

ISSN 0132-3423

Том 50, Номер 3

Май - Июнь 2024



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ



НАУКА

— 1727 —

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 50, номер 3, 2024

Предисловие к специальным номерам, посвященным 90-летию со дня рождения основателя журнала академика РАН Юрия Анатольевича Овчинникова	201
Новый BRICHOS-ассоциированный дефенсин-подобный антимикробный пептид из морской полихеты <i>Arenicola marina</i> <i>В. Н. Сафронова, П. В. Пантелеев, Р. Н. Кругликов, И. А. Болосов, Е. И. Финкина, Т. В. Овчинникова</i>	203
Белки теплового шока на поверхности опухолевых клеток как мишени для противоопухолевой терапии (обзорная статья) <i>А. О. Макарова, В. В. Костенко, О. В. Овсяникова, Е. В. Свирицевская, Г. В. Луценко, А. М. Сапожников</i>	218
Биоинформатические подходы для детекции гибридных генов и продуктов <i>транс</i> -сплайсинга (обзорная статья) <i>И. Ю. Мусатов, М. И. Сорокин, А. А. Буздин</i>	231
Синтез бифункциональных липофильных конструкторов <i>Д. О. Анисимова, М. С. Савченко, А. Б. Тузиков, А. С. Парамонов, А. О. Чижов, Н. В. Бовин, И. М. Рыжов</i>	256
Белок эпителия человека SLURP-2 как прототип ранозаживляющих препаратов <i>М. Л. Бычков, О. В. Шлепова, М. А. Шуленко, Д. С. Кульбацкий, Д. Бертран, А. В. Кириченко, З. О. Шенкарев, М. П. Кирпичников, Е. Н. Люкманова</i>	269
Новый белок глосаксин, состоящий из некаталитических доменов металлопротеиназы типа РШ, из яда щитомордника <i>Gloydius saxatilis</i> ингибирует никотиновый холинорецептор <i>А. В. Осипов, Е. В. Крюкова, Л. О. Оджомоко, И. В. Шелухина, Р. Х. Зиганишин, В. Г. Старков, Т. В. Андреева, В. И. Цетлин, Ю. Н. Уткин</i>	279
Изоформы цитоскелетного белка зиксина в раннем эмбриогенезе шпорцевой лягушки <i>Xenopus laevis</i> <i>Э. Д. Иванова, Е. А. Паршина, А. Г. Зарайский, Н. Ю. Мартынова</i>	287
Защитная группа $\alpha$ -карбоксила аспарагиновой кислоты в виде производных (5-оксооксазолидин-4-ил)уксусной кислоты требует особого внимания при ее использовании <i>В. Н. Азев, А. Н. Чулин, М. В. Молчанов, А. И. Мирошников</i>	295
Гибридные белки, содержащие протеородопсин <i>Exiguobacterium sibiricum</i> <i>Л. Е. Петровская, Е. А. Крюкова, В. А. Большаков, Е. П. Лукашев, С. А. Силецкий, М. Д. Мамедов, Р. В. Судаков, Д. А. Долгих, М. П. Кирпичников</i>	301
Структура внешнего гептамерного $\alpha$ -кольца 26S иммунопротеасомы человека в преактивационном состоянии, выявленная методом криоэлектронной микроскопии с разрешением 3.6 Å <i>Г. А. Саратов, Т. Н. Баймухаметов, А. Л. Коневега, А. А. Кудряева, А. А. Белогуров</i>	311

Электронная микроскопия электрофоретических фракций природных гуминовых кислот – ключ к разгадке их структурной организации

*О. Е. Трубецкая, О. М. Селиванова, В. В. Рогачевский, О. А. Трубецкой* 324

Актуальность инженерно-технических решений, реализованных в филиале ИБХ РАН, и современные проблемы вивариев и питомников лабораторных животных

*А. Н. Мурашев, Ф. А. Мещеряков* 335

---

#### ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

Фактор рибонуклеопротеиновых комплексов Ybx1 стабилизирует материнскую мРНК гена *ssx2ip*, кодирующего белок созревания centrosом, в эмбриональном развитии лягушки *Xenopus laevis*

*Е. А. Паршина, А. Г. Зарайский, Н. Ю. Мартынова* 338

Пространственная организация флуоресцентного комплекса тройного мутанта бактериального липокалина с хромофором DiB3-F53L/F74L/L129M

*А. В. Россохин, Е. А. Горячева, И. В. Артемьев, С. Ф. Архипова, А. Р. Гильванов,  
Н. В. Плетнева, В. З. Плетнев* 345

---



## ПРЕДИСЛОВИЕ к специальным номерам, посвященным 90-летию со дня рождения основателя журнала академика РАН Юрия Анатольевича Овчинникова



2 августа 2024 года основателю и первому главному редактору журнала “Биоорганическая химия” академику Юрию Анатольевичу Овчинникову исполнилось бы 90 лет. Его жизнь оборвалась в 53 года, но за столь короткий срок он успел сделать поразительно много.

Главным призванием Юрия Анатольевича всегда была биоорганическая химия. С 1970 по 1988 годы он был бессменным директором Института биоорганической химии, ныне носящем имени его отцов-основателей – академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Институт биоорганической химии всегда был любимым детищем Юрия Анатольевича. Созданный им научно-образовательный и научно-производственный комплекс в Москве на улице Миклухо-Маклая, 16/10 и его филиал в Пущино – лучшие тому свидетельства. В 1975 году Юрий Анатольевич создал кафедру биоорганической химии в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова и до последнего дня своей жизни возглавлял её. Сотни его учеников и выпуск-

ников кафедры выросли на классической монографии Ю.А. Овчинникова “Биоорганическая химия”, изданной в 1987 году. В 1975 году Юрий Анатольевич основал журнал “Биоорганическая химия”, которому в 2024 году исполнилось 50 лет.

Выдающийся ученый, один из основоположников биоорганической химии и биотехнологии, создатель отечественной школы химиков-биооргаников и биотехнологов, автор более 500 научных работ в области мембранной биологии и химии пептидно-белковых веществ, лауреат Ленинской и Государственной премий, премии Правительства РФ в области науки и техники (посмертно), премии им. А. Карпинского (Германия), действительный член АН СССР и ВАСХНИЛ, вице-президент АН СССР, председатель секции химико-технологических и биологических наук Президиума АН СССР, председатель Межведомственного научно-технического совета по проблемам физико-химической биологии и биотехнологии при ГКНТ СССР и Президиуме АН СССР, генеральный директор Межотраслевого научно-

технического комплекса “Биоген”, почетный иностранный член 13 академий наук и ряда научных обществ, в том числе Академии естествоиспытателей “Леопольдина” (Германия), Европейской академии наук, искусств и литературы (Франция), Испанской Королевской академии точных, физических и естественных наук, Всемирной академии наук и искусств (Швеция), Японского биохимического общества, Американского философского общества (США), профессор МГУ, почетный доктор 8 зарубежных университетов, в том числе Парижского им. Пьера и Марии Кюри (Сорбонна, Франция), Уппсальского (Швеция), Йенского им. Фридриха Шиллера (Германия) – это лишь некоторые вехи многогранной деятельности и далеко не полный перечень научных наград академика Ю.А. Овчинникова. Его пионерские работы, связанные с установлением структуры белково-пептидных веществ, их химическим синтезом, изучением взаимосвязи между структурой и функцией и выяснением молекулярных механизмов действия широко известны во всем мире. Он установил строение и осуществил синтез ряда природных депсипептидов, открыл новый тип мембрано-активных комплексов. Под его научным руководством впервые в нашей стране была определена полная первичная структура белка (аспартатаминотрансфераза, 1974 г.), впервые в мире была установлена структура мембранных светочувствительных белков бактериородопсина, родопсина и других белков зрительного каскада, а также  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, ДНК-зависимой РНК-полимеразы, ряда рибосомных белков, фактора элонгации G, белковых токсинов и др., созданы штаммы-проду-

центы первых отечественных продуктов генно-инженерной биотехнологии – интерферона альфа-2, инсулина человека и других медицинских препаратов. Лауреат Нобелевской премии по химии Жан-Мари Лен написал: “Биоорганическая химия потеряла одного из своих пионеров, научный мир – активного сторонника международного сотрудничества. Я уверен, что в будущем успехи Института биоорганической химии засвидетельствуют верность духу своего директора”.

Объявление редколлегии журнала “Биоорганическая химия” о формировании специальных тематических номеров, посвященных 90-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова, вызвало широкий отклик у ученых-биооргаников. Среди авторов, представивших свои научные достижения, – соратники, коллеги и ученики Юрия Анатольевича, признанные ученые и молодые исследователи, Овчинниковские стипендиаты. Основное внимание в этих специальных выпусках журнала уделено исследованиям в области пептидно-белковой химии.

Редколлегия журнала “Биоорганическая химия” выражает искреннюю благодарность всем, кто представил свои статьи в специальные номера, посвященные памяти академика Ю.А. Овчинникова.

Главный редактор журнала “Биоорганическая химия”, академик РАН  
С.Н. Кочетков



УДК 577.112:577.181:571.27

# НОВЫЙ BRICHOS-АССОЦИИРОВАННЫЙ ДЕФЕНСИН-ПОДОБНЫЙ АНТИМИКРОБНЫЙ ПЕПТИД ИЗ МОРСКОЙ ПОЛИХЕТЫ *Arenicola marina*

© 2024 г. В. Н. Сафронова\*, П. В. Пантелеев\*, Р. Н. Кругликов\*, И. А. Болосов\*,  
Е. И. Финкина\*, Т. В. Овчинникова\*,#

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

Поступила в редакцию 04.12.2023 г.

После доработки 09.12.2023 г.

Принята к публикации 10.12.2023 г.

На сегодняшний день морские многощетинковые черви или полихеты остаются малоизученным классом беспозвоночных животных с точки зрения выяснения особенностей функционирования их иммунной системы и, в частности, биоразнообразия антимикробных пептидов (АМП), играющих ключевую роль в защите организма-хозяина от окружающих патогенов и регулирующих видовой состав симбиотических микроорганизмов. Изучение биосинтеза защитных АМП у полихет выявило интересную закономерность, а именно наличие так называемого BRICHOS-домена в составе белков-предшественников целого ряда таких пептидов. Консервативная структура этого домена позволяет проводить биоинформатический поиск предшественников АМП в транскриптомах полихет. В данной работе нами был обнаружен и исследован новый BRICHOS-ассоциированный АМП из пескожила *Arenicola marina*, представляющий не выявленное ранее у морских червей структурное семейство дефенсин-подобных пептидов, стабилизированных четырьмя дисульфидными связями. Пептид, содержащий 44 а.о. и названный нами AmBRI-44a, был получен путем гетерологической экспрессии в бактериальной системе *Escherichia coli*. Показано, что AmBRI-44a обладает специфической активностью в отношении узкого спектра грамположительных бактерий и не проявляет выраженного цитотоксического действия на эукариотические клетки линии HEK293T. Генетический и фенотипический анализ отобранных бактерий *Bacillus licheniformis* В-511, устойчивых к AmBRI-44a, указывает на возможный механизм антибактериального действия пептида, связанный с ингибированием биосинтеза клеточной стенки бактерий. Полученные результаты позволяют рассматривать новый АМП AmBRI-44a в качестве кандидатного соединения для создания антибиотического средства, которое потенциально может быть эффективным при лечении инфекционных заболеваний, опосредованных грамположительными бактериями с множественной лекарственной устойчивостью.

*Ключевые слова:* морские беспозвоночные, полихеты, врожденный иммунитет, антимикробный пептид, домен BRICHOS, устойчивость к антибиотикам, полногеномное секвенирование

**DOI:** 10.31857/S0132342324030016, **EDN:** OAMNAL

## ВВЕДЕНИЕ

Защитные антимикробные пептиды (АМП) – ключевые молекулярные факторы системы врожденного иммунитета большинства многоклеточных видов, включая человека [1]. АМП синтези-

руются на рибосоме и выполняют защитную функцию у животных, растений, грибов, а также играют коммуникативную роль у бактерий. В процессе эволюции на протяжении сотен миллионов лет морские многоклеточные организмы, обитающие в соленой воде всех морей и океанов – от

Сокращения: АМП – антимикробные пептиды; ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая ВЭЖХ; КД – круговой дихроизм; ДФХ – додецилфосфохолин; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; ФБС – фетальная бычья сыворотка; МНВ – среда Мюллера–Хинтон.

