. 1ж).

Обработка плазмой в течение 60 мин привела к улучшению адгезии клеток нейрональной культуры на всех типах матриксов. По результатам микроскопических исследований незначительное увеличение среднего количества клеток после плазменной обработки наблюдалось на ориентированных матриксах ГО* и НО* (рис. 1г, 1з соответственно), тогда как на неориентированных матриксах ГН* и НН* увеличение адгезии клеток было существенным (рис. 1б, 1е соответственно).

Для количественной оценки адгезии клеток нейрональной культуры подсчитывали среднее количество клеток в 10 полях зрения на каждом типе матриксов. Программное обеспечение ImageJ (NIST, США) [19] использовали для цифрового анализа изображений на первом этапе. Затем был проведен статистический анализ с помощью GraphPad Prism 9.4.1 (681) (La Jolla, Калифорния, США). Нормальность распределения оценивали с помощью теста Колмогорова–Смирнова. На последнем этапе анализа применяли непараметрический критерий ANOVA Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением и апостериорным критерием Данна со значением $P < 0.05$.

Результаты подсчета клеточных ядер на всех матриксах представлены на рис. 2. Статистически значимые различия наблюдались между группами ГН и ГН*. Между другими группами статистически значимых различий выявлено не было.

Для количественной оценки увеличения адгезии нейрональной культуры были подсчитаны среднее количество клеток по всем полям зрения для каждого матрикса (табл. 2) и процент увеличения количества клеток.

Согласно полученным результатам плазменная обработка наилучшим образом повлияла на адгезию на неориентированных матриксах: для матрикса ГН среднее количество клеток увеличилось на 230%, для матрикса НН – на 64%. Тогда как для ориентированных матриксов увеличение адгезии составило 3% для ГО и 25% для НО.

Растровая электронная микроскопия в режиме естественной среды. Параллельно с флуоресцентной микроскопией адгезированные на матриксах нейроны исследовали с помощью метода ЕРЭМ. Поскольку ЕРЭМ позволяет визуализировать

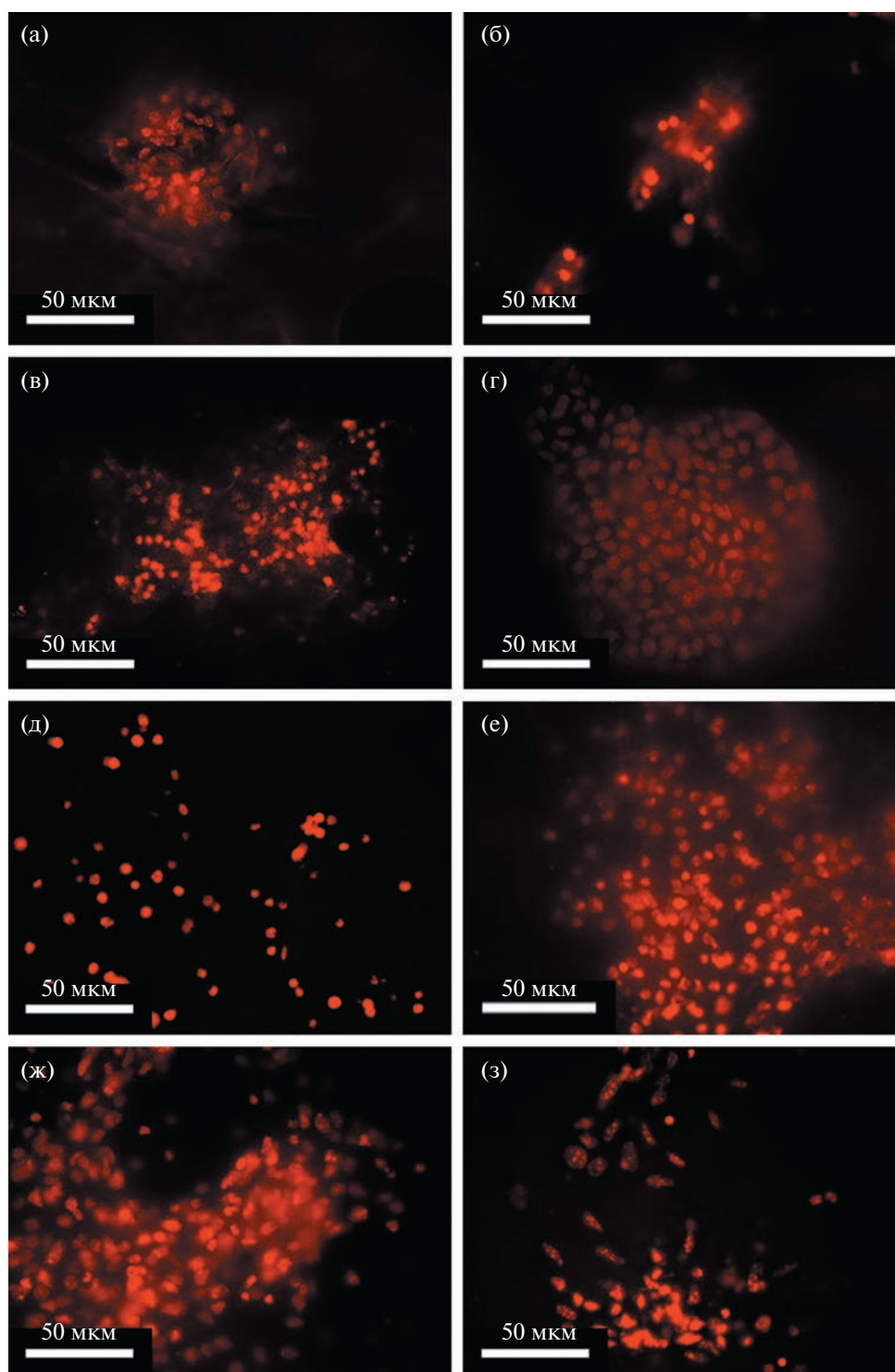


Рис. 1. Сравнение флуоресцентных фотографий ядер нейрональной культуры на матриксах, не обработанных (левая колонка) и обработанных плазмой в течение 60 мин (правая колонка): а – ГН, б – ГН*, в – ГО, г – ГО*, д – НН, е – НН*, ж – НО, з – НО* (табл. 1).

клетки только на поверхности матриц, этот метод использовали только для качественной оценки клеточной адгезии.

Обнаружили заметную разницу в распределении клеток на поверхности всех типов образцов до и после плазменной обработки (рис. 3). Оба

губчатых матрикса – неориентированный (ГН, рис. 3а) и ориентированный (ГО, рис. 3в) – демонстрируют морфологию, близкую к исходным образцам (без клеток).

После процедуры плазменной обработки наблюдались уменьшение пористости и резкое из-

менение морфологии поверхности в обоих образцах: неориентированном ГН* (рис. 3б) и ориентированном ГО* (рис. 3г). Такие изменения указывают на превосходную адгезию клеток и их пролиферацию в образцах после обработки плазмой. Аналогичное поведение клеток наблюдалось на неориентированном нетканом матриксе НН до и после обработки плазмой (рис. 3д, 3е соответственно). На матриксе НН клетки в основном находятся на пересечениях волокон. После обработки плазмой целые волокна покрываются внеклеточным матриксом (ВКМ), и распределение клеток становится более однородным. Адгезия клеток в ориентированном нетканом матриксе НО совершенно иная (рис. 3ж). Волокна в этом матриксе плотно упакованы, а размеры пор относительно малы для проникновения клеток в толщу образца. В результате на поверхности образца НО образуется относительно толстый клеточный слой. Не было обнаружено заметной разницы в количестве клеток на нетканом ориентированном матриксе НО* после плазменной обработки (рис. 3з). И в этом случае проявлялся относительно толстый слой клеток на поверхности матрикса с небольшими порами размером ~10 мкм и трещинами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Материалы на основе синтетических полимеров, как правило, плохо смачиваются водой, склеиваются и имеют низкую адгезию различных веществ на поверхности. Плазмохимическая модификация материалов подвергает изменениям лишь обрабатываемую поверхность и приповерхностный слой, толщина которого может составлять от десятков нанометров до единиц микрометров. Обработка плазмой приводит в основном к изменению поверхностных контактных свойств материалов — увеличению смачиваемости и адгезии, при этом не происходит существенных изменений физико-механических характеристик [20]. При обработке материалов плазмой в атмосфере воздуха происходит образование кислородосодержащих полярных групп на поверхности материала (верхний слой — 10 нм и менее) без нарушения объемных свойств [21, 22].

Кроме того, происходит изменение атомного состава, связанное с потерей низкомолекулярных соединений за счет окисления и обрыва полимерных цепей на верхних слоях материала [23]. Указанные выше процессы могут приводить к изменению рельефа поверхности — шероховатости материала, что в свою очередь сводится к увеличению удельной поверхности, а также свободной поверхностной энергии за счет увеличения вклада полярных групп [24, 25]. Применение плазмохимической обработки также позволяет значительно улучшить адгезию клеточных культур на поверхности матрикса [26].

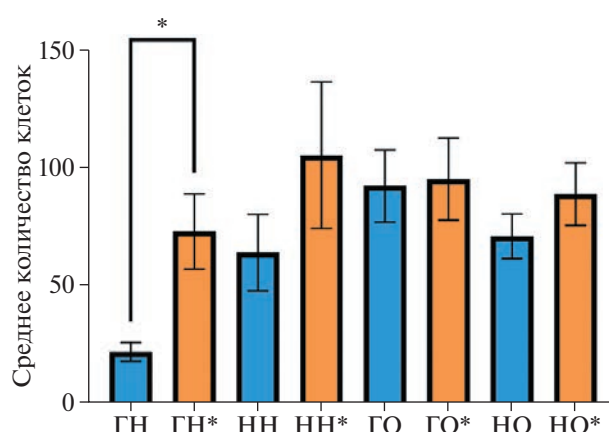


Рис. 2. Среднее количество клеток на матриксах до (темные столбцы) и после (светлые столбцы) обработки плазмой.

Исследования взаимодействия между остеобластоподобными клетками МС3Т3-Е1 и пленками ПЛА, обработанными воздушной плазмой, показали, что воздушная плазма может значительно усиливать как клеточную адгезию, так и клеточную пролиферацию [27–29].

Аналогичные результаты получены в настоящем исследовании: адгезия культуры первичных нейрональных клеток мыши на различных матриксах ПЛА после обработки плазмой в атмосфере воздуха увеличивается. Количественные результаты флуоресцентной микроскопии показали, что плазменная обработка является наиболее эффективной для адгезии клеток на неориентированных матриксах, а именно образцах ГН* и НН*. Среднее количество клеток увеличилось на 230% в случае неориентированного губчатого матрикса (ГН*) и на 64% в случае неориентированного нетканого матрикса (НН*). Это также подтверждается исследованиями ЕРЭМ.

Флуоресцентная микроскопия не показала заметных изменений числа клеток на обработанных плазмой ориентированных губчатых матриксах ГО* по сравнению с необработанными ориентированными матриксами ГО, увеличение составило всего 3%. Однако с помощью ЕРЭМ был получен другой результат: отчетливо видимый толстый монослой покрывал всю поверхность матрикса. Происхождение этого слоя может быть объяснено двумя способами:

- более узкие поры ориентированного губчатого матрикса препятствуют проникновению клеток вглубь и также препятствуют проникновению плазмы, в результате чего происходит интенсивный рост клеток только в областях, близких к поверхности;

- на поверхности губчатого матрикса присутствуют фрагменты ВКМ, а не клеточные ядра, которые наблюдались на флуоресцентных микрофотографиях.

Увеличение количества клеток на ориентированном нетканом матриксе после обработки

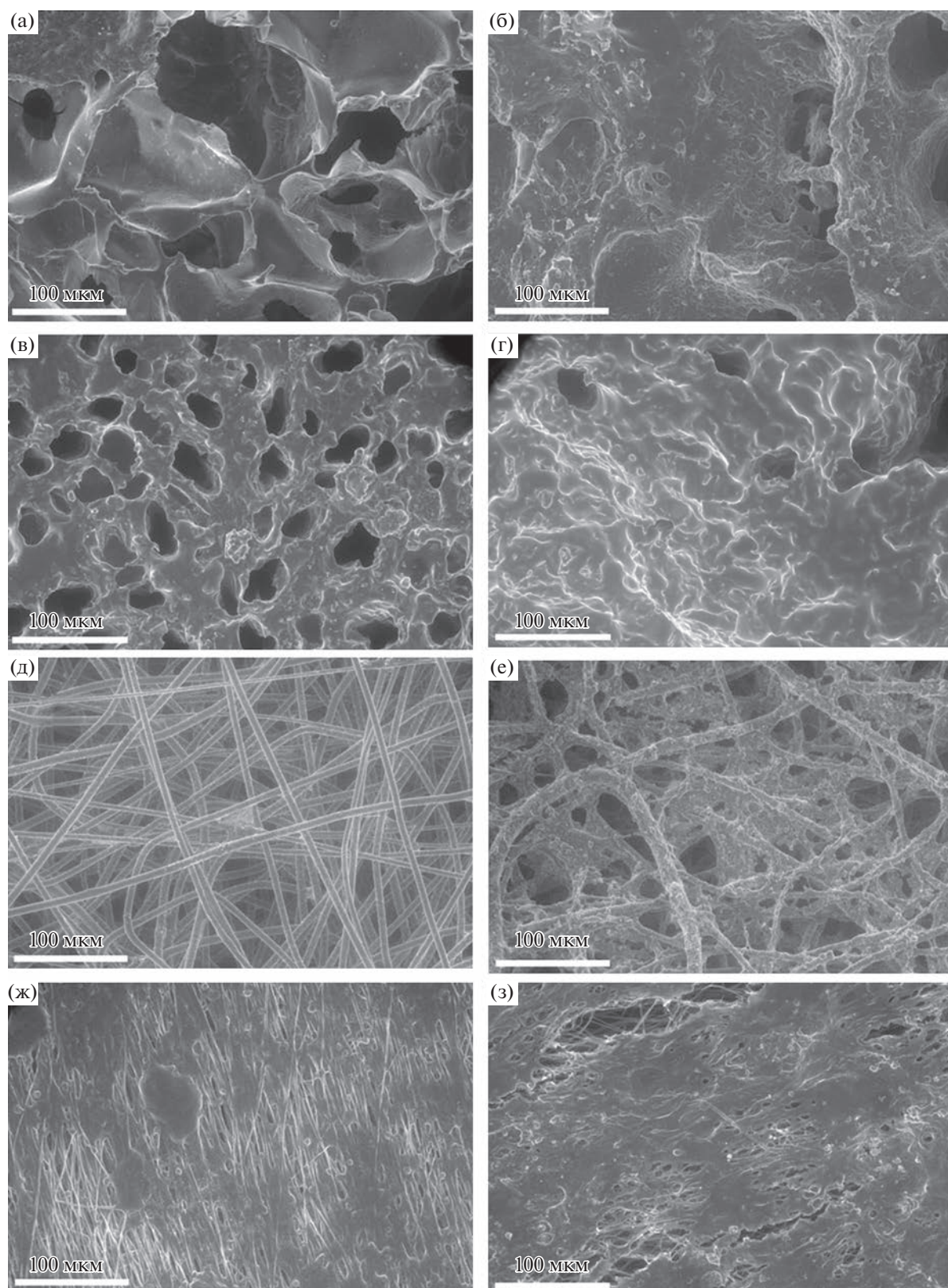


Рис. 3. Сравнение ЕРЭМ-изображений образцов матриц с нейрональной культурой, не обработанных (левая колонка) и обработанных плазмой в течение 60 мин (правая колонка): а – ГН, б – ГН*, в – ГО, г – ГО*, д – НН, е – НН*, ж – НО, з – НО* (табл. 1).

плазмой (НО*) составило 25% по сравнению с не-обработанным образцом (НО), что значительно больше, чем в случае образцов пары ГО—ГО*, что скорее всего связано с ограничением, накладываемым относительно малым размером пор.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью флуоресцентной микроскопии и ЕРЭМ была изучена адгезия клеток первичной нейрональной культуры на различных типах матриксов на основе ПЛА: ориентированных и неориентированных нетканых и губчатых матриксах до и после обработки плазмой в воздушной среде. Установлено, что во всех типах матриксов плазменная обработка увеличивает адгезию клеток к матриксу. Наиболее выраженный эффект (увеличение адгезии клеток более чем в 2 раза) обнаружен на неориентированных губчатых матриксах. Относительно большое увеличение адгезии также наблюдалось на неориентированных нетканых матриксах. На ориентированных губчатых и нетканых матриксах также наблюдалось увеличение адгезии клеток после обработки плазмой, но оно было менее выраженным. Исследование ЕРЭМ продемонстрировало равномерное покрытие поверхности ориентированных губчатых и нетканых матриксов, что, предположительно, связано с наличием ВКМ.

Таким образом, изменение топографии поверхности и гидрофильности полимерных матриксов позволяет повысить клеточную адгезию культур нейронов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-13-00321 “Деформационное поведение биоразлагаемых матриксов различного типа при механических нагрузках”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Suñol C., Babot Z., Fonfría E. et al. // *Toxicol. In. Vitro*. 2008. V. 22. P. 1350.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.03.009>
2. Ji C., Tang M., Johnson G.V. // *Methods Cell Biol.* 2017. V. 141. P. 229.
<https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2017.06.011>
3. Wellbourne-Wood J., Chatton J.Y. // *ACS Chem. Neurosci.* 2018. V. 9. P. 1975.
<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.8b00098>
4. Zhang Y., Venkateswaran S., Higuera G.A. et al. // *Adv. Healthc. Mater.* 2020. V. 9. № 4. P. 1901347.
<https://doi.org/10.1002/adhm.201901347>
5. Huang W., Sunami Y., Kimura H., Zhang S. // *Nanomaterials*. 2018. V. 8. P. 519.
6. Giordano G.G., Thomson R.C., Ishaug S.L. et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* 1997. V. 34. P. 87.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199701\)34:1<87::AID-JBM12>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199701)34:1<87::AID-JBM12>3.0.CO;2-M)
7. Huang H.D., Xu J.Z., Fan Y. et al. // *J. Phys. Chem. B*. 2013. V. 117. P. 10641.
<https://doi.org/10.1021/jp4055796>
8. Annunziata M., Nastri L., Cecoro G., Guida L. // *Molecules*. 2017. V. 22. P. 2214.
9. Okamura Y., Kabata K., Kinoshita M. et al. // *Adv. Mater.* 2009. V. 21. P. 4388.
<https://doi.org/10.1002/adma.200901035>
10. Ястремский Е.В., Пацаев Т.Д., Михуткин А.А. и др. // *Кристаллография*. 2022. V. 67. № 3. С. 421.
<https://doi.org/10.31857/S0023476122030249>
11. Morent R., De Geyter N., Desmet T. et al. // *Plasma Processes Polym.* 2011. V. 8. № P. 171.
<https://doi.org/10.1002/ppap.201000153>
12. Asadian M., Chan K.V., Norouzi M. et al. // *Nanomaterials*. 2020. V. 10. P. 119.
13. Travnickova M., Kasalkova N.S., Sedlar A. et al. // *Biomed. Mater.* 2021. V. 16. № 2. P. 25016.
<https://doi.org/10.1088/1748-605X/abaf97>
14. Yu X., Mengsteab P.Y., Narayanan G. et al. // *Engineering*. 2021. V. 7. № 2. P. 153.
<https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.02.010>
15. Santoro M., Shah S.R., Walker J.L., Mikos A.G. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016. V. 107. P. 206.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.019>
16. Kudryavtseva V., Stankevich K., Gudima A. et al. // *Mater. Des.* 2017. V. 127. P. 261.
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.04.079>
17. Kleiman R., Banker G., Steward O. // *J. Neurosci.* 1994. V. 14. № 3. P. 1130.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-03-01130.1994>
18. Sokolov I., Azieva A., Burtsev M. // *Biologically Inspired Cognitive Architectures (BICA) for Young Scientists*. Springer, 2016. P. 241.
19. Kopaeva M.Y., Azieva A.M., Cherepov A.B. et al. // *Pathogenesis*. 2021. V. 19. № 1. P. 74.
20. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E. et al. // *Nature Methods*. 2012. V. 9. № 7. P. 676.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
21. Kudryavtseva V., Stankevich K., Gudima A. et al. // *Mater. Des.* 2017. V. 127. P. 261.
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.04.079>
22. Poll H.U., Schladitz U., Schreiter S. // *Surf. Coat. Technol.* 2001. V. 142–144. P. 489.
[https://doi.org/10.1016/S0257-8972\(01\)01055-6](https://doi.org/10.1016/S0257-8972(01)01055-6)
23. Ivanov V.B., Behnisch J., Hollander A. et al. // *Surf. Interface Anal.* 1996. V. 24. P. 257.
24. Jordá-Vilaplana A., Fombuena V., García-García D. et al. // *Eur. Polym. J.* 2014. V. 58. P. 23.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.06.002>
25. Bolbasov E.N., Maryin P.V., Stankevich K.S. et al. // *Colloids Surf. B*. 2018. V. 162. P. 43.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.028>
26. Yang L., Chen J., Guo Y., Zhang Z. // *Appl. Surf. Sci.* 2009. V. 255. № 8. P. 4446.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.11.048>
27. Wang M., Favi P., Cheng X. et al. // *Acta Biomater.* 2016. V. 46. P. 256.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.030>
28. Nakagawa M., Teraoka F., Fujimoto S. et al. // *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2006. V. 77. P. 112.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.30521>
29. Teraoka F., Nakagawa M., Hara M. // *Dent. Mater. J.* 2006. V. 25. P. 560.
<https://doi.org/10.4012/dmj.25.560>

ПОВЕРХНОСТЬ,
ТОНКИЕ ПЛЕНКИ

УДК 538.87.91.97

СТРУКТУРНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ МОДЕЛЕЙ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АНТИБИОТИКА ДОКСОРУБИЦИНА

© 2023 г. Н. Н. Новикова^{1,*}, М. В. Ковальчук¹, А. В. Рогачев¹, Ю. Н. Малахова^{1,2},
Ю. О. Котова³, С. Э. Гельперина³, С. Н. Якунин¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²МИРЭА – Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

*E-mail: nn-novikova07@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.07.2023 г.

После доработки 26.07.2023 г.

Принята к публикации 26.07.2023 г.

С помощью методов двумерной дифракции и рентгеновской рефлектометрии проведены исследования, посвященные изучению молекулярных механизмов взаимодействия противоопухолевого антибиотика доксорубицина с липидными моделями клеточных мембран. В качестве модельных систем использованы монослои четырех видов фосфолипидов, относящихся к основным компонентам мембран животных клеток. Получена новая информация о процессах повреждения кристаллической решетки фосфолипидных монослоев под действием доксорубицина. Установлено, что действие доксорубицина на монослои анионных фосфолипидов определяется электростатическим взаимодействием: положительно заряженные молекулы доксорубицина встраиваются между отрицательно заряженными функциональными группами фосфолипида. В случае нейтральных фосфолипидов основная роль принадлежит гидрофобному взаимодействию: молекулы доксорубицина координируются с углеводородными хвостами фосфолипида в неупорядоченных областях.

DOI: 10.31857/S0023476123600842, EDN: AAUWIR

ВВЕДЕНИЕ

Развитие новых подходов к изучению молекулярной организации биологических мембран остается актуальной задачей, несмотря на многочисленные фундаментальные исследования в этой области. Это объясняется важнейшей ролью биомембран в структурной и функциональной организации клеток, а также возможностью активного воздействия на клетку через мембрану. Адекватной моделью клеточных мембран являются упорядоченные липидные монослои, сформированные на поверхности жидкой субфазы в ленгмюровской ванне [1]. Для изучения подобных объектов широко привлекаются поверхностно-чувствительные рентгеновские методы, что позволяет получать информацию о механизмах функционирования клеточных мембран на молекулярном уровне [2–6].

Наиболее часто в исследованиях органических пленок на поверхности жидкости применяется метод рентгеновской дифракции в скользящей геометрии, позволяющий изучать кристаллическую структуру двумерных молекулярных систем

в латеральном направлении [3]. Еще одна рентгеновская методика, которая успешно используется в исследованиях на жидкости, – метод рентгеновской рефлектометрии [4]. Такие измерения дают информацию о распределении профиля электронной плотности и позволяют локализовать отдельные химические компоненты биоорганической пленки по ее толщине.

В представленных исследованиях методы рентгеновской дифракции в скользящей геометрии и рентгеновской рефлектометрии были использованы для выявления молекулярных механизмов изменения структуры липидных моделей клеточных мембран под действием антибиотика доксорубицина.

Доксорубин – полусинтетический антибиотик антрациклинового ряда – занимает важное место в химиотерапии онкологических заболеваний [7]. Благодаря широкому спектру действия доксорубин является компонентом стандартных схем комбинированной химиотерапии многих опухолей (в том числе, опухолей молочной железы, легких, желудка и пр.) и лейкозов [8]. Ос-

новным механизмом цитотоксического действия доксорубина считают нарушение взаимодействия фермента топоизомеразы II с ДНК, что приводит к торможению репликации ДНК и ингибированию пролиферации клеток. Кроме того, доксорубин способствует образованию активных форм кислорода (свободных радикалов), обладающих высокой цитотоксичностью. В частности, действие свободных радикалов приводит к окислению липидов, входящих в состав цитоплазматических мембран. Полагают, что именно окислительное повреждение мембран является причиной кардиотоксичности доксорубина, которая имеет кумулятивный характер и ограничивает применение этого препарата в клинике [9, 10]. Еще одним важным механизмом цитотоксического действия доксорубина является его способность внедряться в липидные слои клеточных мембран, что приводит к нарушению их организации и изменению текучести и в конечном счете к апоптозу клеток. В то же время, поскольку основные мишени цитотоксического действия доксорубина локализованы внутри клетки, его взаимодействие с клеточными мембранами и проникновение внутрь клетки имеют определяющее значение для реализации противоопухолевого эффекта [11].

С начала 1980-х гг. большое внимание уделяется исследованиям, направленным на выяснение различий в доставке доксорубина к резистентным/чувствительным раковым клеткам [11–17]. Как показано в [12, 13, 17], восприимчивость клеток к доксорубину во многом определяется биофизическими свойствами мембраны (упаковка липидов, текучесть мембраны, электрический заряд), взаимодействием доксорубина с липидами. Взаимодействие доксорубина с липидными молекулами широко изучалось в модельных экспериментах с использованием липидных бислоев на твердых подложках, липосом и т.д. [15–19]. Многочисленные опубликованные исследования посвящены выявлению особенностей взаимодействия доксорубина с лентгюровскими монослоями, состоящими из синтетических фосфолипидов [20–22], а также липидов, выделенных из раковых клеток [12]. Наиболее часто в таких исследованиях применяются брестер-овская микроскопия, метод изотерм сжатия и флуоресцентная микроскопия, что позволяет детально охарактеризовать морфологию монослоя, его термодинамические свойства, фазовое поведение и т.д. Однако изменения в структуре монослоя, вызванные действием доксорубина, еще не рассматривались систематически.