# Автор для связи: (эл. почта: ovch@ibch.ru).

Арктики до Антарктики, постоянно совершенствовались и успешно сформировали надежные защитные механизмы врожденного иммунитета [2]. В то же время, по сравнению с наземными видами, морские животные практически не исследованы с точки зрения функционирования иммунной системы. Все морские виды живут в богатой микроорганизмами среде, а следовательно, активно используют немедленную защиту на основе разнообразных по структуре и биологическим свойствам АМП, реализуемую в рамках функционирования системы врожденного иммунитета. Для морских беспозвоночных, представляющих абсолютное большинство видового разнообразия морских организмов и не обладающих адаптивным иммунитетом, роль АМП особенно важна [3]. Стоит отметить, что на сегодняшний день описано не менее 10 тыс. видов морских полихет [4, 5], каждый из которых потенциально является богатым источником новых пептидных антибиотиков, что подтвердил ряд проведенных нами исследований [6–8]. АМП из морских видов вызывают значительный практический интерес, т.к. эти пептиды сохраняют высокую антибактериальную активность в присутствии солей в широком диапазоне концентраций – от физиологических значений до эквивалентных таковым в морской воде, при которых существенно снижается активность большинства известных катионных пептидов, включая кателицидин человека LL-37.

Выделение новых пептидов и белков из природных источников на сегодняшний день остается трудоемкой и времязатратной технологией. Очевидно, что более эффективный подход к поиску новых АМП – биоинформатический анализ баз данных и предсказание *in silico* потенциальных антимикробных соединений с последующим скринингом их биологической активности. В настоящее время все больше научных групп прибегает к методике поиска новых АМП и бактериоцинов с использованием баз данных нуклеотидных последовательностей геномов и транскриптомов [9, 10]. Ранее, при изучении структуры белков-предшественников ареницинов из пескожила *Arenicola marina*, нами был обнаружен так называемый BRICHOS-домен (~100 а.о.), встречающийся у различных животных, включая человека [7, 11]. Появляется все больше новых данных в пользу того, что BRICHOS-домен выступает в качестве молекулярного шаперона при биосинтезе срав-

нительно гидрофобных и амфифильных молекул [12]. Полученные недавно результаты позволили высказать предположение, что BRICHOS-домен может участвовать в биосинтезе АМП различных структурных классов у полихет аналогично кателин-подобному домену у позвоночных [8, 13]. Гомология аминокислотных последовательностей среди BRICHOS-доменов белков из различных биологических видов невысока (особенно по сравнению с консервативностью кателин-подобного домена), однако наличие двух консервативных участков в структуре позволяет проводить поиск последовательностей, кодирующих BRICHOS-содержащие белки, в транскриптомах животных. С использованием данного подхода нами была обнаружена панель новых  $\beta$ -шпилечных ареницин-подобных АМП в транскриптомах целого ряда полихет, включая *A. marina* [10], а также идентифицированы новые структурные семейства АМП у полихеты *Heteromastus* [14].

Самое распространенное суждение о механизме действия АМП основано на способности большинства из них нарушать целостность цитоплазматической мембраны и вызывать гибель клеток-мишеней. Однако следует учесть тот факт, что некоторые АМП полностью лишены мембранотропных свойств. В последние годы появляется все больше сведений о внутриклеточных мишенях АМП (например, о рибосоме [15]), а также о различных молекулярных мишенях на поверхности клеток (например, жизненно важных белках внешней мембраны грамотрицательных бактерий [16] и структурных компонентах клеточной стенки грамположительных бактерий [17]), что дополнительно снижает риск возникновения устойчивости к этим соединениям. Значительным терапевтическим потенциалом в качестве антибиотиков для системного применения обладают стабилизированные тремя или четырьмя дисульфидными связями и устойчивые к протеолизу дефенсин-подобные АМП, которые связываются со структурными элементами клеточной стенки бактерий, в частности с липидом II. Ранее такая способность была показана для  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефенсинов человека, дефенсинов семейства Cg-Def тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* и плектазина гриба *Pseudoplectania nigrella* [17]. Цель данной работы – биотехнологическое получение нового дефенсин-подобного антимикробного пептида

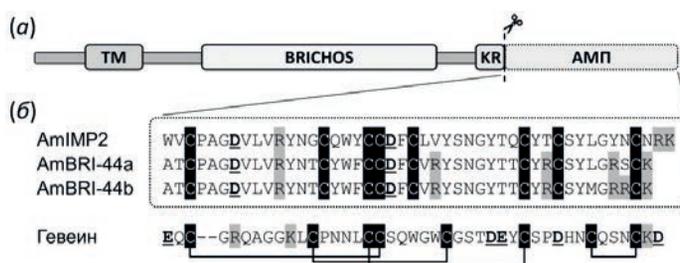
AmBRI-44a из морской полихеты *A. marina* методом гетерологической экспрессии в клетках *Escherichia coli*, исследование его биологической активности и механизма антибактериального действия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Биоинформатический поиск BRICHOS-ассоциированных АМП морской полихеты *Arenicola marina*.** Ранее в ходе углубленного исследования экспрессии генов в целоμοцитах пескожила *A. marina*, относящихся к системе врожденного иммунитета животного, были обнаружены новые BRICHOS-содержащие белки с неизвестной функцией, в частности новый цистеин-богатый пептид, названный AmIMP2 [18]. В отличие от известных BRICHOS-ассоциированных предшественников АМП, например, препроареницинов [7], белок-предшественник AmIMP2 содержит в своей структуре трансмембранный (якорный) участок, а не сигнальный пептид (рис. 1а). В данной работе был продолжен поиск BRICHOS-ассоциированных АМП полихеты в исследованном нами ранее транскриптом *A. marina*, который содержит информацию об экспрессии генов во всех тканях животного (NCBI Accession No SRX1015734). В совокупности, поиск по наличию BRICHOS-домена в базе данных транслированных последовательностей с использованием программы HMMscan [19], а также BLAST-поиск по гомологии последовательности AmIMP2 позволили обнаружить два дополнительных представителя нового семейства цистеин-богатых BRICHOS-ассоциированных пептидов, состоящих из 44 а.о. (в том числе по 8 остатков цистеина) и назван-

ных AmBRI-44a и AmBRI-44b (рис. 1б). Данные пептиды близкородственные и отличаются лишь двумя аминокислотными остатками (L39M, S42R). По сравнению с AmIMP2, новые пептиды несут более высокий общий положительный заряд (+3 и +4 соответственно) при нейтральных значениях pH среды – это важная характеристика катионных АМП для проявления ими антимикробной активности. Следует отметить уникальную структуру нового семейства пептидов: поиск в базе данных APD3 по антимикробным пептидам [20] выявил низкую степень гомологии первичной структуры новых пептидов (<40%) с известными АМП, а их ближайшие гомологи с точки зрения расположения остатков цистеина в аминокислотной последовательности – растительные АМП семейства гевеинов, основная мишень которых – плесневые грибы [21].

**Биотехнологическое получение нового пептида AmBRI-44a.** Для проведения дальнейших структурно-функциональных исследований был выбран новый пептид AmBRI-44a как более близкий по структуре ранее описанному AmIMP2. Учитывая отсутствие данных о характере замыкания четырех дисульфидных связей в структуре новых пептидов, нами был выбран биотехнологический способ его получения в составе гибридного белка с тиоредоксином А в бактериальной системе экспрессии *Escherichia coli* BL21 (DE3). Тиоредоксин А широко применяется в качестве белка-партнера, обеспечивающего не только снижение потенциальной токсичности получаемого пептида в составе гибридного белка, но и корректный фолдинг, идентичный природному, что было ранее продемонстрировано на примере получения рекомбинантных аналогов целого

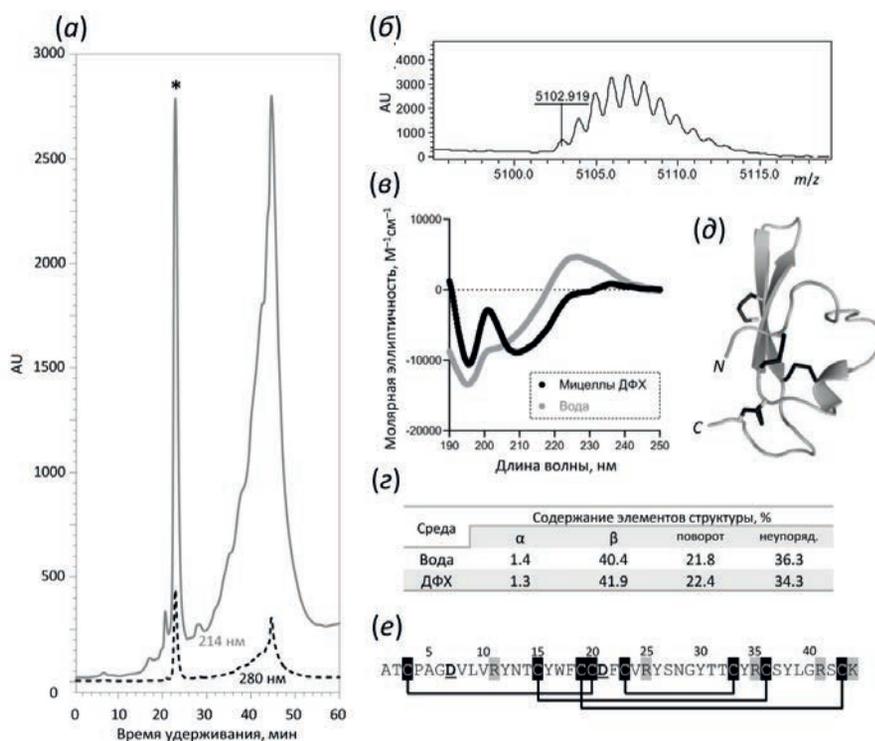


**Рис. 1.** Первичная структура новых BRICHOS-ассоциированных пептидов из *A. marina*. (а) – Структурная организация белков-предшественников новых цистеин-богатых пептидов. ТМ – трансмембранный (якорный) участок; КR – сайт потенциального процессинга фуринов-подобными протеазами (обозначено “ножницами”); АМП – участок, соответствующий зрелому пептиду; (б) – выравнивание аминокислотных последовательностей пептида AmIMP2 [18], новых пептидов AmBRI-44a и AmBRI-44b из *A. marina* и гевеина из *Hevea brasiliensis* (UniProt: P02877). Остатки цистеина выделены черным фоном, остатки аргинина и лизина – серым фоном. Остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот подчеркнуты. Квадратные скобки показывают порядок замыкания четырех дисульфидных связей.

ряда токсинов и АМП, стабилизированных дисульфидными связями [22]. Таким образом, биосинтез пептида AmBRI-44a проходил в виде гибридного белка, в состав которого входили следующие элементы: 1) восемь остатков гистидина (His-tag) в *N*-концевой части белка, обеспечивающие возможность его очистки методом аффинной хроматографии; 2) последовательность вышеупомянутого тиоредоксина А с аминокислотной заменой метионина на лейцин (M37L); 3) остаток метионина; 4) последовательность зрелого AmBRI-44a. Финальную очистку целевого рекомбинантного пептида AmBRI-44a после специфического расщепления гибридного белка

бромцианом по остатку метионина осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) на полупрепаративной колонке Reprosil-Pur C18-AQ в линейном градиенте ацетонитрила (при повышении концентрации ацетонитрила от 5 до 80% за 60 мин) (рис. 2а).

**Анализ структуры полученного пептида AmBRI-44a.** Анализ основной фракции элюата проводили методом MALDI-масс-спектрометрии (рис. 2б). Экспериментальное значение  $m/z$  моноизотопного иона (5102.919) соответствовало расчетному значению молекулярной массы протонированного иона целевого пептида ( $[M + H]^+$  5103.17 Да) и указывало на образование четырех



**Рис. 2.** Получение рекомбинантного пептида AmBRI-44a и его структурная характеристика. (а) – Хроматограмма очистки пептида AmBRI-44a методом ОФ-ВЭЖХ. Выход пептида детектировали по изменению оптического поглощения при длинах волн 214 нм (серая линия) и 280 нм (черная линия). Звездочкой на хроматограмме отмечена фракция, содержащая целевой пептид; (б) – MALDI-масс-спектрометрический анализ фракции ОФ-ВЭЖХ, соответствующей целевому пептиду; (в) – спектры кругового дихроизма (КД) очищенного рекомбинантного пептида AmBRI-44a в воде и в мицеллах додецилфосфохолина (ДФХ); (г) – анализ вторичной структуры пептида AmBRI-44a с использованием данных КД-спектроскопии и программы CONTINLL [35]; (д) – моделирование пространственной структуры пептида AmBRI-44a было проведено с использованием алгоритма AlphaFold2 (программа ColabFold [36]), визуализация модели получена в программе PyMol. Дисульфидные связи выделены черным цветом; (е) – аминокислотная последовательность пептида AmBRI-44a. Серым цветом выделены основные аминокислотные остатки, подчеркиванием – кислые. Квадратные скобки показывают возможный характер замыкания дисульфидных связей (в соответствии с предсказанной моделью пространственной структуры пептида).