Механизмы действия доксорубина на фосфолипидные монослои обусловлены тем, что молекулы доксорубина в водных растворах заряжены положительно (при нейтральных значениях pH). С другой стороны, часть молекулы доксорубина

в виде планарной структуры ароматических колец обладает выраженными гидрофобными свойствами. Таким образом, в зависимости от химического строения и структуры фосфолипида возможно как электростатическое, так гидрофобное взаимодействие. В связи с этим в представленных исследованиях экспериментальные измерения были проведены для четырех различных типов фосфолипидов. Изучали монослои дипальмитоилфосфатидилглицерина (ДПФГ), который выбрали в качестве одного из основных отрицательно заряженных фосфолипидов в клеточных мембранах. Чтобы выяснить роль состояния гидрофобной части монослоя, в частности ненасыщенности ацильной цепи молекул липида, провели измерения на монослоях фосфолипида с двумя ацильными цепями ненасыщенной жирной кислоты — диолеоилфосфатидилсерин (ДОФС). Кроме того, рентгеновские эксперименты были выполнены для двух нейтральных фосфолипидов: дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) — основной компонент клеточных мембран животных клеток, а также дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (ДПФЭ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Формирование монослоя фосфолипида на поверхности жидкости

Использовали следующие реактивы: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol) sodium salt (ДПФГ), 1,2-Di-(cis-9-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phospho-L-serine sodium salt (ДОФС), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (ДПФЭ), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (ДПФХ).

Растворы ДПФГ и ДПФЭ были приготовлены в концентрации 0.45 мг/мл с использованием смеси хлороформ:метанол (9:1). ДОФС и ДПФХ растворяли в хлороформе в концентрации 0.42 мг/мл. Для формирования монослоя раствор фосфолипида наносили на поверхность чистой воды в лентгюровской ванне. После испарения растворителя (через 15 мин) слой поджимали до поверхностного давления $\pi = 25$ мН/м.

Для каждого фосфолипида было выполнено по три серии измерений:

1) монослой формировали на поверхности раствора доксорубина. Концентрация доксорубина в субфазе составляла 1.255×10^{-4} М, выбранное значение соответствует концентрации доксорубина в плазме крови крыс при введении препарата NanoDox, в состав которого входит доксорубин;

2) монослой формировали на поверхности чистой воды. После поджатия слоя фосфолипида до давления $\pi = 25$ мН/м, под монослой с помощью шприца вводили 300 мкл раствора доксорубина

(концентрация 1.47×10^{-3} М). Монослой оставляли на 40 мин до начала рентгеновских измерений;

3) контрольные измерения для монослоя, сформированного на поверхности чистой воды.

Рентгеновские измерения

Измерения с помощью метода рентгеновской дифракции в скользящей геометрии и рентгеновской рефлектометрии проведены на станции ID10 (Европейский центр синхротронного излучения ESRF, Франция). Было использовано излучение с длиной волны $0.563 \text{ \AA}$. При измерении картин двумерной дифракции угол падения излучения на поверхность воды составлял $0.8 \times \theta_C$ (θ_C — критический угол полного внешнего отражения для воды). В каждой серии экспериментальные исследования проводили в течение 3 ч после поджата слоя. Перед каждым новым измерением лентгмюровскую ванну сдвигали в поперечном направлении на 200 мкм, что позволило снизить радиационные повреждения фосфолипидного слоя. Поверхностное давление поддерживалось постоянным во время измерений.

Анализ экспериментальных данных

Для анализа экспериментальных кривых рентгеновской рефлектометрии использовали приближение “свободной формы”, позволяющее проводить поиск профиля распределения электронной плотности без каких-либо ограничений на форму профиля. Такой подход имеет ряд существенных преимуществ при решении обратных задач рентгеновской рефлектометрии для систем со сложными границами раздела и заведомо неизвестной структурой. Возможности метода были продемонстрированы в исследованиях периодических многослойных структур [23], тонкопленочных систем [24], а также полимерных тонких пленок на поверхности жидкости [25].

В классическом подходе к анализу экспериментальных данных рентгеновской рефлектометрии планарную систему представляют в виде набора слоев, где каждый слой определяется тремя параметрами: толщиной, оптической константой и толщиной переходного слоя [26]. Влияние границ раздела на кривую отражения моделируется ослабляющими коэффициентами типа Невотто-Кроуэ для интенсивности френелевского отражения. Такой способ учета шероховатостей границ применим только для фиксированной формы профиля с нормальным распределением высот шероховатости и справедлив только для малых значений шероховатости. Специфика классического подхода заключается в том, что корректное решение удастся найти в том случае, если используется адекватная модель планарной системы. По сути в рамках классического подхода

проводится тестирование гипотезы о соответствии структуры образца выбранной модели с уточнением ее параметров в некоторых пределах. В случае значительных структурных перестроек в образце либо для неизвестной структуры образца принятая модель становится недостаточной для описания реальной структуры и требует усложнения путем введения дополнительных подслоев, при этом появляется новая степень свободы формы профиля.

В приближении “свободной формы” планарная система представляется в виде массива тонких ламелей заданного химического состава и плотности по аналогии с методом “Groove-Track” [27]. Все ламели имеют одинаковую толщину $d_{\min}$, величина которой определяется максимальным угловым диапазоном ($\theta_{\max}$) экспериментально полученной кривой зеркального отражения: $d_{\min} = \pi/q_{z(\max)}$, где $q_{z(\max)} = 4\pi \sin(\theta_{\max})/\lambda$ — максимальная длина вектора рассеяния, на котором наблюдается значимая картина зеркального отражения; λ — длина волны падающего излучения. Число ламелей определяется максимальной толщиной образца. Варьируемым параметром являются числовые кодификаторы ламелей, значение которых определяется возможными вариациями базовых материалов планарной системы. Таким образом, в расчете прямой задачи рентгеновской рефлектометрии используется массив ламелей равной толщины, для каждой из которых в комплексном показателе преломления сохраняется соотношение Крамерса—Кронига и наследуются свойства плотности и химического состава базовых материалов системы [23]. Для предотвращения появления выбросов и осциллирующего поведения профиля распределения электронной плотности вблизи истинного решения в процессе независимого варьирования большого числа несвязанных ламелей используется регуляризация Тихонова. Критерий согласия в этом случае дополняется средним значением квадрата производной второго порядка от профиля: $\text{GOF} = \chi^2 + \Lambda \sum (-p_{i-1} + 2p_i - p_{i+1})^2$, где p_i — числовой кодификатор ламели, Λ — параметр регуляризации.

Верификацию стабильности и корректности восстановления профиля распределения электронной плотности в лентгмюровских пленках проводили для монослоев четырех фосфолипидов — ДПФХ, ДПФЭ, ДПФГ, ДОФС, сформированных на поверхности чистой воды при давлении 25 мН/м. Экспериментальные кривые рентгеновского отражения для всех четырех монослоев имеют характерную форму с ярко выраженными осцилляциями (рис. 1а). Небольшие различия наблюдаются в периоде осцилляций (позициях интерференционных минимумов), что связано с различной длиной углеводородных хвостов и раз-

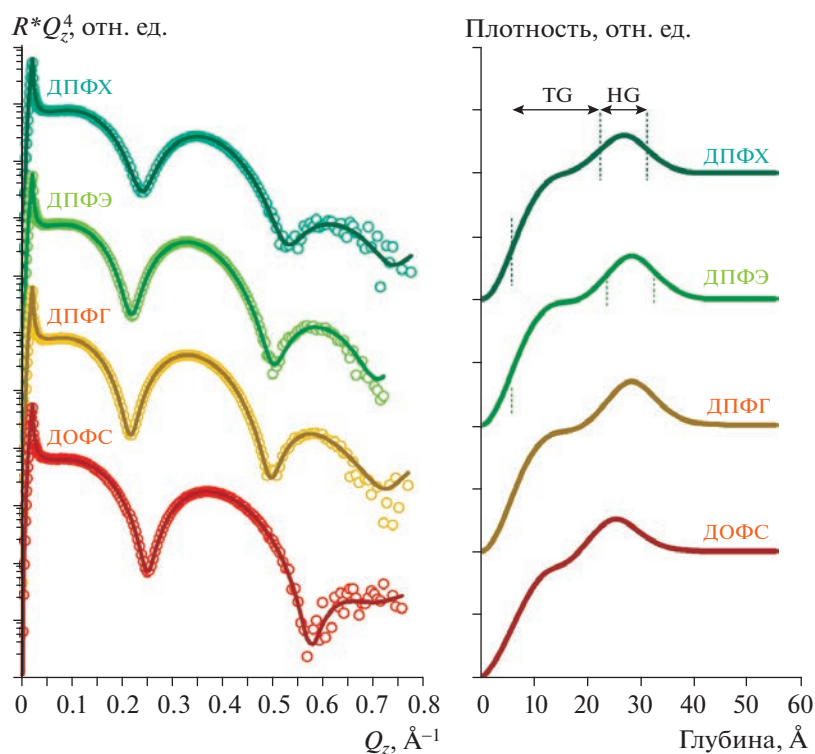


Рис. 1. Кривые рентгеновской рефлектометрии для монослоев фосфолипидов – ДПФХ, ДПФЭ, ДПФГ, ДОФС, сформированных на поверхности чистой воды. Сплошные линии – расчетные кривые отражения, соответствующие наилучшему совпадению (а). Распределение электронной плотности в монослоях фосфолипидов – ДПФХ, ДПФЭ, ДПФГ, ДОФС. Профили распределения электронной плотности нормированы на значение плотности воды. Для наглядности кривые смещены по вертикали (б).

личным химическим составом головной группы. Результаты анализа экспериментальных данных рентгеновской рефлектометрии представлены на рис. 1б в виде профилей распределения электронной плотности по глубине структуры, нормированных на значение в водной субфазе. На всех профилях четко различаются две области: область голов молекул фосфолипидов (HG) на глубине 20–35 Å с повышенной электронной плотностью, а также область хвостов фосфолипидов (TG) на глубине до 20 Å с плотностью, сравнимой или меньшей, чем плотность водной субфазы. Поскольку модель фосфолипидного монослоя получена в приближении свободной формы, она не параметризована в традиционном представлении

толщин слоев голов и хвостов молекул; физически значимой является сама форма профиля. Количественные оценки этих параметров, для их сравнения со структурой липидной молекулы и результатами других исследований, получаются из анализа первых производных профиля как расстояния между экстремумами (табл. 1).

Как видно из рис. 1а, использование приближения “свободной формы” для определений молекулярной организации липидных монослоев, сформированных на поверхности жидкости, позволяет добиться хорошего согласия между теоретической кривой и экспериментальными данными. Полученные профили распределения электронной плотности не содержат артефактов восстановления и являются физически значимыми с полным соответствием общепринятой модели ленгмюровского слоя. Количественные параметры моделей адекватно отражают различия в структурах четырех липидов и демонстрируют высокую чувствительность к деталям структуры. Таким образом, предложенный подход позволяет получать информацию о молекулярной организации ленгмюровского слоя, а также о структурных изменениях в монослое, возникающих при взаимодействии молекул монослоя с компонентами

Таблица 1. Параметры монослоев фосфолипидов, полученные из анализа экспериментальных данных рентгеновской рефлектометрии

	$D_{TG}, \text{\AA}$	$D_{HG}, \text{\AA}$	ρ_{TG}/ρ_{sub}	ρ_{HG}/ρ_{sub}
ДПФХ	16.6	8.8	0.96	1.26
ДПФЭ	17.9	8.7	0.97	1.34
ДПФГ	18.0	8.7	0.94	1.34
ДОФС	13.9	9.2	0.88	1.25

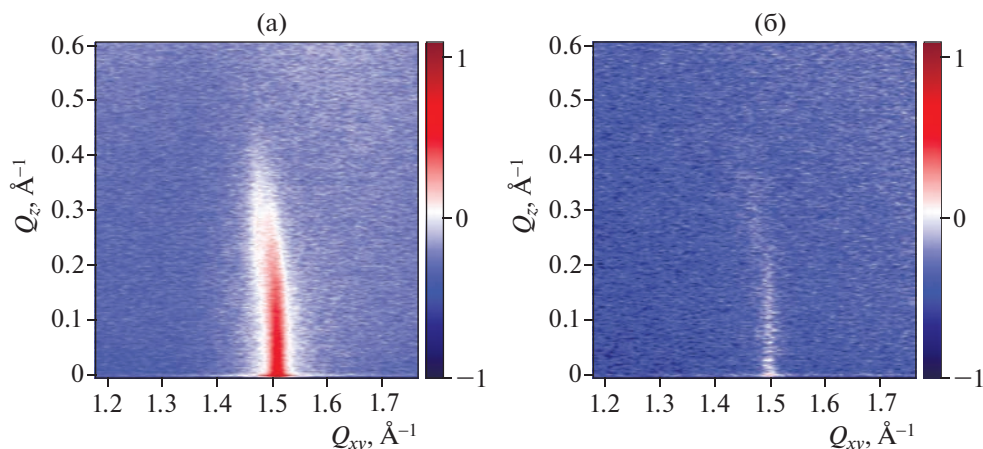


Рис. 2. Двумерные картины дифракционного рассеяния от монослоя ДПФГ до (а) и после (б) введения доксорубина.

жидкой субфазы, включая полное разрушение пленки.