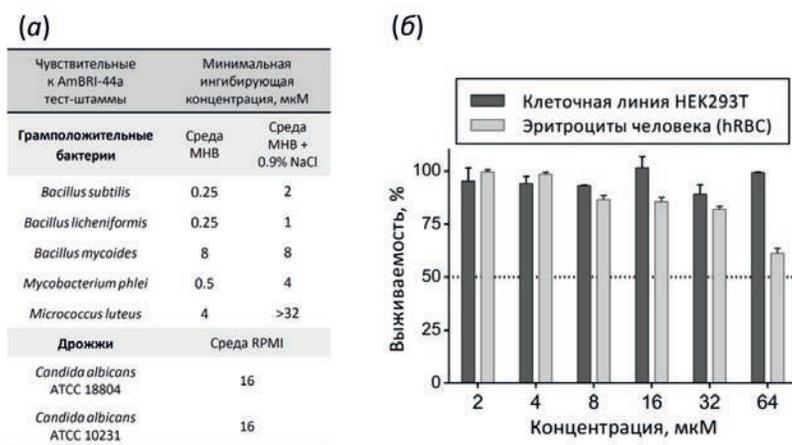
дисульфидных связей (–8 Да). Выход рекомбинантного пептида AmBRI-44a составлял не менее 6 мг с 1 л бактериальной культуры.

Дальнейший анализ структуры пептида AmBRI-44a осуществляли с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД) (рис. 2*в*). Спектры регистрировали в воде, а также в мицеллах додецилфосфохолина (ДФХ) – классической имитирующей мембрану среде, используемой при исследовании катионных АМП [23]. КД-спектр AmBRI-44a в воде характеризуется наличием выраженного минимума при 195 нм, перегиба при 200–205 нм и максимума при 225 нм. Существенные отличия формы спектра гевеин-подобных пептидов в водных буферах (наличие максимума при 220 нм и минимума при 200 нм [24]) указывают на принципиально иную структуру AmBRI-44a, несмотря на схожее расположение остатков цистеина в последовательности. Присутствие мицелл ДФХ приводит к изменению конформации пептида AmBRI-44a и появлению двух выраженных минимумов при 195 и 210 нм. Несмотря на видимые отличия форм спектров, анализ полученных данных с помощью программы CONTINLL указывает на в целом схожее соотношение различных типов вторичной структуры с преобладанием β-тяжей и поворотов, а также с отсутствием α-спиральных элементов (рис. 2*з*), характерных для гевеинов [21]. Интересно отметить, что полученные результаты хорошо согласуются с данными моделирования

пространственной структуры AmBRI-44a *de novo* с использованием алгоритма AlphaFold2 (рис. 2*д*). Для полученной модели характерно наличие центрального элемента структуры – β-шпильки (остатки 20–36), стабилизированной дисульфидной связью (Cys23–Cys33) и типичным структурным элементом β-изгиба (Asn28–Gly29). О характере замыкания дисульфидных связей в AmBRI-44a на данный момент позволяют судить лишь данные моделирования (рис. 2*е*). Таким образом, мы предполагаем, что AmBRI-44a – преимущественно β-структурный пептид с уникальной пространственной организацией, которая ранее не была описана в литературе для известных АМП.

**Антимикробная активность, селективность действия и цитотоксичность пептида AmBRI-44a.** На следующем этапе исследовали антимикробную активность пептида AmBRI-44a в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий и дрожжеподобных грибов (рис. 3*а*), а также его потенциальное токсическое воздействие на клетки млекопитающих (рис. 3*б*).

Тестирование антимикробной активности с целью определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) проводили методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде в соответствии с нормативами микробиологических стандартов. Скрининг актив-



**Рис. 3.** Биологическая активность рекомбинантного пептида AmBRI-44a. (а) – Антимикробная активность в отношении грамположительных бактерий и дрожжеподобных грибов; (б) – цитотоксичность пептида в отношении клеток человека.

ности AmBRI-44a в отношении широкой панели микроорганизмов (табл. 1) позволил выявить специфическое действие пептида на бактерии родов *Bacillus* (штаммы *B. subtilis* В-886, *B. licheniformis* В-511, *B. mycoides* В-814) и родственные им *Mycobacterium* (*M. phlei* Ас-1291). Активность в отношении штамма грамположительных бактерий *Micrococcus luteus* В-1314 была показана лишь в среде с пониженной ионной силой, что указывает на роль электростатического отталкивания при взаимодействии пептида к клеткой-мишеню. Стоит отметить, что для исследуемого пептида не были установлены значения ингиби-

рующих концентраций (МИК > 32 мкМ) в отношении панели штаммов грамотрицательных бактерий, таких как *E. coli* ML-35p, *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* XDR CI 2675, *Enterobacter cloacae* XDR CI 4172, *Vibrio harveyi* ВВ120, а также грамположительных бактерий, таких как *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* MDR CI 119, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 и *M. smegmatis* mc(2)155.

Также была показана антимикробная активность в отношении дрожжеподобных грибов

**Таблица 1.** Используемые штаммы микроорганизмов

Микроорганизм	Характеристика (источник, устойчивость к антибиотикам)
Бактерии	
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Штамм для клонирования (Invitrogen, США)
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Штамм для экспрессии (Novagen, США)
<i>Escherichia coli</i> ML-35p	Лабораторный штамм (ATCC 43827)
<i>Escherichia coli</i>	Лабораторный штамм (ATCC 25922)
<i>Enterobacter cloacae</i> CI 4172	Клинический изолят (XDR)
<i>Acinetobacter baumannii</i> CI 2675	Клинический изолят (XDR)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Лабораторный штамм (ATCC 700603)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Лабораторный штамм (ATCC 15692)
<i>Vibrio harveyi</i> ВВ120	Лабораторный штамм (ATCC ВАА-1116)
<i>Bacillus subtilis</i>	Лабораторный штамм (VKM В-886)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Лабораторный штамм (VKM В-511)
<i>Bacillus mycoides</i>	Лабораторный штамм (VKM В-814)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Лабораторный штамм (ATCC 29213)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Лабораторный штамм (ATCC 6538P)
<i>Staphylococcus aureus</i> CI 119	Клинический изолят (MDR)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Лабораторный штамм (ATCC 29212)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc(2)155	Лабораторный штамм (ATCC 700084D-5)
<i>Mycobacterium phlei</i>	Лабораторный штамм (VKM Ас-1291)
<i>Micrococcus luteus</i>	Лабораторный штамм (VKM В-1314)
Дрожжи	
<i>Candida albicans</i>	Лабораторный штамм (ATCC 18804)
<i>Candida albicans</i>	Лабораторный штамм (ATCC 10231)

Примечание: ATCC – Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection); VKM – Всероссийская коллекция микроорганизмов (All-Russian Collection of Microorganisms); XDR – штамм с экстремальной лекарственной устойчивостью; MDR – штамм с множественной лекарственной устойчивостью.

*Candida albicans*, однако сравнительно высокие значения МИК (16 мкМ) свидетельствуют скорее в пользу неспецифического действия на мембраны данных эукариотических клеток. Подобный характер селективного действия в отношении ряда грамположительных бактерий при наличии неспецифической умеренной активности в отношении различных эукариотических клеток, включая дрожжеподобные и плесневые грибы, был ранее показан для ряда дефенсин-подобных пептидов животного происхождения [25].

Отсутствие селективности действия в отношении микробных клеток – один из существенных недостатков многих катионных АМП, действующих на мембраны любого состава. Наличие токсических свойств AmBRI-44a оценивали в отношении свежeweделенных эритроцитов здорового донора (hRBC) и стандартной линии трансформированных эмбриональных клеток почки человека (НЕК293Т). Было показано, что AmBRI-44a обладает умеренной гемолитической активностью лишь при концентрации >64 мкМ, что также сопровождается агглютинацией эритроцитов. Вместе с тем пептид AmBRI-44a не оказывал повреждающего действия на клетки НЕК293Т даже при концентрации 64 мкМ. Было высказано предположение, что активность пептида ингибируется в присутствии фетальной бычьей сыворотки (ФБС) в культуральной среде, что ранее было показано для ряда АМП [10]. Дополнительный анализ активности AmBRI-44a в отношении чувствительного к нему тест-штамма бактерии *B. licheniformis* В-511 в среде Мюллера–Хинтон (МНВ), содержащей 5% ФБС, показал сохранение активности (МИК ~1 мкМ). Таким образом, можно сделать вывод о наличии умеренного цитотоксического действия AmBRI-44a в отношении клеток млекопитающих, которое проявляется лишь в концентрациях, на два порядка превышающих значения МИК в отношении наиболее чувствительных бактерий.

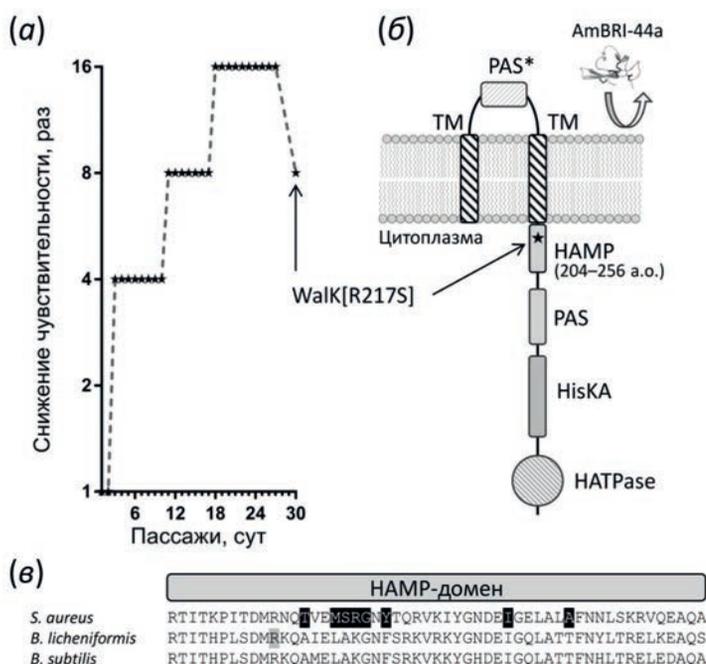
**Механизм действия пептида AmBRI-44a. Индукция бактериальной устойчивости к пептиду AmBRI-44a.** Подобный избирательный и не связанный с нарушением целостности мембран характер действия AmBRI-44a позволяет предположить наличие специфической мишени на поверхности некоторых видов грамположительных бактерий, в первую очередь, отно-

сящихся к роду *Bacillus*. С целью обнаружения потенциальной мишени для AmBRI-44a был проведен 30-суточный эксперимент по селекции устойчивого штамма бактерий *B. licheniformis* В-511 методом последовательных ежедневных пересевов (пассажей) клеточной культуры с использованием 96-луночных планшетов в жидкой среде Мюллера–Хинтон, содержащей исследуемые антимикробные препараты в концентрациях, полученных при двукратных серийных разведениях. Данный метод позволяет контролировать изменение МИК тестируемых препаратов при каждом пересеве (рис. 4а). В результате был получен устойчивый к пептиду AmBRI-44a штамм *B. licheniformis* (RES) и показано увеличение МИК в 16 раз после 27 пассажей. Полученный штамм, культивируемый в среде без селективирующего давления (в отсутствие АМП) в течение 3 сут, не восстанавливал чувствительность к данному пептиду (итоговое увеличение МИК в 8 раз), что свидетельствует о появлении стабильной бактериальной устойчивости и о наличии соответствующих мутаций в геномной ДНК. Важно отметить, что для АМП, действие которых преимущественно связано с нарушением мембран бактериальной клетки независимо от способа действия (детергент-подобный механизм, модель “тороидальной поры” или иной механизм), как правило, не удается отобрать штаммы со стабильной устойчивостью ввиду существенной затратности такой адаптации для физиологии клетки. В случае со штаммом, устойчивым к пептиду AmBRI-44a, не наблюдалось значимых отличий в скорости роста бактериальной культуры, однако существенные отличия были обнаружены в форме колоний: в отличие от природного фенотипа, для которого характерна неправильная “лишайникообразная” форма с обилием волосовидных выростов, у устойчивого штамма наблюдалась нетипичная для *B. licheniformis* исключительно круглая форма колоний без каких-либо выростов.

Для идентификации генетических изменений в полученном устойчивом штамме *B. licheniformis* (RES) было проведено его полногеномное секвенирование. Анализ полученных данных позволил выявить полиморфизм – две однонуклеотидные мутации по сравнению со штаммом дикого типа. Первая мутация приводит к аминокислотной замене V375A в малоизученном белке

TgpA, для которого анализ с помощью алгоритма SMART [26] указывает на локализацию в цитоплазматической мембране и наличие домена с активностью трансглутаминазы. BLAST-анализ в геномных базах данных показал, что данный полиморфизм характерен для многих природных штаммов *B. licheniformis*. Таким образом, влияние данной мутации на устойчивость к AmBRI-44a хотя и не исключено, но едва ли играет ключевую роль. Вторая обнаруженная нами мутация в устойчивом штамме *B. licheniformis* (RES) приводит к аминокислотной замене R217S в жизненно важном для бацилл белке WalK [27] – гистидинкиназе двухкомпонентной системы (TCS) WalK/WalR (рис. 4б), регулирующей биосинтез клеточной стенки многих грамположитель-

ных бактерий, в частности стафилококков и бацилл [28]. Ряд исследований показал, что система WalK/WalR регулирует метаболизм клеточной стенки во время роста клеток, воспринимая в качестве сигнала появление продуктов гидролиза пептидогликана, в частности дипептида D-Ala-D-Ala – одного из структурных элементов липида II [29]. Таким образом, могут быть рассмотрены две возможные гипотезы механизма действия AmBRI-44a: 1) прямое взаимодействие пептида с белком WalK; 2) взаимодействие с другими мишенями, биосинтез которых регулируется белком WalK, в первую очередь, с компонентами клеточной стенки. В литературе ранее был описан ряд природных антибиотиков, напрямую действующих на гистидинкиназу WalK. Так, было



**Рис. 4.** Предполагаемый механизм антибактериального действия пептида AmBRI-44a. (а) – Индукция устойчивости бактерий *Bacillus licheniformis* B-511 к пептиду AmBRI-44a (начальное значение МИК 0.25 мкМ). После 27 сут последовательных пассажей в присутствии пептида AmBRI-44a бактериальную культуру, способную расти при максимальной концентрации АМП, пересевали на агаризованной среде МНВ в течение 3 сут, после чего определяли итоговое значение МИК; (б) – структурная организация сенсорной гистидинкиназы WalK бактерий *B. licheniformis*, которая состоит из пяти доменов: PAS\* (PER-ARNT-SIM sensor) – внеклеточный сенсорный домен; HAMP-домен белка WalK (аббревиатура отражает присутствие домена в следующих белках: Histidine kinases, Adenyl cyclases, Methyl-ascerting chemotaxis proteins, Phosphatases) – цитоплазматический домен, ответственный за фосфорилирование при передаче сигнала; PAS – цитоплазматический сенсорный домен; HisKA – димеризующийся домен, ответственный за аутофосфорилирование гистидина; HATPase – АТФазный домен гистидинкиназы; (в) – выравнивание аминокислотных последовательностей HAMP-домена гистидинкиназы WalK для различных бактерий. Обнаруженные ранее остатки, для которых был показан полиморфизм и соответствующий мутантный фенотип устойчивости бактерий *S. aureus* к ванкомицину (согласно данным [32, 37]), выделены черным цветом. Мутация WalK[R217S], обнаруженная в данном исследовании у *B. licheniformis*, выделена серым цветом.

показано, что валдиомицин и сигнермицин В, продуцируемые бактериями рода *Streptomyces*, способны связываться с доменом HisKA (рис. 4б) [30, 31]. В отличие от упомянутых сравнительно небольших антибиотиков, пептид AmBRI-44a, имеющий молекулярную массу >5 кДа, не может проникнуть через мембрану без нарушения ее структуры. Кроме того, учитывая субмикромольное значение МИК пептида в отношении *B. licheniformis*, маловероятным представляется механизм, сопряженный с прямым взаимодействием AmBRI-44a с цитоплазматическим доменом HAMР.

Интересно отметить сразу несколько мутаций, выявленных ранее в HAMР-домене белка Walk у *S. aureus*, которые были ассоциированы со сниженной чувствительностью у бактерий к ванкомицину (рис. 4в). Мутации в данном домене также приводят к утолщению клеточной стенки и снижению аутолитической активности [32, 33], причем сходные фенотипические изменения – результат гиперэкспрессии генов *walk* и *walR*. Поскольку при селекции устойчивости грамположительных бактерий к различным ингибиторам биосинтеза клеточной стенки зачастую возникает мутация в гене *walk*, на следующем этапе мы решили проанализировать эффекты перекрестной устойчивости полученного штамма

*B. licheniformis* (RES) к различным антибиотикам, преимущественно нацеленным на грамположительные бактерии, а также к АМП ( $\alpha$ -спиральный линейный кателицидин человека LL-37 и  $\beta$ -шпилечный тахиплезин-1 из мечехвоста *Tachypleus tridentatus*), действие которых связано с нарушением целостности мембран бактерий (табл. 1).

Как и предполагалось, перекрестная устойчивость (увеличение МИК в 4 раза, выделено полужирным шрифтом в табл. 2) была обнаружена только к ванкомицину и низину, действие которых реализуется посредством связывания с липидом II. Стоит отметить, что механизм действия ванкомицина и низина несколько отличается: ванкомицин препятствует росту клеточной стенки путем связывания с C-концевым мотивом D-Ala-D-Ala липида II, в то время как низин связывается с пиррофосфатным фрагментом липида II с последующим формированием поры в мембране [17]. Таким образом, обнаруженная нами мутация в домене HAMР, ассоциированная со снижением чувствительности к АМП, ванкомицину и низину, – это первый описанный в литературе случай для бактерий рода *Bacillus*, а полученные данные указывают на предположительный механизм действия пептида AmBRI-44a, заключающийся в ингибировании биосинтеза клеточной стенки.

**Таблица 2.** Анализ эффектов перекрестной устойчивости отобранного штамма *B. licheniformis* В-511 к конвенциональным антибиотикам и различным АМП

Антимикробный агент	Минимальная ингибирующая концентрация (МИК), мкМ	
	WT	RES
Пептид AmBRI-44a	0.25	2
Кателицидин LL-37	1	1
Тахиплезин-1	0.125	0.063
Низин	0.063	<b>0.25</b>
Ванкомицин	0.25	<b>1</b>
Рифампицин	2	4
Тетрациклин	1	0.5
Гентамицин	0.125	0.125

Примечание: WT – *B. licheniformis* В-511 дикого типа; RES – полученный штамм *B. licheniformis* В-511, устойчивый к пептиду AmBRI-44a. Полужирным шрифтом выделены значения МИК устойчивого к пептиду AmBRI-44a штамма *B. licheniformis* В-511, в 4 раза превосходящие значения МИК штамма *B. licheniformis* В-511 дикого типа.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Получение рекомбинантного пептида AmBRI-44a.** На начальном этапе с учетом данных о частоте встречаемости кодонов у *E. coli* были сконструированы праймеры для синтеза и амплификации последовательности, кодирующей исследуемый АМП. Перед последовательностью, кодирующей АМП, был предусмотрен метиониновый кодон ATG, после нее – стоп-кодон TAA. Последовательности всех праймеров были оптимизированы с помощью программы OligoAnalyzer (IDT, <http://www.idtdna.com>) для снижения вероятности образования вторичных структур (шпилек) и димеров в ходе синтеза. Последовательность, кодирующую исследуемый АМП, получали путем медленного отжига 3'-концов (по 20 нуклеотидов) двух праймеров, соответствующих N- и C-концевым областям пептида AmBRI-44a, с последующей достройкой до двуцепочечной структуры. Полученный фрагмент ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BglII и EcoRI (Thermo Scientific, США) для образования липких концов. После очистки линейаризованного экспрессионного вектора (плазмиды на основе вектора pET [23]) проводили лигазную реакцию с собранным фрагментом ДНК. Полученной реакционной смесью трансформировали клетки *E. coli* DH10B методом теплового шока. Отбор клонов, содержащих требуемую вставку, осуществляли методом ПЦР с помощью термостабильной Taq ДНК-полимеразы (Евроген, Россия). Амплификацию вставки проводили на программируемом амплификаторе Терцик (ДНК-Технология, Россия) с использованием обратного праймера T7 Reverse, комплементарного сайту терминации транскрипции, и прямого праймера (5'-GGTCCGTG-CAAACGTGATCGCCCCGA-3'), комплементарного участку гена, кодирующего тиоредоксин А. Температурный режим реакции: 95°C – 10 мин (1 цикл); далее 94°C – 30 с, 50°C – 40 с, 72°C – 30 с (25 циклов). Правильность сборки промежуточной и целевой конструкции подтверждали методом секвенирования очищенной плазмидной ДНК по Сэнгеру.

Рекомбинантный пептид экспрессировали в клетках *E. coli* BL21 (DE3) в составе гибридного белка, содержащего His-метку, тиоредоксин А с заменой M37L, остаток метионина и последовательность AmBRI-44a. Клетки, трансформированные соответствующей плазмидной конструкцией, выращивали в лизогенной среде

LB с добавлением 20 мМ глюкозы, 1 мМ MgSO<sub>4</sub> и 100 мкг/мл ампициллина, при 37°C до оптической плотности OD<sub>600</sub> 0.8–1.0. Экспрессию гена индуцировали добавлением 0.2 мМ изопропил-β-D-1-тиогактопиранозида (IPTG), и культуру инкубировали в течение 4–5 ч при 30°C и интенсивном перемешивании. После этого культуральную жидкость осаждали центрифугированием и подвергали ультразвуковому лизису в буфере, содержащем 100 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 М гуанидин-HCl и 20 мМ имидазола (рН 7.8). Осветленный лизат очищали с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA Sepharose (GE Healthcare, США). Гибридный белок элюировали буфером, содержащим 100 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 М гуанидин-HCl и 0.5 М имидазола (рН 7.8). Для получения целевого пептида собранную фракцию титровали концентрированной соляной кислотой (до рН 1.0–2.0) и добавляли 100-кратный молярный избыток бромциана. После 18 ч инкубации в темноте при 25°C реакцию останавливали добавлением трехкратного объема воды и упариванием образца на вакуумной центрифуге при 37°C. Продукты реакции расщепления разделяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) на препаративной колонке ReproSil-Pur 120 C18-AQ (10 × 250 мм, размер частиц 5 мкм, Dr. Maisch GmbH, Германия) при скорости потока 2 мл/мин в линейном градиенте водного раствора ацетонитрила, содержащего 0.1% ТФУ. Элюцию пептида детектировали при 214 и 280 нм, фракции собирали и анализировали с помощью масс-спектрометра Reflex III (Bruker Daltonics, Германия). Фракцию, соответствующую молекулярной массе целевого пептида AmBRI-44a, высушивали на вакуумном концентраторе SpeedVac (Savant, США) и растворяли в воде. Концентрацию пептида оценивали с помощью спектрофотометра (Implen, Германия) по поглощению при 280 нм.

**Анализ вторичной структуры пептида AmBRI-44a методом спектроскопии кругового дихроизма.** Вторичную структуру пептида AmBRI-44a исследовали в тридистиллированной воде или 30 мМ растворе додецилфосфолина (ДФХ) методом спектроскопии кругового дихроизма (КД). Анализ проводили в Центре коллективного пользования ИБХ РАН на спектрополяриметре J-810 (Jasco, Япония). Спектры измеряли в диапазоне 190–250 нм в кювете с длиной оптического пути 0.01 см. Усредненные данные четырех измерений для каждого образца анализировали с помощью программы CONTINLL

(пакет CDPro, <https://lama.r.colostate.edu/~sreeram/CDPro/>).