Подчеркнем, что экспериментальные измерения, а также анализ данных рентгеновской рефлектометрии в биоорганических слоях, сформированных на поверхности жидкости, представляют собой достаточно нетривиальную задачу. Это связано с самой спецификой формирования таких систем, когда органические и биоорганические молекулы, сохраняющие свою подвижность, могут свободно распределяться в приповерхностных слоях жидкой субфазы. Кроме того, функционально значимые молекулы, присутствующие в жидкой субфазе, могут концентрироваться под слоем, оказывая заметное влияние на упаковку молекул в слое, и/или встраиваться в слой. Все эти факторы существенно затрудняют процесс математической обработки и интерпретации данных рентгеновской рефлектометрии при исследовании биоорганических систем на поверхности. В связи с этим методы анализа кривых отражения, не требующие какой бы то ни было априорной информации о распределении электронной плотности в планарной системе, представляют особый интерес для развития рентгеновской нанодиагностики молекулярных слоев на поверхности жидкой субфазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отрицательно заряженные фосфолипиды

Монослой ДПФГ. Наглядное представление о резких нарушениях молекулярной организации слоя ДПФГ под действием доксорубина дают результаты измерений с помощью метода рентгеновской дифракции в скользящей геометрии. В случае, когда монослой ДПФГ формировали на растворе доксорубина в первом измерении, за-

писанном через 40 мин после поджигания слоя, не удалось зарегистрировать ни одного дифракционного пика, что однозначно указывает на сильное повреждение кристаллической структуры монослоя. Во второй серии измерений, когда монослой ДПФГ формировали на чистой воде, а затем под монослой вводили раствор доксорубина, также наблюдалось разрушение двумерной упаковки монослоя (рис. 2). Через 40 мин после введения раствора доксорубина под монослой ДПФГ еще можно было наблюдать картину дифракционного рассеяния, которая оказалась идентична картине рассеяния, наблюдаемой для монослоя ДПФГ на чистой воде (рис. 2а). Однако с течением времени картина заметно размывается и спустя еще 30 мин дифракционный пик становится трудно различимым на фоне шума (рис. 2б).

Экспериментальные кривые рентгеновской рефлектометрии, записанные в этих измерениях, имеют четкую осцилляционную структуру и по форме схожи между собой (рис. 3а). Эти кривые заметно отличаются от кривой рентгеновской рефлектометрии для монослоя ДПФГ на чистой воде. Отметим, что в первой серии измерения на кривых наблюдались сразу после поджигания слоя. В измерениях, которые были проведены в течение последующих 3 ч, изменений формы кривой отмечено не было, что свидетельствует о стабильности слоя, сформировавшегося на растворе доксорубина. В случае, когда раствор доксорубина вводили под монослой ДПФГ, первая кривая была записана через 1 ч после введения доксорубина. В течение последующих 2 ч изменений форма кривой менялась незначительно.

Реконструированный профиль распределения электронной плотности в обеих сериях измерений имеет сходный характер: в монослой можно выделить область хвостов, плотность которой меньше, чем плотность водной субфазы, а толщи-

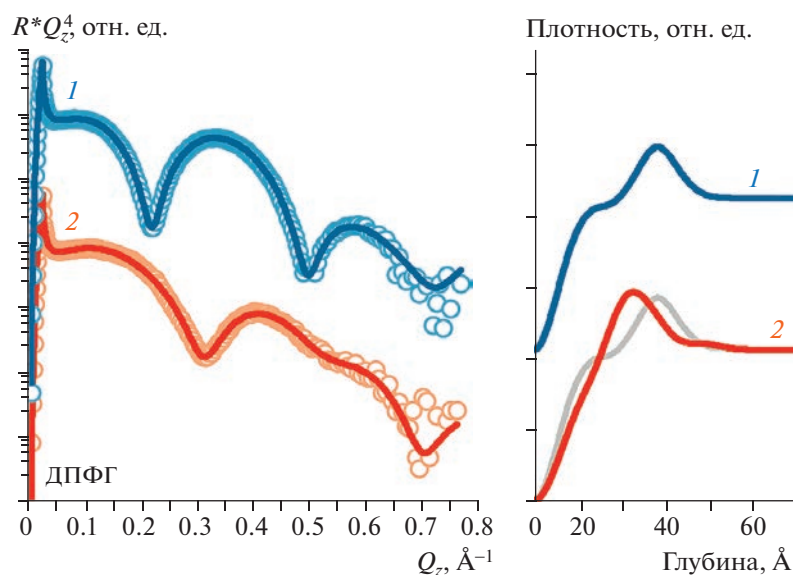


Рис. 3. Кривые рентгеновской рефлектометрии для монослоя ДПФГ: экспериментальные данные и соответствующие расчетные кривые до (1) и после (2) введения доксорубина (а). Распределение электронной плотности до (1) и после (2) введения доксорубина. Профили распределения электронной плотности нормированы на значение плотности воды. Для наглядности кривые смещены по вертикали. Серой линией показан профиль электронной плотности до введения доксорубина (б).

на D_{TG} составляет 8.2 и 10 $\text{\AA}$ в первой и второй серии измерений соответственно. Также на профиле хорошо видна область голов с повышенной электронной плотностью толщиной $D_{HG} = 10 \text{ \AA}$ в первой серии и $D_{HG} = 12 \text{ \AA}$ во второй серии. Плавные переходы между областью хвостов и голов молекул фосфолипида, а также на верхней и нижней границах связаны с наличием шероховатости поверхности жидкости и дисперсией наклона хвостов липидных молекул.

Обращает на себя внимание сильное размытие профиля распределения электронной плотности у верхней границы монослоя. Сопоставляя эти результаты с данными контрольных измерений для слоя ДПФГ на чистой воде (серая линия на рис. 3), можно сделать заключение, что в результате взаимодействия доксорубина с монослоем ДПФГ происходит заметное уменьшение толщины области хвостов монослоя, а также сильное размытие верхней границы и некоторое увеличение толщины области голов. Отметим, что в области голов фосфолипида сохраняется достаточно высокое значение электронной плотности.

Монослой ДОФС. Известно, что монослои ненасыщенных липидов не обладают дальним порядком, поскольку наличие в углеводородном хвосте двойных связей приводит к ослаблению межмолекулярных взаимодействий в области гидрофобных хвостов. Поэтому дифракционные измерения не дают какой-либо информации о латеральной организации в монослое ДОФС, имеющем две ацильные цепи ненасыщенной жирной

кислоты в *цис*-конфигурации. Важная информация об изменениях в монослое ДОФС была получена при измерениях с помощью рентгеновской рефлектометрии. На рис. 4а показаны кривые рентгеновского отражения для монослоя ДОФС до и после введения доксорубина, соответствующие профили электронной плотности представлены на рис. 4б. Как видно, доксорубин существенно изменяет молекулярную упаковку в монослое ДОФС. Примечательно, что эти изменения очень похожи как для насыщенного ДФПГ, так и для ненасыщенного ДПФХ: размытие границы раздела воздух/монослой, уменьшение толщины хвостовой области и увеличение электронной плотности в области головной группы. Повидимому, взаимодействие доксорубина с отрицательно заряженными монослоями происходит по сходному механизму.

На основании экспериментальных данных, полученных для монослоев фосфолипидов с отрицательно заряженными головными группами (ДПФГ и ДОФС), можно предположить, что взаимодействие доксорубина с анионными фосфолипидами происходит преимущественно за счет электростатических сил: положительно заряженные молекулы доксорубина встраиваются между отрицательно заряженными головками молекул фосфолипидов. Это оказывает выраженное влияние на молекулярную организацию монослоя, заметно разрыхляя плотную упаковку углеводородных хвостов. В результате в смешанном слое фосфолипид/доксорубин существенно

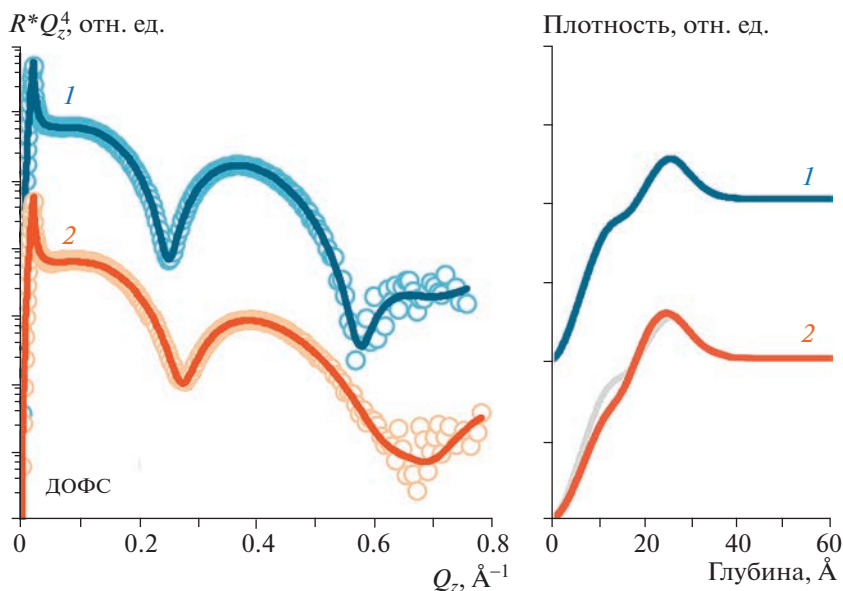


Рис. 4. Кривые рентгеновской рефлектометрии для монослоя ДОФС: экспериментальные данные и соответствующие расчетные кривые до (1) и после (2) введения доксорубина (а). Распределение электронной плотности до (1) и после (2) введения доксорубина. Профили распределения электронной плотности нормированы на значение плотности воды. Для наглядности кривые смещены по вертикали. Серой линией показан профиль электронной плотности до введения доксорубина (б).

увеличивается разброс углов наклона хвостов молекул фосфолипида, при этом в области голов сохраняется достаточно высокое значение электронной плотности. Важно подчеркнуть, что в случае отрицательно заряженного монослоя способность доксорубина встраиваться между полярными головками фосфолипидных молекул не зависит от ненасыщенности ацильной цепи. Согласно данным дифракционных измерений молекулы доксорубина встраиваются в конденсированный монослой насыщенного ДПФГ так же эффективно, как и в жидкий монослой ДОФС с двумя ацильными цепями ненасыщенной жирной кислоты.

Необходимо учитывать, что доксорубин является амфифильным соединением, содержащим как гидрофобную, так и гидрофильную части; поэтому координация с углеводородными хвостами молекул фосфолипидов может играть важную роль во взаимодействии доксорубина с липидным монослоем [11, 12]. Представленные данные рентгеновской рефлектометрии не дают прямой информации о локализации гидрофобной части молекулы доксорубина (ароматические циклы и метильные группы). Тем не менее полученные результаты, прежде всего наблюдаемое уменьшение толщины и плотности в области хвостов, свидетельствуют о том, что проникновения доксорубина в гидрофобную часть монослоев ДПФГ или ДОФС не происходит.

Нейтральные фосфолипиды

Исследованные нейтральные фосфолипиды относятся к цвистер-ионным соединениям с разделенными положительными и отрицательными зарядами в головной группе (в целом электронной-тральной). Отрицательный заряд локализован на фосфатной группе, а положительный — на аминогруппе.

Монослой ДПФЭ. Измерения для монослоя ДПФЭ проводили в течение 2 ч после введения доксорубина, в этот период наблюдались лишь слабые изменения на двумерных картах дифракционного рассеяния: интенсивность брэгговского пика незначительно снижалась со временем. Этот результат заметно отличается от данных для монослоя ДПФГ, когда брэгговский пик полностью исчезал в течение 1 ч. Двумерные карты дифракционного рассеяния для монослоя ДПФЭ, а также интегральная интенсивность дифракционного отражения в зависимости от компонент вектора рассеяния q_x и q_z представлены на рис. 5; соответствующие структурные параметры приведены в табл. 2. Согласно полученным данным после введения доксорубина параметры решетки в монослое ДПФЭ несколько увеличились по сравнению с монослоем ДПФЭ на чистой воде, также наблюдалось некоторое увеличение наклона ацильных цепей от вертикали. Эти изменения, хотя незначительные, указывают на “разрыхление” липидной упаковки в монослое ДПФЭ, что может быть связано с конформационными моди-

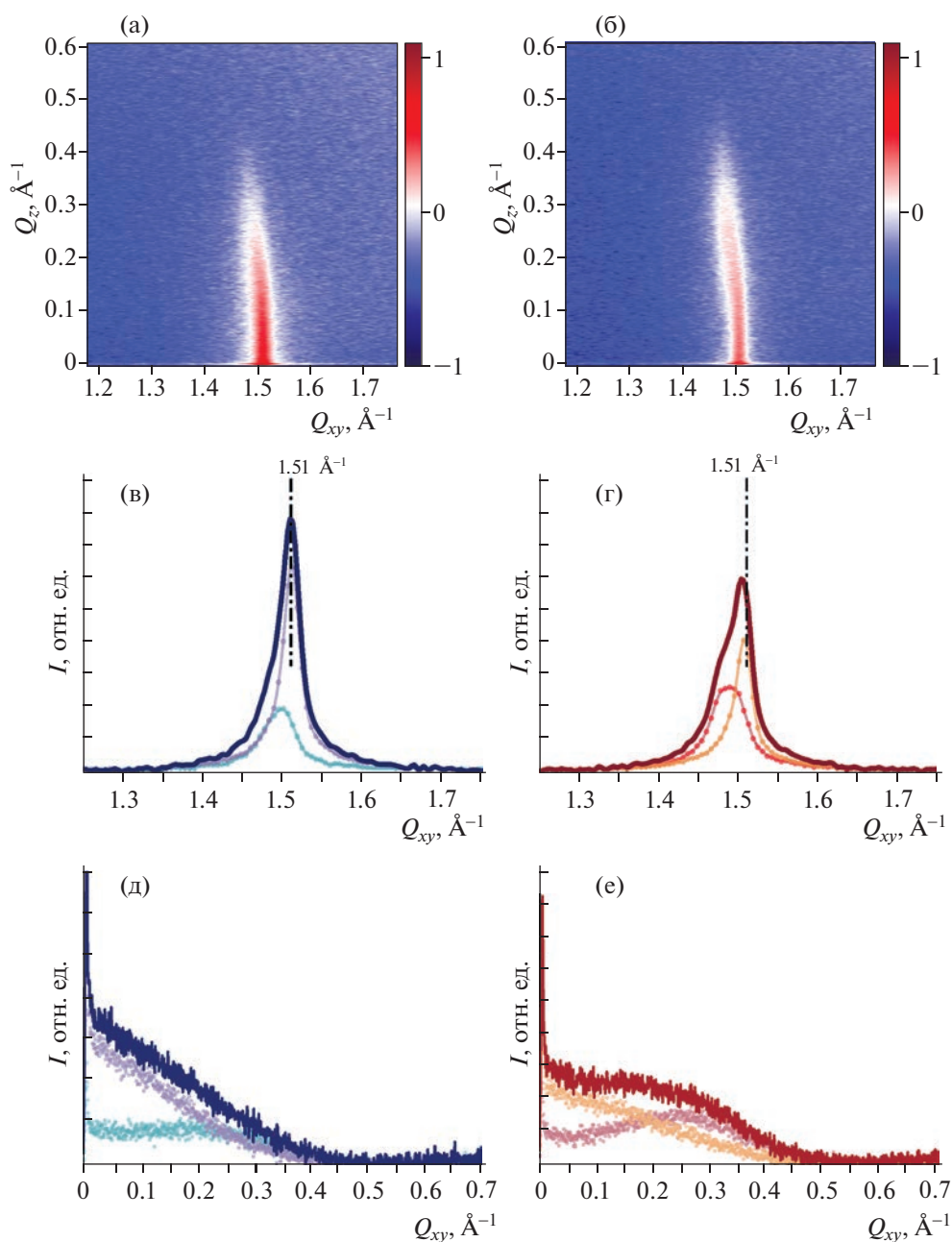


Рис. 5. Двумерные картины дифракционного рассеяния от монослоя ДПФЭ до (а) и после (б) введения доксорубина. Интегральная интенсивность дифракционного отражения в зависимости от компонент вектора рассеяния q_{xy} и q_z до (в и г) и после (д и е) введения доксорубина.

фикациями полярной группы молекул ДПФЭ в присутствии доксорубина.

Измерения с помощью метода рентгеновской рефлектометрии, проведенные на монослое ДПФЭ в течение 2 ч после введения доксорубина, не показали каких-либо изменений. Более того, форма кривых рентгеновской рефлектометрии оказалась практически идентичной кривой для монослоя ДПФЭ на чистой воде (рис. 6). Данные рентгеновских исследований, полученные для

ДПФЭ, однозначно указывают на то, что распределение электронной плотности в монослое ДПФЭ после введения доксорубина оставалось неизменным, а двумерная решетка монослоя имеет практически такую же структуру, как и в монослое ДПФЭ на чистой воде. Таким образом, можно сделать вывод, что доксорубин не вызывал существенных изменений молекулярной упаковки в монослое ДПФЭ: проникновение гидрофобной части молекулы доксорубина в область углево-

Таблица 2. Параметры решетки для монослоя ДПФЭ до и после введения доксорубина

	$a = b, \text{\AA}$	Угол наклона углеводородных хвостов, град	Площадь на углеводородную цепь, $\text{\AA}^2$	Направление наклона
До введения доксорубина	4.82	9.2	20.22	NN
После введения доксорубина	4.84	11.1	20.44	NN

дородных хвостов было затруднено благодаря плотной упаковке фосфолипидных молекул.

Монослой ДПФХ. Для фосфолипида дипальмитоил-фосфатидилхолина результаты рентгеновских измерений представлены на рис. 7 и 8. Как хорошо видно на рис. 8, после введения раствора доксорубина под монослой ДПФХ наблюдаются резкие изменения на кривых отражения со временем — заметно уменьшается амплитуда осцилляций. В случае, когда монослой ДПФХ формировали на растворе доксорубина (данные не представлены), уже на первой кривой были заметны существенные отличия от данных для монослоя ДПФХ на чистой воде. Весьма примечательно, что при резких изменениях, наблюдаемых на кривых рентгеновского отражения, картина дифракционного рассеяния на монослое ДПФХ в обоих случаях мало отличалась от данных, полученных для монослоя ДПФХ на чистой воде (рис. 7).

При обсуждении результатов, полученных для монослоя ДПФХ, следует учесть два фактора. Во-

первых, в положительно заряженной триметил-аммониевой группе гидрофильных головок молекул ДПФХ атом азота окружен тремя метильными группами, что обуславливает более сильное экранирование положительного заряда на азоте. Это в свою очередь снижает степень ион-дипольного отталкивания между молекулами доксорубина и головками ДПФХ по сравнению с молекулами ДПФЭ.

Во-вторых, полярные группы в молекулах ДПФХ имеют более сложный химический состав и конформацию благодаря наличию внутримолекулярных водородных связей [28]. В монослоях ДПФХ при поджатии наблюдается одновременное существование двух фаз: кристаллические домены неправильной формы в окружении неупорядоченной фазы. При увеличении поверхностного давления выше фазового перехода (обычно при $\pi \sim 10\text{--}15$ мН/м) кристаллические домены сливаются вместе, однако при давлении 25 мН/м в монослое все еще присутствуют неупорядоченные области с менее плотной упаковкой молекул.

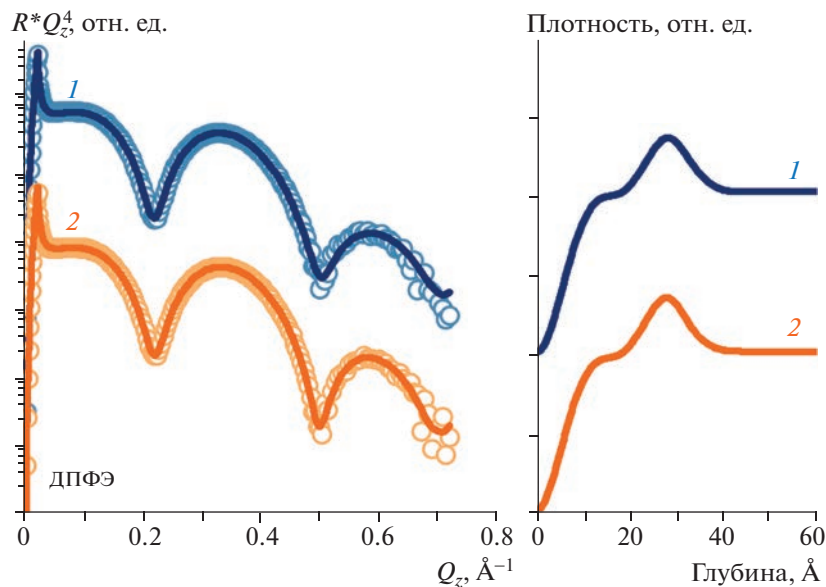


Рис. 6. Кривые рентгеновской рефлектометрии для монослоя ДПФЭ: экспериментальные данные и соответствующие расчетные кривые до (1) и после (2) введения доксорубина (а). Распределение электронной плотности до (1) и после (2) введения доксорубина. Профили распределения электронной плотности нормированы на значение плотности воды. Для наглядности кривые смещены по вертикали. Серой линией показан профиль электронной плотности до введения доксорубина (б).

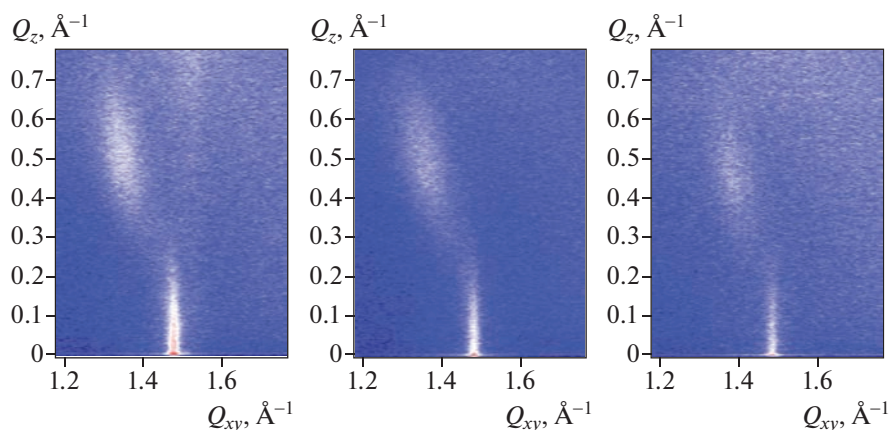


Рис. 7. Двумерные картины дифракционного рассеяния от монослоя ДПФХ до введения доксорубина, через 40 мин и через 3 ч после введения.

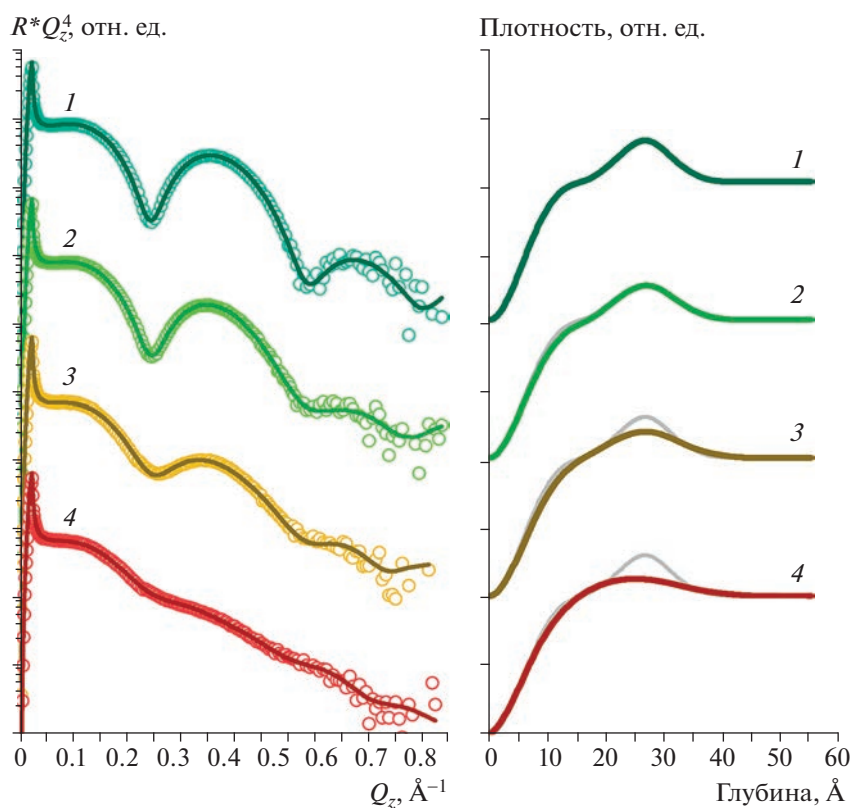


Рис. 8. Кривые рентгеновской рефлектометрии для монослоя ДПФХ: экспериментальные данные и соответствующие расчетные кривые до введения доксорубина (1), а также спустя различные интервалы после введения доксорубина: 30 мин (2), 1 (3), 8 ч (4) (а). Распределение электронной плотности до (1) и после (2, 3, 4) введения доксорубина. Профили распределения электронной плотности нормированы на значение плотности воды. Для наглядности кривые смещены по вертикали. Серой линией показан профиль электронной плотности до введения доксорубина (б).

Можно предположить, что на кристаллические домены с плотной упаковкой фосфолипидных молекул доксорубин не оказывает заметного действия, тогда как в неупорядоченных областях доксорубин может встраиваться между молекулами

фосфолипида. Действительно, в экспериментальных измерениях сохранение молекулярной организации в кристаллических доменах подтверждается отсутствием изменений на двумерных картах дифракционного рассеяния. В не-

упорядоченных областях благодаря наличию “потенциально свободного” объема в углеводородной части монослоя у молекул доксорубина появляется возможность проникать в гидрофобную часть монослоя за счет взаимодействия ароматических колец доксорубина с углеводородными хвостами фосфолипида.

В рамках таких предположений о взаимодействии доксорубина с монослоем ДПФХ, экспериментальную кривую рентгеновского отражения можно рассматривать как сумму кривых от упорядоченной и неупорядоченной областей. При этом важно учесть, что в этих областях заметно различаются углы наклона углеводородных хвостов молекул ДПФХ, следовательно, заметно различаются периоды толщинных осцилляций. Понятно, что на кривых с различным значением периода толщинных осцилляций угловое положение минимумов и максимумов будет смещено друг относительно друга; и при сложении таких кривых на результирующей кривой рентгеновского отражения осцилляции могут заметно “размываться” вплоть до полного исчезновения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы двумерной дифракции и рентгеновской рефлектометрии были использованы для изучения процессов структурной реорганизации липидных моделей клеточных мембран под действием противоопухолевого антибиотика доксорубина. Проведенные исследования выявили существенное влияние доксорубина на монослой отрицательно заряженных фосфолипидов — ДФПГ и ДОФС. Изменения носили одинаковый характер как для насыщенного фосфолипида ДФПГ, так и для ненасыщенного ДОФС. Из этого можно сделать вывод, что механизмы действия антибиотика доксорубина на монослой анионных фосфолипидов определяются в основном электростатическим взаимодействием: положительно заряженные протонированные аминокислотные группы доксорубина встраиваются между отрицательно заряженными полярными головками фосфолипидов. Такой характер взаимодействия может заметно затруднить транспорт доксорубина через клеточную мембрану. В случае нейтральных фосфолипидов превалирует гидрофобное взаимодействие: молекулы доксорубина координируются с углеводородными хвостами фосфолипида в неупорядоченных областях, что позволяет доксорубину проникать в гидрофобную область монослоя.