**Анализ антибактериальной активности пептида AmBRI-44a.** Антибактериальную активность пептида AmBRI-44a оценивали методом двукратных серийных разведений в стерильных 96-луночных плоскодонных полистироловых микропланшетах (Eppendorf #0030730011) в среде Мюллера–Хинтон (МНВ; Sigma, США) в присутствии или в отсутствие 0.9% NaCl. Бактериальные культуры (табл. 1) выращивали в среде LB до достижения культурой оптической плотности  $OD_{600}$  1.0 при 37°C, после чего разбавляли двукратной тест-средой (2× МНВ ± 1.8% NaCl) до конечной концентрации клеток  $10^6$  КОЕ/мл. Аликвоты тест-культур объемом 50 мкл добавляли к 50 мкл водного раствора пептида AmBRI-44a, предварительно растворенного в 0.1%-ном стерильном бычьем сывороточном альбумине (БСА) для снижения его неспецифического связывания с поверхностью планшетов. Планшеты инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 950 об/мин на планшетном микрошейкере. Значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) определяли с помощью спектрофотометра (Implen, Германия) как минимальные концентрации пептида AmBRI-44a, при которых не происходит рост культуры, и рассчитывали как медиану значений, полученных в ходе трех независимых экспериментов.

**Анализ противогрибковой активности пептида AmBRI-44a.** Противогрибковую активность пептида AmBRI-44a оценивали методом двукратных серийных разведений в стерильных 96-луночных микропланшетах. Культуры дрожжеподобных грибов *C. albicans* (табл. 1) выращивали на стерильных чашках Петри с модифицированным агаром YPD (дрожжевой экстракт 5 г/л, пептон 10 г/л, глюкоза 10 г/л) в течение 48 ч при 37°C, после чего культивировали в модифицированном бульоне YPD при 37°C до достижения оптической плотности 1.0 при длине волны 570 нм. Суспензию дрожжевых клеток разводили стандартной средой RPMI до конечной концентрации  $5 \times 10^4$  КОЕ/мл и смешивали с равными объемами водного раствора пептида AmBRI-44a. Планшет инкубировали при 30°C в течение 24 ч. Рост дрожжей оценивали визуально с помощью микроскопа CX31 (Olympus, Германия), а также путем измерения оптической плотности культуры в лунках при 570 нм. Значения МИК определяли как минимальные концентрации пептида AmBRI-44a, при которых не происходит роста культуры,

и рассчитывали как медиану значений, полученных в ходе двух независимых экспериментов.

**Анализ гемолитической активности и цитотоксичности пептида AmBRI-44a.** Способность АМП нарушать целостность эукариотических мембран оценивали в отношении эритроцитов здорового донора (hRBC) и трансформированных эмбриональных клеток почки человека (НЕК293Т), полученных из Института цитологии РАН.

К отобранной крови здорового донора для предотвращения свертывания добавляли цитратный буфер. В дальнейшем цельную кровь центрифугировали в растворе фиколла 400 и урографина (плотность 1.077 г/мл) в течение 15 мин при 500 g. Фракцию эритроцитов отбирали со дна и трижды промывали двадцатью объемами охлажденного фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7.4). Для теста в 96-луночном планшете готовили серии двукратных разведений исследуемого пептида от 64 до 2 мкМ (в пересчете на конечную концентрацию в лунке) в 0.1%-ном растворе БСА объемом 50 мкл. После этого к раствору пептида добавляли по 50 мкл 8%-ной суспензии эритроцитов в PBS. Суспензию эритроцитов инкубировали с пептидом AmBRI-44a в течение 1.5 ч при 37°C и 950 об/мин. После инкубации планшет центрифугировали 15 мин при 1000 g для осаждения интактных эритроцитов. Аликвоты супернатанта переносили в новый планшет и измеряли количество высвобождаемого гемоглобина при 405 нм. Суспензию эритроцитов в PBS и 0.1% тритон X-100 использовали в качестве отрицательного и положительного контроля соответственно.

Гемолитическую активность пептида AmBRI-44a рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Гемолиз (\%)} = \frac{(\text{OD}_{405}(\text{препарат}) - \text{OD}_{405}(\text{отриц. контроль}))}{(\text{OD}_{405}(\text{полож. контроль}) - \text{OD}_{405}(\text{отриц. контроль}))} \times 100.$$

Для оценки цитотоксического действия пептида AmBRI-44a проводили МТТ-тест, основанный на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать желтый реагент МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия) до нерастворимого в воде фиолетового кристаллического формазана. Клетки высаживали на 96-луночный планшет по  $10^4$  клеток на лунку в модифицированной среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). После инкубации в течение 24 ч культуральную жидкость заменяли свежей средой, в которой предварительно растворяли тестируемый

пептид AmBRI-44a. После 16 ч инкубации с пептидом в каждую лунку добавляли по 20 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) и инкубировали в течение 4 ч. Среду осторожно удаляли и добавляли в каждую лунку по 100 мкл смеси DMSO и этанола (1 : 1) для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность растворов измеряли при 570 нм с помощью микропланшетного ридера AF2200 (Eppendorf, Германия). Оптическую плотность раствора клеток без добавления пептидов принимали за 100% жизнеспособных клеток.

**Экспериментальная индукция бактериальной устойчивости к пептиду AmBRI-44a.** Возникновение устойчивости в отношении AmBRI-44a изучали методом последовательных пересевов бактериальной культуры *B. licheniformis* В-511 с использованием 96-луночных планшетов в жидкой среде Мюллера–Хинтон, содержащей исследуемый антимикробный пептид в концентрациях, полученных при двукратных серийных разведениях. Для приготовления стартового инокулята использовали чистую суточную культуру исследуемого штамма, выращенную на агаризованной питательной среде. При помощи бактериальной петли отбирали несколько отдельных колоний и инокулировали в пробирку объемом 15 мл, содержащую 6 мл жидкой питательной среды МНВ. Пробирку инкубировали при 37°C и постоянном перемешивании со скоростью 220 об/мин в течение 20 ч до достижения культурой стационарной фазы роста. Культуру разбавляли в 500 раз свежей двукратной средой МНВ, после чего аликвоты полученной бактериальной суспензии объемом 50 мкл добавляли к 50 мкл раствора пептида AmBRI-44a, серийно разведенного в 0.1% БСА в 96-луночном микропланшете (Eppendorf #0030730011). Планшет инкубировали при 37°C и интенсивном перемешивании со скоростью 950 об/мин в течение 22 ± 2 ч. Значения МИК определяли как наименьшую концентрацию тестируемого пептида AmBRI-44a, при которой отсутствует видимый рост бактерий. Далее ежедневно из лунки, содержащей пептид AmBRI-44a в субингибирующей концентрации, максимально близкой к МИК, отбирали 2 мкл бактериальной суспензии и разбавляли 1 мл свежей двукратной среды МНВ. Полученную суспензию добавляли аликвотами по 50 мкл в другой планшет к 50 мкл раствора тестируемого пептида, серийно разведенного в concentra-

циях от 0.25× до 16× текущих значений МИК. Пассажи повторяли в течение 27 сут, после чего производили три последовательных пересева полученного штамма на плотной среде Мюллера–Хинтон без добавления пептида AmBRI-44a.

**Анализ генетических полиморфизмов штамма бактерий *B. licheniformis* устойчивого к пептиду AmBRI-44a.** Секвенирование геномной ДНК штаммов *B. licheniformis* В-511, устойчивого к пептиду AmBRI-44a, а также контрольного штамма дикого типа было проведено компанией ООО “Биоспарк” (Троицк, Россия) на платформе Illumina MiSeq (США). Качество полученных парноконцевых прочтений (100 × 2) оценивали при помощи программы FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Прочтения с низким качеством, а также прочтения, содержащие последовательности адаптеров, отфильтровывали при помощи программы Trimmomatic (<https://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>), после чего проводили повторный контроль качества. Сборку генома контрольного штамма производили программой SPAdes (<https://cab.spbu.ru/software/spades/>) с использованием парных и непарных прочтений высокого качества. Качество сборки оценивали при помощи программы QUAST (<https://bioinf.spbau.ru/quast>). Структурную аннотацию генома контрольного штамма производили в программе Prokka (<https://github.com/kbaseapps/ProkkaAnnotation>). Для получения выравниваний прочтений ДНК устойчивого штамма на сборку генома контрольного штамма, а также для работы с данными выравниваниями использовали наборы инструментов BWA (<https://bio-bwa.sourceforge.net>) и SAMtools (<https://samtools.sourceforge.net>). Информацию о полиморфизмах штаммов получали при помощи программы VarScan (<https://varscan.sourceforge.net/>), полиморфизмы с долей в покрытии >0.9 рассматривали в качестве истинных.

**Анализ перекрестной устойчивости отобранного штамма *B. licheniformis* к конвенциональным антибиотикам и различным АМП.** Эффекты перекрестной устойчивости отобранного штамма *B. licheniformis* В-511 к различным антимикробным агентам были определены методом двукратных серийных разведений в стерильных 96-луночных плоскодонных полистироловых микропланшетах (Eppendorf #0030730011) в

среде Мюллера–Хинтон (МНВ; Sigma, США) в отсутствие 0.9% NaCl, как описано выше. Кателицидин LL-37 был получен методом твердофазного синтеза и любезно предоставлен М.Н. Жмаком (чистота > 98 %); тахиплезин-1 был получен биотехнологическим способом методом гетерологической экспрессии в бактериальной системе *E. coli*; низин (Sigma, США); ванкомицин (Appli-Chem, Германия); рифампицин (Sigma, США); тетрациклин (Sigma, США); гентамицин (Appli-Chem, Германия).

**Статистический анализ данных.** Все данные были получены не менее чем в двух независимых экспериментах не менее чем в двух повторностях и приведены с учетом стандартного отклонения. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Graphpad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.) и *t*-критерия Стьюдента, значения  $p < 0.05$  считали статистически значимыми.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе был обнаружен, получен биотехнологическим способом и исследован новый BRICHOS-ассоциированный антимикробный пептид AmBRI-44a из пескожила *Arenicola marina*, представляющий не выявленное ранее у полихет структурное семейство дефенсин-подобных пептидов, стабилизированных четырьмя дисульфидными связями. В результате исследования нами была выявлена и изучена специфическая активность пептида AmBRI-44a в отношении бактерий родов *Bacillus* и *Mycobacterium*, что представляет значительный интерес с фундаментальной точки зрения. Известно, что бациллы вырабатывают множество антимикробных соединений и входят в состав симбиотической микробиоты ряда морских беспозвоночных [29]. Одной из возможных функций AmBRI-44a и родственных ему пептидов может быть контроль видового состава микробиома, а не борьба с патогенами. Низкий уровень экспрессии гомологичного пептида AmIMP2 [18] может быть связан с особенностями его биосинтеза. Например, не исключен индуцибельный характер биосинтеза AmIMP2 и AmBRI-44a в ответ на наличие клеток-мишеней, что характерно для “узкоспециализированных” защитных пептидов беспозвоночных [1]. С точки зрения возможного механизма действия, селективность пептида в

отношении *Bacillus* и *Mycobacterium* может быть связана с особой структурой липида II у данных бактерий как потенциальной мишени AmBRI-44a: в отличие от большинства других грамположительных бактерий, третий аминокислотный остаток пентапептида у них представлен мезо-диаминопимелиновой кислотой (мезо-ДАПК, DAP) вместо L-лизина [34].

Полученные результаты открывают дальнейшие пути исследования обнаруженного нового семейства дефенсин-подобных BRICHOS-ассоциированных АМП полихет, в частности особый интерес вызывает проверка гипотезы об их механизме действия, связанном с ингибированием биосинтеза клеточной стенки. Подтверждение этого предположения может быть получено как с использованием биохимических подходов, так и методами молекулярного моделирования и структурной биологии. Не менее важно дальнейшее изучение вопроса о физиологической роли пептида AmBRI-44a и его локализации в организме пескожила *A. marina*.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00380, <https://rscf.ru/project/22-14-00380/>.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Кровь, использованная при оценке гемолитической активности пептида, была получена от здорового донора. Информированное согласие было получено в письменной форме.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы Т.В.О. и П.В.П. сформулировали концепцию статьи; В.Н.С., И.А.Б., П.В.П., Р.Н.К. и Е.И.Ф. выполнили экспериментальную часть работы; В.Н.С., П.В.П., Т.В.О. провели анализ полученных результатов, подготовили рукопись к публикации и осуществили ее редактирование.