Обнаруженные закономерности представляют интерес для биомедицинских исследований, посвященных изучению механизмов цитотоксического действия доксорубина, а также причин формирования множественной лекарствен-

ной резистентности к противоопухолевым препаратам.

Авторы выражают благодарность Европейскому центру синхротронного излучения за предоставленную возможность провести исследования на станции ID10, а также руководителю станции ID10 О.В. Коновалову за помощь в проведении экспериментальных измерений и ценные обсуждения полученных результатов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания, проект FSSM-2022-0003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brezesinski G., Möhwald H.* // Adv. Colloid Int. Sci. 2003. V. 100. P. 563.
[https://doi.org/10.1016/s0001-8686\(02\)00071-4](https://doi.org/10.1016/s0001-8686(02)00071-4)
2. *Stefaniu C., Brezesinski G.* // Curr. Opin. Colloid Int. Sci. 2014. V. 19. P. 216.
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.01.004>
3. *Kaganer V.M., Mohwald H., Dutta P.* // Rev. Modern Phys. 1999. V. 71. № 3. P. 779.
<https://doi.org/10.1103/RevModPhys.71.779>
4. *Daillant J., Gibaud A.* X-ray and Neutron Reflectivity: Principles and Applications. Berlin: Springer, 2009. 348 p.
5. *Новикова Н.Н., Ковальчук М.В., Юрьева Э.А. и др.* // Кристаллография. 2012. Т. 57. № 5. С. 727.
6. *Novikova N., Kovalchuk M., Kononov O. et al.* // BioNanoSci. 2021. V. 10. P. 618.
<https://doi.org/10.1007/s12668-020-00742-0>
7. *Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G. et al.* // Biotechnol. Bioeng. 2000. V. 67. P. 704.
<https://doi.org/10.1002/bit.260110607>
8. *Thorn C.F., Oshiro C., Marsh S. et al.* // Pharmacogenet. Genomics. 2011. V. 21. P. 440.
<https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>
9. *Sritharan S., Sivalingam N.A.* // Life Sci. 2021. V. 278. P. 119527.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119527>
10. *Asensio-L'opez M.C., Soler F., Pascual-Figal D. et al.* // PLOS One. 2017. V. 12. P. e0172803.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172803>
11. *Alves A.C., Magarkar A., Horta M. et al.* // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 6343.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-06445-z>
12. *Peetla C., Bhavre R., Vijayaraghavalu S. et al.* // Mol. Pharmaceutics. 2010. V. 7. P. 2334.
<https://doi.org/10.1021/mp100308n>
13. *Dadhich R., Kapoor S.* // Mol. Cell. Biochem. 2022. V. 477. P. 2507.
<https://doi.org/10.1007/s11010-022-04459-4>
14. *Ramu A., Glaubiger D., Magrath I.T. et al.* // Cancer Res. 1983. V. 43. P. 5533.
15. *Speelmans G., Staffhorst R.W., de Kruijff B. et al.* // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 13761.
<https://doi.org/10.1021/bi00250a029>

16. *Chen L., Alrbyawi H., Poudel I. et al.* // AAPS Pharm-SciTech. 2019. V. 20. P. 99.
<https://doi.org/10.1208/s12249-019-1316-0>
17. *Alves A., Nunes C., Lima J. et al.* // Colloids Surf. B. 2017. V. 160. P. 610.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.09.058>
18. *Yacoub T.J., Reddy A.S., Szleifer I.* // Biophys. J. 2011. V. 101. P. 378.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.06.015>
19. *Hou Y., Li J., Liu X. et al.* // Chem. Phys. 2021. V. 541. P. 111036.
20. *Matyszevska D., Moczulska S.* // Electrochim. Acta. 2018. V. 280. P. 229.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.05.119>
21. *Gaber M.H., Ghannam M.M., Ali S.A. et al.* // Biophys. Chem. 1998. V. 70. P. 223.
[https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(97\)00125-7](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(97)00125-7)
22. *Marsh D.* // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 1286. P. 183.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00009-3)
23. *Zameshin A., Makhotkin I.A., Yakunin S.N. et al.* // J. Appl. Cryst. 2016. V. 49. P. 1300.
<https://doi.org/10.1107/S160057671601044X>
24. *Kondratev O.A., Makhotkin I.A., Yakunin S.N.* // Appl. Surf. Sci. 2022. V. 574. P. 151573.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.151573>
25. *Malakhova Y.N., Korovin A.N., Lapkin D.A. et al.* // Soft Matter. 2017. V. 13. P. 7300.
<https://doi.org/10.1039/c7sm01773a>
26. *Windt D.L.* // Comput. Phys. IEEE Comput. Sci. Eng. 1998. V. 12. P. 360.
<https://doi.org/10.1063/1.168689>
27. *Xiao-Lin Zh., Sow-Hsin Ch.* // Phys. Rev. E. 1993. V. 47. P. 3174.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.47.3174>
28. *Селеменев В.Ф., Рудакова Л.В., Рудаков О.Б. и др.* Фосфолипиды на фоне природных матриц. Воронеж: Научная книга, 2020. 318 с.

УДК 544.72.023.26

МИНЕРАЛИЗАЦИЯ КАРБОНАТОМ КАЛЬЦИЯ ОБОЛОЧЕК ЭМУЛЬСИОННЫХ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ

© 2023 г. А. В. Бусленко^{1,*}, Т. В. Букреева^{1,2}, А. П. Чистяков¹, М. А. Ванцян¹, Д. Б. Трушина²,
Е. Д. Никольская³, М. Р. Моллаева³, Н. Г. Яббаров³, М. Б. Сокол³

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

³Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

*E-mail: anyabuslenko@gmail.com

Поступила в редакцию 11.07.2023 г.

После доработки 15.09.2023 г.

Принята к публикации 15.09.2023 г.

Исследована минерализация карбонатом кальция многослойных оболочек эмульсионных капсул, сформированных методом послойной сборки полиэлектролитов. Найдены оптимальные условия создания микрокапсул с ядром из масла ши и органико-неорганической оболочкой из синтетических полиэлектролитов и карбоната кальция. Исследованы морфология оболочки, стабильность капсул в водной суспензии при нагревании, а также проведена оценка их цитотоксичности в отношении клеток фибробластов человека. Показано, что минерализация эмульсионных полиэлектролитных капсул карбонатом кальция в форме ватерита приводит к укреплению стенок капсул и повышению их биосовместимости.

DOI: 10.31857/S0023476123600490, EDN: HYYVHX

ВВЕДЕНИЕ

Одними из наиболее перспективных носителей лекарственных веществ при различных способах их введения в организм считаются полимерные нано- и микрокапсулы [1–3]. Это обусловлено их высокой стабильностью, широким выбором материалов оболочки, в том числе биосовместимых и биоразлагаемых, а также возможностью высокой степени загрузки функциональным веществом. Особый интерес вызывают эмульсионные полимерные капсулы (т.е. капсулы с ядром из капель дисперсной фазы эмульсии) с характеристиками, контролируемыми условиями синтеза. Такие системы перспективны прежде всего для доставки малорастворимых в воде соединений. Между тем до 40% новых фармакологически активных веществ обладают плохой растворимостью в воде, из-за чего снижается их биодоступность [4, 5].

Эмульсионные капсулы получают методами *in situ*-полимеризации поверхностно-активных веществ на границе раздела фаз, комплексной коацервации, выпаривания растворителя и другими [6]. При этом довольно простым и удобным способом создания и модификации поверхности оболочек эмульсионных капсул стала послойная сборка полиэлектролитов (так называемый метод “layer-by-layer”, LbL) [7–9]. Технология LbL поз-

воляет регулировать толщину и проницаемость многослойных оболочек, а также включать в их состав различные функциональные компоненты — наночастицы, красители, белки и т.д., благодаря чему этот подход обладает огромным потенциалом для разработки новых средств доставки терапевтических и диагностических агентов [10–12].

Несмотря на целый ряд работ по созданию эмульсионных капсул с использованием послойной сборки полиэлектролитов [8], проблемой остается механическая нестабильность оболочек таких капсул. Ранее было показано [13–15], что одним из способов повышения механической прочности полых полиэлектролитных оболочек является включение в их состав неорганического материала с помощью *in situ*-синтеза. Было продемонстрировано, что синтез наночастиц диоксида кремния [13] или диоксида титана [14], а также магнетита, гидроксиапатита или фторида иттрия [15] на полиэлектролитных слоях, а точнее — в матрице полиэлектролитных слоев из-за их проницаемости — способствует укреплению стенок капсулы и сохранению формы оболочки при высыхании не только на воздухе, но и в вакууме. В [16] внутри многослойной полиэлектролитной плоской пленки синтезирован карбонат кальция и показано увеличение модуля Юнга по сравне-

нию с неминерализованной пленкой почти в 3 раза, а твердость повысилась примерно в 50 раз.

CaCO_3 обладает биосовместимостью и биоразлагаемостью (растворим в слабокислых средах человеческого организма), что наряду с доступностью и дешевизной делает его привлекательным материалом для создания средств доставки лекарств [17, 18]. Он также может служить источником кальция в живых системах. При этом среди наиболее распространенных кристаллических модификаций карбоната кальция ватерит характеризуется пористой морфологией и развитой внутренней структурой, что служит преимуществом для загрузки биологически активных веществ [18].

Синтез пористых микрочастиц ватерита для их использования в качестве носителей лекарств обычно проводят методом массовой кристаллизации в смеси водных растворов хлорида кальция и карбоната натрия [18]. Для минерализации плоских полиэлектролитных пленок использовали их инфильтрацию попеременно в растворах CaCl_2 и Na_2CO_3 , в результате чего в пленке образовался преимущественно аморфный CaCO_3 [16]. Цель настоящей работы — укрепление стенок многослойных полиэлектролитных эмульсионных капсул путем минерализации их оболочек карбонатом кальция. Для этого предлагаем использовать разработанный в [16] способ синтеза CaCO_3 в плоских полиэлектролитных пленках, адаптируя его к полиэлектролитным оболочкам эмульсионных капсул. Кроме того, одна из задач настоящего исследования — показать возможность повышения биосовместимости оболочек эмульсионных капсул путем их модификации карбонатом кальция.

В качестве материала ядер капсул выбрали масло ши, которое в последнее время привлекает все большее внимание благодаря обнаруженным антиоксидантной активности и противовоспалительным свойствам [19]. Температура плавления масла ши, близкая температуре тела человека, с одной стороны, делает его перспективным компонентом медицинских и косметических средств, но с другой — усложняет технологию приготовления и манипуляции с эмульсионными системами на его основе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Для изготовления капсул использовали гуммиарабик (GA), гидрохлорид полиаллиламина (PAH, 120–200 кДа), полистиролсульфонат натрия (PSS, 70 кДа) (все — Sigma-Aldrich, Германия), масло ши (O&3, Великобритания), хлорид кальция $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Carl Roth, Германия), карбонат натрия Na_2CO_3 , безводный (Th. Gey-

er, Германия). Воду очищали с помощью системы Millipore Direct-Q3 UV.

Способ приготовления капсул. Эмульсионные капсулы получали по методике, описанной в [20] и адаптированной к эмульгированию масла ши, поддерживая его в жидком состоянии (рис. 1). Эмульгирование 0.6 мл расплавленного масла ши в 6 мл водного раствора гуммиарабика (1 мас. %) проводили при 60°C в течение 3 мин с применением ультразвукового гомогенизатора Hielscher UP400S (максимальная мощность 400 Вт, рабочая частота 24 кГц, амплитуда 30%). После формирования эмульсии из системы удаляли избыток GA путем центрифугирования при 5500 g (1 мин), супернатант отбирали микропипеткой. Затем на поверхность стабилизированных гуммиарабиком капле масляной фазы последовательно наносили PAH и PSS методом послойной адсорбции, поддерживая в системе температуру ~60°C (рис. 1). Для этого в пробирки с отделенными центрифугированием капсулами заливали предварительно нагретый водный раствор PAH (2 мг/мл) в 0.15 M NaCl, систему выдерживали 7 мин при непрерывном встряхивании шейкером (700 об./мин). Затем избыток PAH удаляли, а систему дважды промывали предварительно нагретой деионизованной водой, используя центрифугирование при 5500 g (1 мин) и отбор супернатанта микропипеткой. Далее к капсулам добавляли предварительно нагретый водный раствор PSS (2 мг/мл) в 0.15 M NaCl, при этом перемешивание, центрифугирование и промывание проводили аналогично стадии нанесения PAH. Таким способом формировали один бислой полиэлектролитов, данную методику использовали при нанесении последующих бислоев.

Для минерализации полиэлектролитной оболочки к отделенным центрифугированием капсулам сначала добавляли водный раствор хлорида кальция (рис. 1) с концентрацией 1, 0.5, 0.1 или 0.05 M, время выдержки системы на шейкере варьировалось от 5 до 15 мин (интенсивность встряхивания 700 об./мин). Далее систему промывали деионизованной водой, используя центрифугирование при 5500 g (1 мин). Затем проводили такую же процедуру для раствора карбоната натрия (рис. 1), концентрация соли 1 : 1 соответствовала концентрации добавленного на предыдущей стадии раствора хлорида кальция и использовалось то же время выдержки системы на шейкере.