Окончательный вариант статьи был утвержден всеми авторами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lazzaro B.P., Zasloff M., Rolff J. // *Science*. 2020. V. 368. P. eaau5480. <https://doi.org/10.1126/science.aau5480>
- Guryanova S.V., Ovchinnikova T.V. // *Mar. Drugs*. 2022. V. 20. P. 549. <https://doi.org/10.3390/md20090549>
- Guryanova S.V., Balandin S.V., Belogurova-Ovchinnikova O.Yu., Ovchinnikova T.V. // *Mar. Drugs*. 2023. V. 21. P. 503. <https://doi.org/10.3390/md21100503>
- Mora C., Tittensor D.P., Adl S., Simpson A.G., Worm B. // *PLoS Biol*. 2011. V. 9. P. e1001127. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>
- World Register of Marine Species. [www.marinespecies.org](http://www.marinespecies.org)
- Pantelev P.V., Tsarev A.V., Safronova V.N., Reznikova O.V., Bolosov I.A., Sychev S.V., Shenkarev Z.O., Ovchinnikova T.V. // *Mar. Drugs*. 2020. V. 18. P. 620. <https://doi.org/10.3390/md18120620>
- Ovchinnikova T.V., Aleshina G.M., Balandin S.V., Krasnosdembская A.D., Markelov M.L., Frolova E.I., Leonova Y.F., Tagaev A.A., Krasnodembsky E.G., Kokryakov V.N. // *FEBS Lett*. 2004. V. 577. P. 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.012>
- Pantelev P.V., Tsarev A.V., Bolosov I.A., Paramonov A.S., Marggraf M.B., Sychev S.V., Shenkarev Z.O., Ovchinnikova T.V. // *Mar. Drugs*. 2018. V. 16. P. 401. <https://doi.org/10.3390/md16110401>
- Metlev M., Osterman I.A., Ghilarov D., Khabibulina N.F., Yakimov A., Shabalin K., Utkina I., Travin D.Y., Komarova E.S., Serebryakova M., Artamonova T., Khodorkovskii M., Konevega A.L., Sergiev P.V., Severinov K., Polikanov Y.S. // *Nat. Chem. Biol*. 2017. V. 13. P. 1129–1136. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2462>
- Safronova V.N., Bolosov I.A., Kruglikov R.N., Korobova O.V., Pereskokova E.S., Borzilov A.I., Pantelev P.V., Ovchinnikova T.V. // *Mar. Drugs*. 2022. V. 20. P. 517. <https://doi.org/10.3390/md20080517>
- Presto J., Johansson J. // Springer International Publishing. 2015. P. 1–28. ISBN 978-3-319-16563-9.
- Leppert A., Poska H., Landreh M., Abelein A., Chen G., Johansson J.A. // *Protein Sci*. 2023. V. 32. P. e4645. <https://doi.org/10.1002/pro.4645>
- Bruno R., Boidin-Wichlacz C., Melnyk O., Zeppilli D., Landon C., Thomas F., Cambon M.-A., Lafond M., Mabrouk K., Massol F., Hourdez S., Maresca M., Jollivet D., Tasiemski A. // *Sci. Total Environ*. 2023. V. 879. P. 162875. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162875>
- Pantelev P.V., Safronova V.N., Duan S., Komlev A.S., Bolosov I.A., Kruglikov R.N., Kombarova T.I., Korobova O.V., Pereskokova E.S., Borzilov A.I., Dyachenko I.A., Shamova O.V., Huang Y., Shi Q., Ovchinnikova T.V. // *Mar. Drugs*. 2023. V. 21. P. 639. <https://doi.org/10.3390/md21120639>
- Graf M., Mardirossia M., Nguyen F., Seefeldt A.C., Guichard G., Scocchi M., Innis C.A., Wilson D.N. // *Nat. Prod. Rep*. 2017. V. 34. P. 702–711. <https://doi.org/10.1039/c7np00020k>
- Vetterli S.U., Zerbe K., Müller M., Urfer M., Mondal M., Wang S.-Y., Moehle K., Zerbe O., Vitale A., Pessi G., Eberl L., Wollscheid B., Robinson J.A. // *Sci. Adv*. 2018. V. 4. P. eaau2634. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau2634>
- Grein F., Schneide T., Sahl H.-G. // *J. Mol. Biol*. 2019. V. 431. P. 3520–3530. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.014>
- Stanovova M.V., Gazizova G.R., Gorbushin A.M. // *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol*. 2023. V. 340. P. 34–55. <https://doi.org/10.1002/jez.b.23135>
- Potter S.C., Luciani A., Eddy S.R., Park Y., Lopez R., Finn R.D. // *Nucleic Acids Res*. 2018. V. 46. P. W200–W204. <https://doi.org/10.1093/nar/gky448>
- Wang G., Li X., Wang Z. // *Nucleic Acids Res*. 2016. V. 44. P. D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>
- Slezina M.P., Odintsova T.I. // *Curr. Issues Mol. Biol*. 2023. V. 45. P. 3674–3704. <https://doi.org/10.3390/cimb45040239>
- Shenkarev Z.O., Pantelev P.V., Balandin S.V., Gizatullina A.K., Altukhov D.A., Finkina E.I., Kokryakov V.N., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2012. V. 429. P. 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.092>
- Pantelev P.V., Bolosov I.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. // *J. Pept. Sci*. 2015. V. 21. P. 105–113. <https://doi.org/10.1002/psc.2732>
- Rodríguez-Romero A., Arreguín B., Hernández-Arana A. // *Biochim. Biophys. Acta BBA – Protein Struct. Mol. Enzymol*. 1989. V. 998. P. 21–24. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(89\)90113-1](https://doi.org/10.1016/0167-4838(89)90113-1)
- Bruno R., Maresca M., Canaan S., Cavalier J-F., Mabrouk K., Boidin-Wichlacz C., Olleik H., Zeppilli D., Brodin P., Massol F., Jollivet D., Jung S., Tasiemski A. // *Mar. Drugs*. 2019. V. 17. P. 512. <https://doi.org/10.3390/md17090512>
- Letunic I., Khedkar S., Bork P. // *Nucleic Acids Res*. 2021. V. 49. P. D458–D460. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937>

27. Koo B.-M., Kritikos G., Farelli J.D., Todor H., Tong K., Kimsey H., Wapinski I., Galardini M., Cabal A., Peters J.M., Hachmann A.-B., Rudner D.Z., Allen K.N., Typas A., Gross C.A. // *Cell Syst.* 2017. V. 4. P. 291–305.e7.  
<https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.12.013>
28. Dubrac S., Bisicchia P., Devine K.M., Msadek T.A. // *Mol. Microbiol.* 2008. V. 70. P. 1307–1322.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06483.x>
29. Blockley A., Elliott D., Roberts A., Sweet M. // *Diversity.* 2017. V. 9. P. 49.  
<https://doi.org/10.3390/d9040049>
30. Kato A., Ueda S., Oshima T., Inukai Y., Okajima T., Igarashi M., Eguchi Y., Utsumi R. // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2017. V. 63. P. 212–221.  
<https://doi.org/10.2323/jgam.2016.10.007>
31. Watanabe, T., Igarashi M., Okajima T., Ishii E., Kino H., Hatano M., Sawa R., Umekita M., Kimura T., Okamoto S., Eguchi Y., Akamatsu Y., Utsumi R. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. V. 56. P. 3657–3663.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.06467-11>
32. Zhu J., Liu B., Shu X., Sun B. // *Int. J. Med. Microbiol. IJMM.* 2021. V. 311. P. 151473.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2021.151473>
33. Jaumaux F., Petit K., Martin A., Rodriguez-Villalobos H., Vermeersch M., Perez-Morga D., Gabant P. // *Antibiotics.* 2023. V. 12. P. 947.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12060947>
34. Vollmer W., Blanot D. de Pedro M.A. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2008. V. 32. P. 149–167.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
35. Provencher S.W., Glöckner J. // *Biochemistry.* 1981. V. 20. P. 33–37.  
<https://doi.org/10.1021/bi00504a006>
36. Mirdita M., Schütze K., Moriwaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M. // *Nat. Methods.* 2022. V. 19. P. 679–682.  
<https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
37. Baseri N., Najar-Peerayeh S., Bakhshi B. // *BMC Microbiol.* 2021. V. 21. P. 240.  
<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02298-9>

## Novel BRICHOS-Related Defensin-Like Antimicrobial Peptide from the Marine Polychaeta *Arenicola marina*

V. N. Safronova\*, P. V. Pantelev\*, R. N. Kruglikov\*, I. A. Bolosov\*,  
E. I. Finkina\*, and T. V. Ovchinnikova\*.<sup>#</sup>

<sup>#</sup>E-mail: ovch@ibch.ru

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

To date, polychaetes remain a poorly studied class of invertebrate animals in the context of clarification of their immune system functioning and, in particular, of antimicrobial peptides (AMPs) biodiversity. AMPs, also known as host defense peptides, play a key role in host protection from various pathogens and regulation of the species composition of symbiotic microbes. The study of biosynthesis of AMPs in polychaetes has revealed an interesting pattern, namely so-called BRICHOS domain in the precursor proteins of a number of such peptides. The conserved structure of this domain allows to perform a bioinformatic search for AMP precursors in polychaete transcriptomes. In this work, we found and studied a new BRICHOS-associated AMP from the lugworm *Arenicola marina*, which represents a structural family of defensin-like peptides stabilized by four disulfide bonds, not previously identified in marine worms. The peptide, designated as AmBRI-44a, contained 44 amino acid residues and was obtained by heterologous expression in *Escherichia coli*. AmBRI-44a was shown to have a specific activity against a narrow spectrum of Gram-positive bacteria and did not exhibit pronounced cytotoxic effects on eukaryotic cell line HEK293T. A potential mechanism of the antibacterial action of this peptide may be associated with inhibition of bacterial cell wall biosynthesis, as indicated by genetic and phenotypic analysis of selected AmBRI-44a-resistant bacteria *Bacillus licheniformis* B-511. The results obtained allow us to consider the novel peptide AmBRI-44a as a candidate compound for the development of an antibiotic agent that could potentially be effective in the treatment of infectious diseases mediated by multidrug-resistant Gram-positive bacteria.

*Keywords:* marine invertebrates, polychaeta, innate immunity, antimicrobial peptide, BRICHOS domain, antimicrobial resistance, whole genome sequencing



УДК 577.112.7

# БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА НА ПОВЕРХНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК КАК МИШЕНИ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

© 2024 г. А. О. Макарова<sup>\*,\*\*</sup>, В. В. Костенко<sup>\*,\*\*</sup>, О. В. Овсяникова<sup>\*,\*\*</sup>,  
Е. В. Свищевская<sup>\*</sup>, Г. В. Луценко<sup>\*</sup>, А. М. Сапожников<sup>\*,#</sup>

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

<sup>\*\*</sup> ФГБУ ВО “Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”,  
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

Поступила в редакцию 01.10.2023 г.

После доработки 14.10.2023 г.

Принята к публикации 15.10.2023 г.

Согласно данным ВОЗ, онкологические заболевания являются причиной смерти ~5 миллионов человек ежегодно. На сегодняшний день не существует универсального решения борьбы с раком, несмотря на выдающиеся достижения в области радиотерапии, химиотерапии и иммунотерапии. В связи с этим существует необходимость в разработке новых подходов к противоопухолевой терапии, в частности основанных на поиске и использовании таргетных молекул, позволяющих с высокой эффективностью убивать опухолевые клетки различного типа, не оказывая при этом значительного токсического воздействия на здоровые органы и ткани. В данном обзоре представлены характеристика основных белков семейства белков теплового шока (HSP), особенности их экспрессии в опухолевых клетках и возможности использования моноклональных антител к этим белкам в качестве направляющего вектора для противоопухолевой иммунотерапии.

*Ключевые слова:* белки теплового шока (HSP), моноклональные антитела, таргетированная доставка, онкология, противоопухолевая терапия

**DOI:** 10.31857/S0132342324030027, **EDN:** OAKNVU

## СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	219
2. ФУНКЦИИ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА	219
3. БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА КАК МАРКЕРЫ ОПУХОЛЕЙ	220
4. ТРАНСЛОКАЦИЯ HSP70 НА КЛЕТОЧНУЮ ПОВЕРХНОСТЬ	221
5. НАПРАВЛЕННАЯ ДОСТАВКА ПРЕПАРАТОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ ТКАНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛ К БЕЛКАМ ТЕПЛООВОГО ШОКА	223
6. ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СОБСТВЕННОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ К БЕЛКАМ ТЕПЛООВОГО ШОКА	224
7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	226
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	226

Сокращения: HSP – белок теплового шока; NK – натуральные киллеры; Treg – Т-клетки-регуляторы; IL – интерлейкин; mAb – моноклональные антитела; CD – кластеры дифференцировки; CTLA – белок цитотоксичных Т-клеток 4; HER2 – рецептор эпидермального фактора роста; ФС – фосфатидилсерин; VCMA – фактор созревания В-клеток; NPs – наночастицы; AuNPs – наночастицы золота; ПМП – переменное магнитное поле; PPTT – плазменная фототермическая терапия; AIF – флавопротеин, белок, активирующий апоптоз; ADD70 (150–228) – пептид AIF, распознающий HSP70; ADCC – антиген-зависимая цитотоксичность.

<sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-40-11; эл. почта: amsap@mail.ru).

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Таргетированная терапия рака на основе антител к маркерам, экспонированным преимущественно на мембране опухолевых клеток, имеет ряд преимуществ по сравнению с химиотерапией. Такие антитела могут оказывать прямое цитотоксическое действие, но наиболее перспективным является создание конъюгата или комплекса антитела с лекарственным средством. Структура антитела обеспечивает длительную циркуляцию такой пары в крови, доставляя цитотоксический препарат в опухоль. В настоящее время в США одобрено несколько таких конъюгатов. В частности, для терапии солидных опухолей таргетными молекулами являются рецептор эпидермального фактора роста HER2, рецептор тробластов *tror2*, молекула адгезии *nestin4* и др. [1]. Для терапии лимфом используют рецепторы, экспрессированные на лимфоидных и других гематологических клетках (CD19, CD22, CD33, CD30, BCMA, CD79b) [2].

Одним из таргетных маркеров солидных опухолей могут быть белки теплового шока (HSP), экспонированные на поверхности плазматической мембраны. Присутствие данных белков-маркеров на поверхности раковых клеток позволяет осуществлять доставку различных противоопухолевых препаратов. Адресная доставка противоопухолевых препаратов по данным мишеням универсальна для многих солидных опухолей, в том числе метастазирующих, и демонстрирует многообещающие результаты в комбинированной терапии.

Целью настоящей работы было обобщение данных по HSP как перспективной мишени для исследований и адресной доставки препаратов при противоопухолевой терапии.

## 2. ФУНКЦИИ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА

HSP осуществляют функцию молекулярных шаперонов, участвуя в конформационно правильном фолдинге синтезированных *de novo* белков, их транспортировке, а также в контроле за образованием белковых комплексов, что позволяет поддерживать клеточный протеостаз [3]. Воздействие различных стрессовых факторов (гипоксия, резкие температурные изменения, влияние активных форм кислорода и др.) приводит

к денатурации части внутриклеточных белков и к образованию токсичных белковых агрегатов [3–5]. Этим процессам противодействует система внутриклеточных молекулярных шаперонов, состоящая в основном из HSP, которые вовлечены в рефолдинг денатурированных белков и в убиквитин-зависимую протеасомную деградацию поврежденных белков. Для нормальных клеток характерна внутриклеточная локализация HSP. В опухолевых клетках HSP могут транслоцироваться на клеточную поверхность, однако причины и механизмы этого явления пока недостаточно хорошо изучены. Необычная поверхностная локализация HSP обнаружена у целого ряда опухолевых клеток разных типов, что позволяет отнести мембраноассоциированные HSP к опухолеспецифичным маркерам [6]. Наряду с этим зарегистрирована и внеклеточная форма HSP. Эти белки и антитела к ним детектируются в сыворотке крови, моче и других жидкостях организма. Роль мембраноассоциированных и внеклеточных HSP, а также механизмы их транслокации на клеточную поверхность и секреции во внеклеточную среду пока недостаточно ясны, но опухолеспецифичность этого явления привлекает в последние годы внимание исследователей, связанное с возможностью использования HSP для таргетированной доставки химиотерапевтических препаратов к опухолевым клеткам и для противоопухолевой иммунотерапии [7, 8].

HSP принято классифицировать в соответствии с их молекулярной массой. В качестве основных групп выделяют HSP с массой 110, 100, 90, 70, 60, 40 кДа и малые HSP. Механизмы функционирования HSP исследуются давно, но многие аспекты этих процессов остаются не до конца изученными [9–12].

К группе малых молекул HSP относятся белки с массой 12–43 кДа, осуществляющие свои внутриклеточные функции независимо от АТФ. Для выполнения своей шаперонной функции белок образует мультимерные комплексы. Наряду с этим HSP27 вовлечен в организацию цитоскелета и в реализацию программы апоптоза клетки [12]. HSP40 – кошаперон, играющий важную роль в транспорте белков к HSP70 и в регуляции его АТФазной активности. HSP60 – консервативный белок, выполняющий функцию фолдинга белков и контроля транспорта белков в митохондриях.

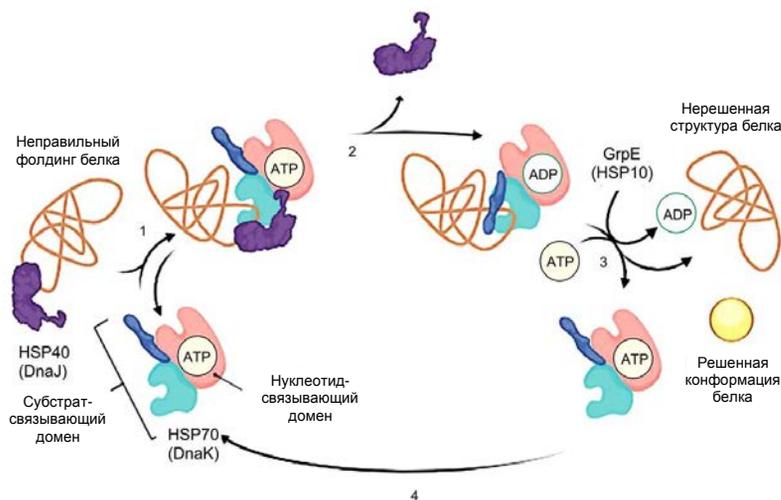
Присутствие HSP60 во внеклеточном пространстве может запускать аутоиммунные реакции и противоопухолевый адаптивный иммунный ответ [10]. HSP70 способствует синтезу и рефолдингу белков, сборке полипептидных цепей, препятствует агрегации белков, участвует в транспортировке и конечной деградации белков [13]. HSP70 связан с сигнальными путями митохондриального апоптоза и апоптоза по рецепторно-зависимому пути [14]. Подобно HSP27 и HSP70, семейство HSP90 ингибирует клеточный апоптоз и играет важную роль в сворачивании, стабилизации, активации и протеолитической деградации белков [9]. Как правило, HSP выполняют шаперонные функции совместно. В частности, функции HSP70 осуществляются при участии HSP40 и HSP10 (рис. 1) [15].

HSP70 имеет в своем составе два функциональных домена: нуклеотид-связывающий домен (NBD) на *N*-концевом сегменте и субстрат-связывающий домен (SBD), располагающийся ближе к *C*-концу [16]. На *C*-концевом домене локализована последовательность TKDNNLLGRFELSG (TKD), включающая 450–461 а.о. [17]. Иммунизация мышей пептидом TKD индуцировала образование антител HSP70.1, способных связываться с HSP70 на мембране клеток благодаря достаточно открытому расположению *C*-конца шаперона на поверхности плазматической мембраны. Таким

образом, мембрана опухолевых клеток, несущая HSP70, может служить структурой-мишенью для специфичных антител, способных точно доставлять терапевтические препараты к раковым клеткам или стимулирующих противоопухолевую активность иммунной системы организма.

### 3. БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА КАК МАРКЕРЫ ОПУХОЛЕЙ

Уровень экспрессии белков теплового шока может отражать динамику развития опухолевого процесса и имеет характерные особенности для каждого конкретного типа рака (табл. 1). Была выявлена сверхэкспрессия белков семейства HSP40 при многочисленных типах рака человека, в том числе при колоректальном раке, раке желудка и легких [18]. Повышенная экспрессия HSP60 при различных видах рака способна как стимулировать развитие опухоли (рак яичников, глиобластома и др.), так и супрессировать ее (гепатоцеллюлярная карцинома), что говорит о возможности использования этого белка для онкодиагностики и онкотерапии [12]. Сверхэкспрессию HSP70 часто связывают с метастазированием и инвазивностью при плоскоклеточном раке головы и шеи, остром миелоидном лейкозе у детей, раке молочной железы и колоректальном раке. Значительный уровень экспрессии HSP70 может служить опухолеспецифичным маркером высокоагрес-



**Рис. 1.** Механизм рефолдинга белковых структур с помощью HSP70. HSP40 (DnaJ), содержащий J-домен, транспортирует неправильно свернутый белок (субстрат) к HSP70 (1); HSP40 запускает гидролиз ATP и конформационные изменения в структуре HSP70, стабилизируя связи между субстратом и HSP70 (2); фактор обмена нуклеотидов GrpE (HSP10) участвует в нуклеотидном обмене в молекуле HSP70 (3); высвободившийся субстрат либо приходит к своей нативной конформации (решенная конформация) (4), либо его структура оказывается неразрешенной (нерешенная), и, снова связываясь с HSP70, белок отправляется на рефолдинг [15].

**Таблица 1.** Функции различных классов белков теплового шока (HSP) и возможность их использования в качестве маркеров при некоторых онкологических заболеваниях

Молекулярная масса, кДа	Функции	Повышенная экспрессия при раке	Ссылки
10	Восстановление конформации белков до нативной структуры, контроль активности ферментов, участие в запуске ответа на повреждение	Маркер астроцитомы и рака легких, участвует в иммуномодуляции и прогрессировании опухоли	[10, 18]
27	Апоптоз, реорганизация клеточной структуры микрофиламентов	Острый миелоидный лейкоз у детей, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак молочной железы и колоректальный рак	[10]
40	Связывание и транспорт белка, регуляция АТФазной активности HSP70	Колоректальный рак, рак желудка, рак легких	[9, 10, 12]
60	Фолдинг митохондриальных белков, участие в транспорте внутрь органеллы, в случае внеклеточной локализации HSP60 индуцирует врожденный и адаптивный противораковый иммунитет	Повышенная экспрессия данного белка в зависимости от типа заболевания может как стимулировать развитие опухоли (рак яичников, глиобластома и др.), так и супрессировать ее (гепатоцеллюлярная карцинома)	[9, 10, 12]
70	Фолдинг белков, поддержание протеостаза при повышенных температурах, поддержание в развернутой форме митохондриальных белков после трансляции	Первичные глиобластомы, плоскоклеточный рак головы и шеи, немелкоклеточный рак, дисплазия полости рта человека, плоскоклеточный рак колоректальный рак, рак желудка, рак поджелудочной железы, остеосаркома, острый миелогенный лейкоз. Сверхэкспрессируется в высокоагрессивных опухолевых клетках и, таким образом, может служить опухолеспецифичным маркером агрессивного течения заболевания и/или устойчивости к терапии	[9, 10, 12, 17, 19]
90	Поддержание структуры некоторых рецепторов и факторов транскрипции	Сверхэкспрессия ассоциируется с неблагоприятным прогнозом при множественных опухолях (холангиокарцинома, глиобластома, рак легких, желудка, молочной и предстательной желез и др.)	[9]
100	Дезагрегация белка (HSP110 высвобождает ADP из HSP70 после взаимодействия с белком), поддержание протеостаза при повышенных температурах	Может являться маркером рака легких и рака молочной железы	[20–22]

сивной опухоли [9, 10, 12]. Повышенная экспрессия HSP90 может указывать на неблагоприятный прогноз при различных типах опухолевых заболеваний, например, при холангиокарциноме, глиобластоме, раке легких, желудка, молочной и предстательной желез [9].