Методы исследования. ζ -потенциал капсул измеряли методом электрофоретического рассеяния света с помощью анализатора частиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Оценку устойчивости оболочек к разрушению проводили, наблюдая за высвобождением свободного масла при выдержке водной суспензии капсул в пробирке типа Эппендорф

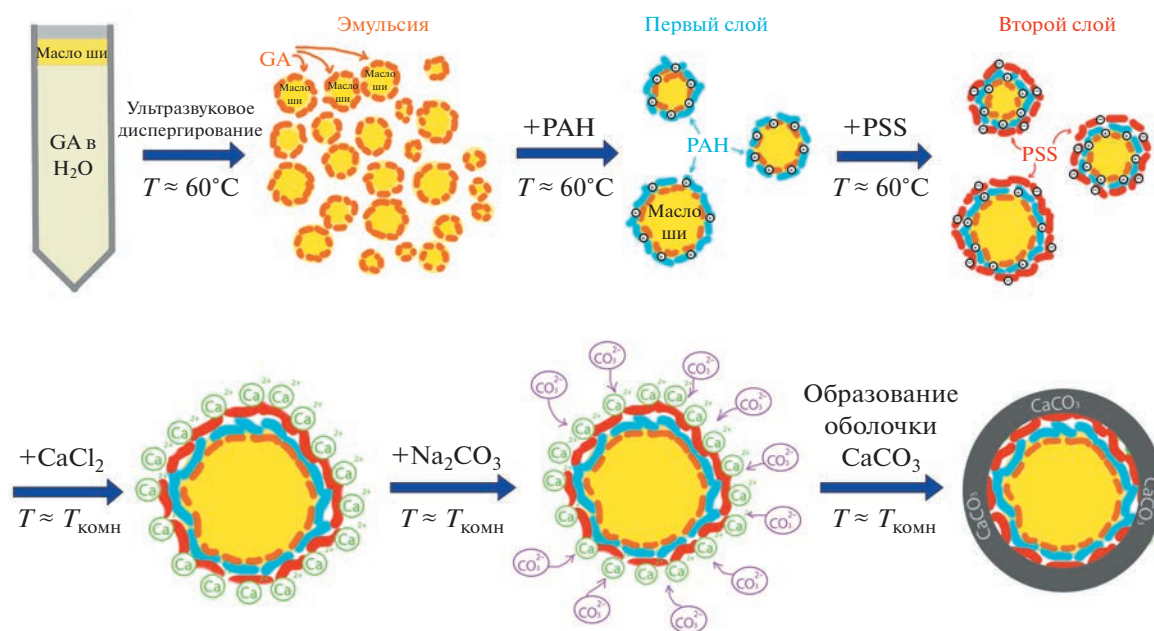


Рис. 1. Схема формирования эмульсионных капсул с одним полиэлектролитным бислоем и *in situ*-синтеза CaCO_3 .

при 50°C в течение 16 дней в сушильном шкафу (Binder FED 53, Германия).

Исследование морфологии и микроструктуры оболочек проводили методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием установок Thermo-Fisher Scientific Phenom XL (Thermo Scientific, США) и JSM-7401F (JEOL, Япония).

Рентгенограмму порошка высушенных в сушильном шкафу капсул с минерализованной оболочкой получали с помощью дифрактометра Rigaku Miniflex 600, Япония ($\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), размер шага 0.7 град/мин при 40 кВ и 15 мА . Фазовый состав определяли методом полнопрофильного анализа Ритвелда с использованием программного обеспечения HighScore Plus.

Оценка цитотоксичности капсул. Клетки иммортализованных фибробластов человека линии BJ-5ta культивировали в пластиковых культуральных матрасах в среде DMEM (Gibco, США), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США) и $40 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ гентамицина (ПанЭко, Россия), в CO_2 -инкубаторе при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO_2 . По достижении 80% конфлюентного монослоя клетки рассевали с помощью раствора 0.25% трипсина – 0.02% этилендиаминтетрауксусной кислоты (Gibco, США). Жизнеспособность клеток после инкубации с РАН, неминерализованными эмульсионными капсулами и капсулами, модифицированными CaCO_3 , оценивали с помощью МТТ-теста [21]. Капсулы с маслом ши и оболочкой $\text{GA}/(\text{РАН}/\text{PSS})_4$ (1% об./об.), такие же капсу-

лы, модифицированные CaCO_3 (1% об./об.), и раствор РАН добавляли к клеткам в трех повторях в диапазоне концентраций РАН 0.00078 – 0.1 мг/мл . Через 2 ч после инкубации проводили полную замену культуральной среды на свежую, поскольку известно, что обычно максимальное накопление веществ в клетках происходит в течение этого периода [22, 23]. Клетки инкубировали в стандартных условиях и фиксировали их состояние каждые 24 ч с помощью инвертированного микроскопа Nikon Diaphot, оснащенного камерой Levenhuk M1400Plus. Через 72 ч в каждую лунку вносили по 50 мкл раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида (MTT) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мг/мл в среде для культивирования клеток и инкубировали в течение 4 ч. После развития окраски среду удаляли, выпавшие кристаллы формазана растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида (Amreso, США) и измеряли оптическую плотность раствора при 540 нм с помощью планшетного фотометра (Bio-Rad, США). Жизнеспособность клеток определяли в процентах от необработанного контроля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В [20] было показано, что при эмульгировании растительного масла с витамином Е в водном растворе GA на поверхности капель дисперсной фазы эмульсии под действием ультразвуковой кавитации образуется устойчивая оболочка из поперечно сшитого полимера. В данной работе для использования масла ши в виде жидкости такое

Таблица 1. ζ -потенциал капсул с маслом ши до и после минерализации оболочки, а также в результате длительной выдержки суспензии при нагревании

Состав оболочки капсул	GA/ПАН/PSS	GA/(ПАН/PSS) ₂	GA/(ПАН/PSS) ₂ CaCO ₃ , минерализация 5 мин	GA/(ПАН/PSS) ₂ CaCO ₃ , минерализация 15 мин
ζ -потенциал свежеприготовленных капсул, мВ	-36.4 ± 1.2	-36.2 ± 2.3	-53.3 ± 2.2	-61.9 ± 2.3
ζ -потенциал после выдержки системы при 50°C 16 дней, мВ	-23.2 ± 1.1	-15.8 ± 1.5	-58.0 ± 8.6	-59.0 ± 3.4

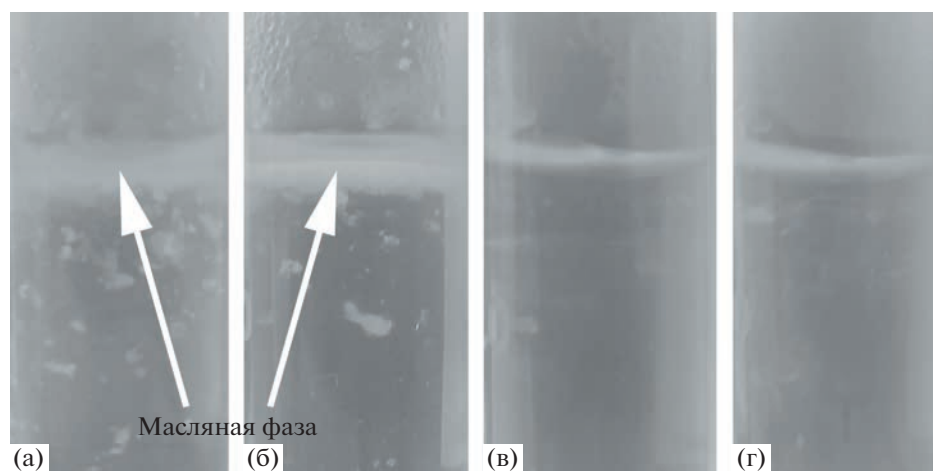
же эмульгирование проводили при 60°C. При охлаждении системы наблюдалась коагуляция капсул, поэтому последующие слои ПАН и PSS также наносили при нагревании системы. В результате после формирования одного бислоя капсулы демонстрировали достаточно равномерное распределение в водной фазе при встряхивании.

Минерализацию полиэлектролитных оболочек проводили, выдерживая капсулы в растворе CaCl₂ для адсорбции ионов Ca²⁺ на нескомпенсированных отрицательно заряженных группах полианиона. Затем оболочки отмывали от несвязавшихся ионов, и капсулы помещали в раствор Na₂CO₃ для осуществления взаимодействия ионов кальция с карбонат-ионами (рис. 1). В результате происходило образование карбоната кальция, и при всех использованных концентрациях солей и временах выдержки системы минерализованные капсулы равномерно распределялись в водной среде, не формируя видимых глазом крупных агрегатов. Агрегативная устойчивость капсул подтверждается их высоким по модулю значением ζ -потенциала: если до минерализации ζ -потенциал капсул составлял около –36 мВ, то после 5 мин выдержки оболочек в растворах со-

лей – ниже –50 мВ, а после 15 мин – ниже –60 мВ (табл. 1). Высокий отрицательный заряд капсул можно объяснить возможным частичным вытеснением на поверхность оболочки полианиона, образующего верхний полимерный слой, и высвобождением его анионных групп в результате формирования твердого карбоната кальция.

Для оценки влияния минерализации оболочки на стабильность эмульсионных полиэлектролитных капсул водные суспензии капсул выдерживали при нагревании в течение 16 дней. В результате в случае оболочек с одним или двумя бислоями ПАН/PSS происходило существенное снижение по модулю значения ζ -потенциала капсул (табл. 1), их коагуляции и разрушения оболочек – в системе наблюдалось выделение масляной фазы (рис. 2а, 2б). Такое поведение системы можно объяснить увеличением подвижности полимерных цепей при нагревании, что приводит к структурным перестройкам оболочки, снижающим агрегативную стабильность капсул.

Для капсул, модифицированных CaCO₃ с использованием солевых растворов низких концентраций (0.05 и 0.1 М), после выдержки при нагревании также наблюдалось частично высвобож-

**Рис. 2.** Суспензии капсул с маслом ши после выдержки при 50°C в течение 16 дней, образцы с составом оболочки: а – GA/ПАН/PSS, б – GA/(ПАН/PSS)₂, в – GA/(ПАН/PSS)₂CaCO₃ – 5 мин, г – GA/(ПАН/PSS)₂CaCO₃ – 15 мин, где 5 и 15 мин – время инкубации эмульсионных капсул в растворах солей CaCl₂ и Na₂CO₃ в процессе минерализации оболочки.

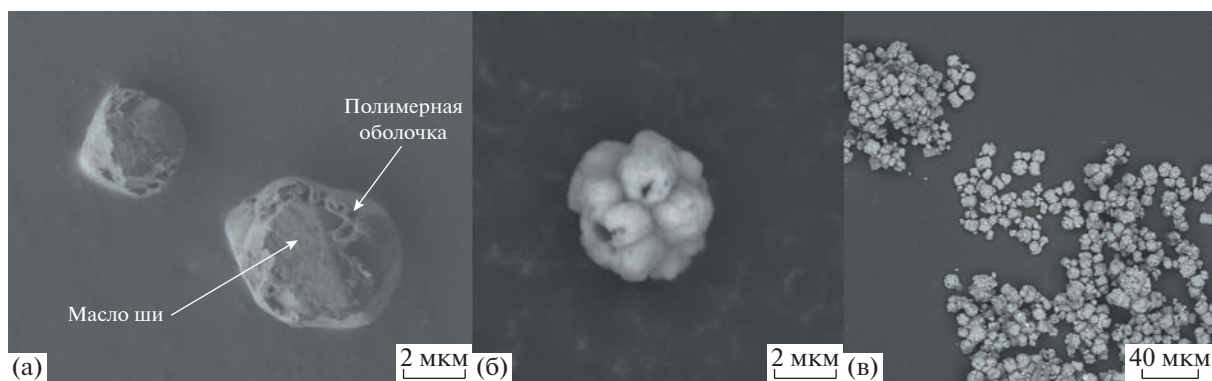


Рис. 3. СЭМ-изображения капсул с маслом ши и оболочкой состава: а – $\text{GA}/(\text{PAH}/\text{PSS})_2$, б – $\text{GA}/(\text{PAH}/\text{PSS})_2\text{CaCO}_3$ (время минерализации 15 мин), в – общий вид минерализованных капсул.

денное масло ши (и при 5, и при 15 мин минерализации). Увеличение концентрации солей до 0.5 М предотвращает высвобождение масла ши независимо от времени инкубации капсул в растворах CaCl_2 и Na_2CO_3 (5 или 15 мин) (рис. 2в, 2г). На рис. 2в, 2г видны скопление капсул на границе раздела воздух/вода и отсутствие выделившегося масла в отличие от поверхности суспензии неминерализованных капсул (рис. 2а, 2б). ζ -потенциал капсул остается практически без изменения в результате длительной выдержки системы при нагревании и составляет примерно $-50\ldots-60$ мВ (табл. 1). Такие высокие по модулю значения свидетельствуют о высокой агрегативной устойчивости системы, которая, по-видимому, обусловлена “замораживанием” структуры оболочки в результате минерализации.

В соответствии с полученными результатами дальнейшее исследование было проведено для капсул с оболочкой, минерализованной с использованием 0.5 М растворов солей.

СЭМ-изображение капсул с двумя бислоями PAH/PSS представлено на рис. 3а. Хорошо видна структура “ядро–оболочка” с твердым ядром из масла ши. Морфология минерализованных CaCO_3 полиэлектролитных капсул (рис. 3б) существенно отличается от исходной, видно формирование наноструктурированной развитой поверхности. В основном размер минерализованных капсул составляет примерно от 3 до 10 мкм (рис. 3в). Оценка изменения размера капсул в результате минерализации затруднена ввиду высокой полидисперсности образцов эмульсионных капсул.

СЭМ-исследование также подтвердило, что минерализованные капсулы по-прежнему содержат масло ши — под воздействием электронного пучка с ускоряющим напряжением 10 кВ из капсулы с составом оболочки $\text{GA}/(\text{PAH}/\text{PSS})_2\text{CaCO}_3$ (время минерализации оболочки 15 мин) наблюдалось высвобождение масла (рис. 4).

Пористая структура минерализованной оболочки позволяет предположить, что карбонат кальция находится в виде структурной модификации ватерита. Для подтверждения этого эмульсионные микрокапсулы с оболочкой, содержащей два бислоя PAH/PSS и минерализованной инкубацией в 0.5 М растворах солей в течение 5 мин, были исследованы методом порошковой рентгеновской дифракции (рис. 5). Рентгенограмма демонстрирует пики, соответствующие кристаллическим фазам CaCO_3 кальцита (№ 01-083-0578) и ватерита (№ 00-025-0127). Согласно базе данных JCPDS отражения 104 ($2\theta = 29.41^\circ$) и 116 ($2\theta = 48.52^\circ$) соответствуют наиболее интенсивным пикам тригональной кристаллической структуры кальцита, а 110 ($2\theta = 24.92^\circ$), 112 ($2\theta = 27.00^\circ$), 114 ($2\theta = 32.78^\circ$), 300 ($2\theta = 43.80^\circ$) и 118 ($2\theta = 49.99^\circ$) — пикам гексагональной кристаллической структуры ватерита. Результаты обработки методом Ритвельда дают фазовый состав 98.4% ватерита и 1.6% кальцита. Таким образом, в отличие от плоских полиэлектролитных пленок, при минерализации которых происходило формирование в основном аморфного CaCO_3 [16], на полиэлектролитных оболочках эмульсионных капсул преимущественно образуется ватерит. Возможно, это обусловлено существенно меньшей толщиной исходных полиэлектролитных оболочек по сравнению с пленками (1–4 бислоя PAH/PSS оболочек и 20–60 бислоев PAH/PSS в пленках), в результате чего в случае капсул рост CaCO_3 с формированием кристаллического ватерита происходит преимущественно на поверхности полиэлектролитных слоев.

Выводы о влиянии на биосовместимость эмульсионных полиэлектролитных капсул минерализации их оболочки ватеритом делали на основании результатов МТТ-анализа капсул. Для сравнения также брали раствор PAH, так как известно, что среди полиэлектролитов именно поликатионы отличаются цитотоксичностью [24].

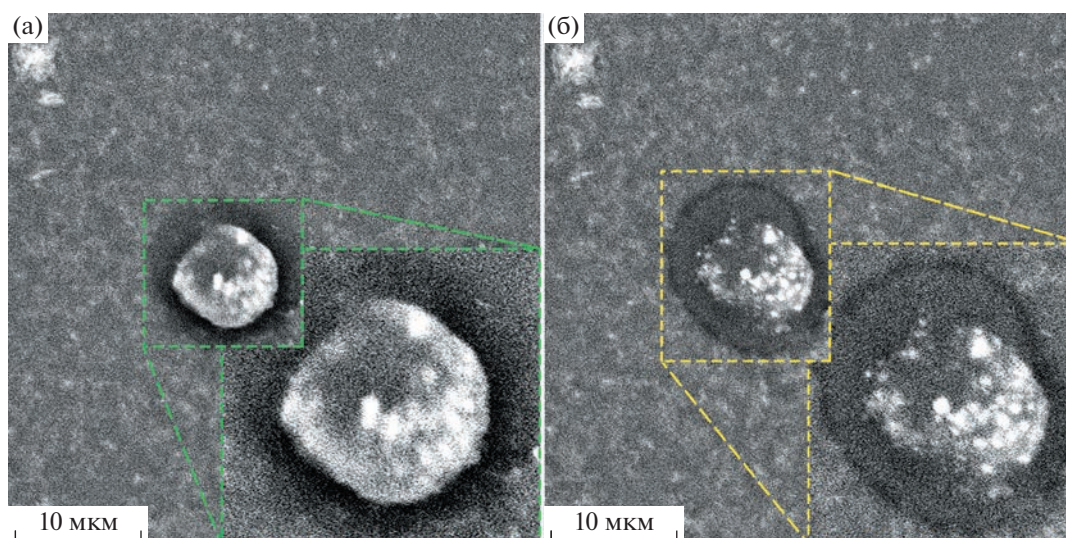


Рис. 4. СЭМ-изображение высвобождения масла из минерализованной карбонатом кальция полиэлектролитной микрокапсулы под воздействием электронного пучка: капсула после выдержки под пучком в течение 5 (а) и 15 с (б).

По результатам МТТ-теста выявлено, что РАН и капсулы с четырьмя бислоями РАН/РСС обладают цитотоксической активностью в отношении клеток линии BJ-5ta: IC₅₀ РАН – 0.0061 мг/мл, а капсул с (РАН/РСС)₄ – 0.014 мг/мл (рис. 6). В случае РАН отмечалось существенное увеличение количества живых клеток в диапазоне 0.0008–0.004 мг/мл, что свидетельствует о биосовместимости поликатиона в данном интервале концентраций. Минерализованные капсулы не проявляли значительной токсичности: при концентрации 0.1 мг/мл (по РАН) капсул выживало 74% клеток,

а при уменьшении концентрации и полиэлектролитных, и модифицированных CaCO₃ капсул до 0.002 мг/мл РАН наблюдалась выживаемость >90% клеток. То есть эксперименты на фибробластах человека показали, что в результате минерализации ватеритом капсулы становятся биосовместимыми во всем диапазоне исследуемых концентраций.

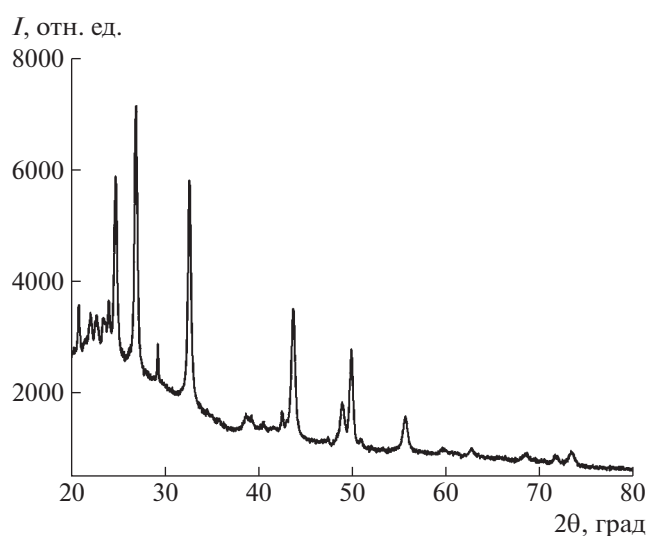


Рис. 5. Порошковая рентгенограмма образца эмульсионных полиэлектролитных микрокапсул, минерализованных карбонатом кальция.

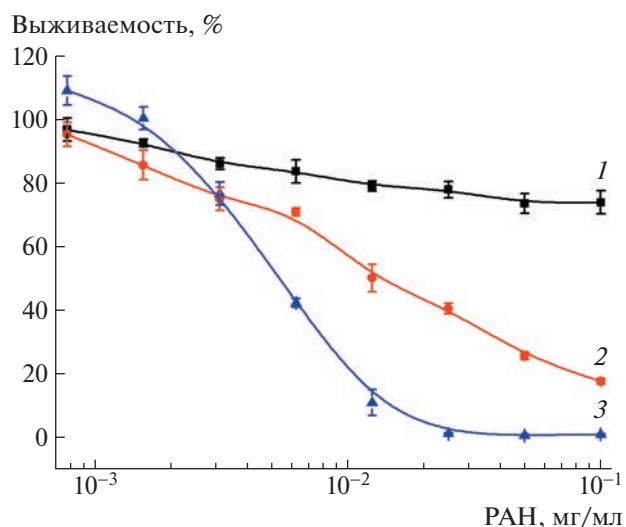


Рис. 6. Значения выживаемости клеток линии BJ-5ta после инкубации с капсулами состава оболочки GA/(PAA/PSS)₄CaCO₃, 1 об. % (1), GA/(PAA/PSS)₄, 1 об. % (2) и раствором РАН (3) в диапазоне концентраций РАН 0.0008–0.1 мг/мл, выраженные в об. %, в сравнении со средним значением выживаемости контрольных клеток, инкубированных без добавления образцов. Данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение ($n = 3$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано, что полиэлектролитные капсулы с ядром из масла ши могут быть получены ультразвуковым эмульгированием с формированием оболочки из поперечно сшитого гуммиарабика и последующим нанесением бислоев РАН/PSS методом послойной сборки. При этом все стадии синтеза эмульсионных капсул должны проводиться при нагревании системы выше температуры плавления масла для поддержания его в жидком состоянии.

Инкубация эмульсионных полиэлектролитных капсул поочередно в растворах хлорида кальция и карбоната натрия приводит к минерализации оболочек, способствующей их укреплению. Показано, что в отличие от исходных полимерных капсул с маслом ши оболочки с одним или двумя бислоями РАН/PSS, минерализованными 0.5 М растворами солей, устойчивы к длительной выдержке водной суспензии капсул при нагревании выше температуры плавления масла. Так как масло ши плавится вблизи температуры тела человека, выбранные условия можно рассматривать в качестве модельной системы нахождения капсул внутри организма. Кроме того, устойчивость разработанных оболочек открывает перспективы их применения для модификации нитей нетканых медицинских материалов.

Выявлено, что минерализация оболочек эмульсионных полиэлектролитных капсул в выбранных условиях приводит к формированию карбоната кальция структурной модификации ватерита. При этом развитая поверхность минерализованных капсул может способствовать адсорбции водорастворимых лекарств на оболочке, в то время как масляное ядро будет содержать липофильные соединения. Таким образом, разработанная система перспективна в качестве комплексного носителя лекарственных веществ различной природы. Кроме того, существуют подходы для получения исходных эмульсионных капсул субмикронных размеров [20]. Такие модифицированные ватеритом биосовместимые капсулы могут быть рассмотрены в качестве потенциальных носителей противораковых препаратов за счет пассивной адресной доставки посредством эффекта повышенной проницаемости и удержания. При этом растворение ватерита в области раковой опухоли, обладающей пониженным значением pH, будет способствовать локальному высвобождению инкапсулированного препарата.

Авторы выражают благодарность В.В. Артемову за получение СЭМ-изображений.

Оптимизация синтеза эмульсионных капсул и разработка способа минерализации полиэлектролитных эмульсионных капсул карбонатом кальция проведены в рамках Государственного задания

НИЦ “Курчатовский институт”, структурные исследования систем — Государственного задания ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН. Работа выполнена с использованием оборудования РЦ НИЦ “Курчатовский институт” (Центра оптической микроскопии и спектроскопии), а также оборудования ЦКП ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gao J., Karp J.M., Langer R., Joshi. N. // Chem. Mater. 2023. V. 35 (2). P. 359.
2. Li Z., Xu K., Qin L. et al. // Adv. Mater. 2023. V. 35. P. 1.
3. Sindhwani S., Chan W.C.W. // J. Intern. Med. 2021. V. 290 (3). P. 486.
4. Блынская Е.В., Юдина Д.В., Алексеев К.В., Марахова А.И. // Фармация. 2017. Т. 66. С. 15.
5. Rahman A., Haider Md. F., Naseem N., Rahman N. // Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2023. V. 79 (2). P. 78.
6. Gouin S. // Trends Food Sci. Technol. 2004. V. 15 (7–8). P. 330.
7. Grigoriev D.O., Bukreeva T., Möhwald H., Shchukin D.G. // Langmuir. 2008. V. 24. P. 999.
8. Shchukina E.M., Shchukin D.G. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2011. V. 63 (9). P. 837.
9. Bukreeva T.V., Borodina T.N., Trushina D.B. // Colloid J. 2022. V. 84 (5). P. 621.
10. Ariga K., Lvov Y., Decher G. // Phys. Chem. Chem. Phys. Royal Soc. Chem. 2022. V. 24 (7). P. 4097.
11. Mateos-Maroto A., Fernández-Peña L., Abellenda-Núñez I. et al. // Polymers. 2022. V. 14 (3). P. 479.
12. Boehnke N., Correa S., Hao L. et al. // Angew. Chem. Int. Ed Engl. 2020. V. 59 (7). P. 2776.
13. Gao H., Wen D., Sukhorukov G.B. // J. Mater. Chem. B. Royal Soc. Chem. 2015. V. 3 (9). P. 1888.
14. Gao H., Wen D., Tarakina N.V. et al. // Nanoscale. 2016. V. 8 (9). P. 5170.
15. Shchukin D.G., Sukhorukov G.B., Möhwald H. // Angew. Chem. Int. Ed. 2003. V. 42 (37). P. 4472.
16. Patel I.F., Kiryukhin M.V., Yakovlev N.L. et al. // J. Mater. Chem. B. 2015. V. 3 (24). P. 4821.
17. Trofimov A.D., Ivanova A.A., Zyuzin M.V. et al. // Pharmaceutics. 2018. V. 10 (4). P. 167.
18. Trushina D.B., Borodina T.N., Belyakov S. et al. // Mater. Today Adv. 2022. V. 14. P. 100214.
19. Honfo F.G., Akissoe N., Linnemann A.R. et al. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2014. V. 54 (5). P. 673.
20. Borodina T., Grigoriev D., Markvicheva E. et al. // Adv. Eng. Mater. 2011. V. 13 (3). P. B123.
21. Garfias A.F.P., Jardim K.V., Ruiz-Ortega L.I. et al. // Colloid Polym. Sci. 2022. V. 300 (12) P. 1327.
22. Yang Y., Guo L., Wang Z. et al. // Biomater. 2021. V. 264. P. 120390.
23. Mollaeva M.R., Nikolskaya E., Beganovskaya V. et al. // Antioxidants. MDPI. 2021. V. 10 (12). P. 1985.
24. Fischer D., Li Y., Ahlemeyer B. et al. // Biomater. 2003. V. 24 (7). P. 1121.