#### 4. ТРАНСЛОКАЦИЯ HSP70 НА КЛЕТОЧНУЮ ПОВЕРХНОСТЬ

Транслокация HSP на поверхность опухолевых клеток зарегистрирована при многих типах рака [19–22]. Транслокация HSP, в частности HSP70, на поверхность плазматической мембраны и сек-

реция во внешнюю среду осуществляется за счет альтернативного везикулярного транспорта без участия комплекса Гольджи [23], т.к. добавление монензина или колхицина, ингибиторов общего секреторного пути, к клеткам, подвергшимся тепловому шоку, не ингибирует высвобождение шаперонов [22]. Классический путь секреции белков предполагает наличие определенного пептидного сигнала, однако он не обнаружен у большинства HSP. Ингибитор данного пути, брэфелдин А, также не оказывает влияния на высвобождение HSP70 из клеток. По-видимому, кроме высвобождения HSP70 в составе везикул, возможны и другие пути нестандартной белковой секреции, например, с помощью ABC-транспортёров или опосредованно через поры [24]. Однако на высвобождение белка оказывает влияние метил- $\beta$ -циклодекстрин – препарат, разрушающий липидные микродомены [25]. Глобозилтриаозилцерамид (Gb3), компонент обогащенных холестеринем липидных рафтов, локализованных на плазматической мембране, редко встречается на нормальных клетках, однако часто присутствует на опухолевых. Значительно большее количество Gb3 на поверхностях HSP70-положительных раковых линий клеток по сравнению с HSP70-отрицательными отражает факт взаимодействия этого белка с Gb3 на поверхности мембраны [26]. Кроме этого, мембранная форма HSP70, связанная с фосфатидилсеринем (ФС) [27], обнаружена на внешней стороне плазматической мембраны раковых клеток, подвергшихся гипоксии. В норме ФС располагается на внутренней стороне мембраны, что поддерживается группой ферментов, таких как АТФ-зависимые флипазы [28], а также флопазы и кальций-зависимые скремблазы. Однако в условиях стресса ФС одновременно с HSP70 транслоцируется на наружную поверхность клетки [29]. Интересно, что кроме воздействия классических факторов стресса появлению эндогенного HSP70 на внешней плазматической мембране также способствовало введение экзогенного рекомбинантного HSP70 в среду [30]. Вероятно, мембранные HSP70 и введенные экзогенно способны связываться друг с другом за счет белок-белковых взаимодействий [31].

HSP70 способен активировать клетки врожденного и адаптивного иммунитета [6] как находясь во внеклеточном пространстве, так и будучи связанным с мембраной опухолевой клетки [32]. Показано, что HSP70 индуцирует созревание

дендритных клеток, экспрессию этими клетками костимуляторных молекул CD40, CD86, CD80 и синтез провоспалительных цитокинов IL-6, TNF- $\alpha$  и IL-12p40, а также повышает способность к представлению антигена Т-клеткам в результате кросс-презентации [33]. Внеклеточный HSP70 значительно повышает уровень экспрессии провоспалительных цитокинов в клетках моноцитов и макрофагов через активацию сигнального пути Toll-подобных рецепторов 2 и 4, а также активирует нейтрофилы и способствует секреции ими активных форм кислорода [34]. Однако существенное число опубликованных работ свидетельствует о противоположном – противовоспалительном действии внеклеточного HSP70 на клетки иммунной системы. В частности, с использованием моноцитарной линии клеток и нейтрофилов человека было продемонстрировано снижение синтеза TNF- $\alpha$  и продукции активных форм кислорода при воздействии на эти клетки липополисахаридом [35, 36]. Таким образом, литературные данные свидетельствуют о возможности разнонаправленного действия внеклеточной формы HSP70 на клетки иммунной системы.

Рядом авторов установлено, что HSP70 вовлечен в процессы опухолеобразования. Было показано, в частности, что высвобождаемый опухолевыми клетками внеклеточный пул этого белка способен подавлять адаптивный иммунный ответ за счет супрессии макрофагального звена [37]. С другой стороны, в литературе есть сведения, показывающие подавление роста глиобластомы крыс при введении экзогенного рекомбинантного HSP70 [38]. Продемонстрировано также, что внеклеточный HSP70 и экспонированный на мембране клеток HSP70 стимулируют противоопухолевую активность NK-клеток, усиливая их миграцию, пролиферацию и цитолитическую активность [39]. Введение *ex vivo* HSP70 в комбинации с IL-2 приводило к выраженной активации NK-клеток [40]. CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клетки, в свою очередь, тоже способны формировать противоопухолевый ответ под действием HSP70. Введение в раковые клетки путем трансфекции гена, кодирующего HSP70, приводило к активации Т-клеточного иммунитета и подавлению роста опухоли [33]. С другой стороны, HSP70 способны индуцировать поляризацию ассоциированных с опухолью макрофагов с M2- на M1-тип, стимулируя противоопухолевый иммунитет [41]. Кроме того, экспо-

нированный на мембране клеток HSP70 активирует формирование регуляторных Т-клеток (Трег), подавляющих развитие воспаления [42, 43].

#### 5. НАПРАВЛЕННАЯ ДОСТАВКА ПРЕПАРАТОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ ТКАНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛ К БЕЛКАМ ТЕПЛОВОГО ШОКА

К настоящему времени доказана высокая эффективность противоопухолевых терапевтических препаратов на основе моноклональных антител (mAb) к специфическим эпитомам, таким как ипилимумаб (mAb к CTLA-4), трастузумаб (mAb к HER2) и ритуксимаб (mAb к CD20). Есть несколько коммерчески доступных mAb к различным эпитомам HSP70, преимущественно к С-концевой части [44], которые можно использовать для направленной доставки лекарств к опухолевым клеткам, экспонирующим этот белок на своей поверхности, для диагностики и терапии опухолей.

В качестве носителя терапевтических препаратов широкое применение нашли наночастицы (NPs), в частности магнитные NPs на основе железа, никеля, кобальта и соответствующих им оксидов (магнетит  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , гематит  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  и маггемит  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  и  $\text{B-Fe}_2\text{O}_3$ ), которые характеризуются высокой чувствительностью к внешнему магнитному полю. Наибольшей эффективностью обладают суперпарамагнитные NPs, в частности на основе оксида железа SPIONs. За счет своих характеристик они позволяют доставлять лекарства в опухолевые клетки, визуализировать опухоль и метастазы [45]. Покрытие данных частиц моноклональными антителами против HSP70 позволило усилить противоопухолевый эффект в модели глиомы крыс [46]. Содержание комплекса SPIONs–mHSP70.1 внутри опухолевых клеток глиомы С6 у крыс в 7 раз превышало накопление по сравнению со NPs без покрытия. Поглощение клетками NPs, связанных с антителами против HSP70, еще усилилось после воздействия однократного ионизирующего излучения [47].

Усилить противоопухолевый эффект магнитных NPs позволяет комбинированная терапия, использующая дополнительно переменное магнитное поле (ПМП). ПМП способствует нагреванию NPs за счет механизмов релаксации или процессов гистерезиса, что зависит от размера наноструктуры [48]. Данный вид терапии называется ПМП-опосредованная гипертермия; она позволяет с

уменьшенными побочными эффектами уничтожать раковые клетки путем их нагрева. Комбинированное лечение с использованием магнитных NPs и последующим их нагреванием за счет ПМП в сочетании с лучевой терапией при лечении пациентов с глиобластомой и раком предстательной железы продемонстрировало перспективность дальнейшего развития данного подхода для борьбы с раком [49, 50].

NPs золота (AuNPs) характеризуются повышенной биосовместимостью и широко используются для доставки терапевтических препаратов в опухоль, диагностики, визуализации, а также фототермической и фотодинамической терапии [46, 51, 52]. Аналогично NPs на основе железа, покрытие золотых NPs антителами против HSP70 (HSP70.1) обеспечивало значительное повышение их поглощения раковыми клетками в сравнении с NPs с изотипическими антителами IgG1 или без покрытия, что было показано как *in vitro*, так и на модели глиомы крыс *in vivo*. Данные частицы через 24 ч локализовались в околядерной области [53].

Если для магнитных NPs было обосновано применение ПМП, то введение AuNPs сочетается с использованием рентгеновского излучения или плазмонной фототермической терапии (PPTT). Показано, что действие рентгеновского излучения на опухолевые клетки с поглощенными AuNPs приводит к увеличению числа разрывов двухцепочечной ДНК за счет образования низкоэнергетических вторичных электронов и к окислительному стрессу [54, 55]. В случае PPTT лазер с длиной волны, близкой к плазмонной, осуществляет нагрев AuNPs, что приводит к повреждению опухолевых клеток без вреда для окружающих здоровых тканей. Однако в экспериментах на трех линиях эпителиальных раковых клеток (полости рта, молочной железы и печени) было показано, что апоптозу в значительной мере подвержены только клетки со сниженным содержанием HSP70 [56]. При использовании ингибитора HSP70 апоптоз наблюдался во всех трех линиях клеток, что связано с подавлением протективного эффекта шаперона. Таким образом, была продемонстрирована перспективность использования сочетания нацеливания на поверхностные HSP70 опухолевых клеток с ингибированием в этих клетках шаперонной функции данного белка.

Кроме использования полноразмерных mAb к HSP70 широкое применение в области терапии опухолей нашли молекулы меньшего размера, такие как миниантитела и пептиды, демонстрирующие более короткие периоды циркуляции в крови, быстрый клиренс в организме, благоприятное биораспределение и лучшую способность проникновения в раковые клетки по сравнению с антителами. Функционально обосновано использование синтезированного 14-мерного TKD-пептида, входящего в состав C-домена HSP70 и обеспечивающего эффективное связывание пептида с мембранной формой HSP70 [57]. Мембранный шаперон, в свою очередь, быстро метаболизируется в составе эндосомы, что позволяет TKD локализоваться внутри опухоли. TKD не вызывает иммунного ответа, поскольку является последовательностью эндогенного HSP70 и может безопасно вводиться многократно. Однако есть работы, показывающие, что иммунизация мышей TKD приводит к развитию антителозависимой клеточной цитотоксичности [17, 19].

Отдельные противоопухолевые вещества могут доставляться mAbs антителами не только в составе NPs, но и конъюгированные с лекарственным средством. Например, mAb мыши ML30 к HSP65, конъюгированные с сапорином-6 (белком, инактивирующим рибосомы), практически полностью ингибировали клеточную пролиферацию линий U937 и Daudi, экспрессирующих HSP65 на своей поверхности [58].

Системы направленной доставки препаратов приведены в табл. 2 [59–73]. Антителами можно декорировать липосомы, различные носители на основе биополимеров, NPs различного состава или использовать их в сочетании с химиопрепаратами.

Появление HSP70 на мембране выявляется на клетках рака полости рта [74], толстой кишки [75] и ряде других. Нацеливание на мембраноассоциированные HSP70 может обеспечить новую стратегию в иммунотерапии рака. Известно, что количество мембранного HSP70 может составлять до 10% от внутриклеточного пула опухолевой клетки [40]. Появление HSP на мембране клеток означает повышение и внутриклеточного пула этих белков, что напрямую связано с эффективной работой шаперонов в клетках. Подавление шаперонной функции HSP способствует замедлению роста опухолевых клеток и, в ряде

случаев, их гибели. В связи с этим одним из направлений противоопухолевой терапии является использование различных молекул, подавляющих протективную активность HSP. В частности, было показано, что нейтрализующий пептид ADD70, содержащий домен фактора, индуцирующего апоптоз и взаимодействующий с HSP70, повышает чувствительность клеток рака толстой кишки крысы и клеток меланомы мыши к апоптозу, индуцируемому цисплатином [76]. Пифитрин- $\mu$  блокирует ассоциацию HSP70 с кошапероном HSP40. Комбинированное лечение пифитрином- $\mu$  и оксалиплатином значительно усиливало цитотоксический эффект оксалиплатина против клеток толстой кишки и предстательной железы человека в культуре *in vitro* [77]. MAL3-101, аллостерический ингибитор HSP70, блокирующий АТФазную активность нуклеотид-связывающего домена, эффективно подавлял пролиферацию клеток рака молочной железы, множественной миеломы, карциномы Меркеля, рака толстой кишки и др. [78, 79]. Другие ингибиторы HSP70 (танеспимицин, MKT-077) также эффективно усиливают противоопухолевое действие химиопрепаратов [80–83].

Помимо адресной доставки NPs и различных терапевтических препаратов в опухолевые клетки еще одним преимуществом использования mAb против HSP70 является их способность активировать противоопухолевую клеточную цитотоксичность (ADCC).

## 6. ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СОБСТВЕННОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ К БЕЛКАМ ТЕПЛОВОГО ШОКА

Введение мышам с раком толстой кишки СТ26 антител smHSP70.1, специфичных к TKD, способствовало уничтожению раковых клеток, экспрессирующих HSP70 на мембране, и ингибированию роста опухоли за счет активации ADCC, сопровождающейся инфильтрацией гранулоцитов, NK-клеток и макрофагов и повышением их миграционной и цитолитической активности [17, 72]. По данным авторов другие антитела против HSP70, в частности SPA810, Oх7.11 или Fab-фрагмент HSP70.1, не демонстрировали аналогичного противоопухолевого эффекта. Использование комбинированного метода лечения, основанного,

Таблица 2. Системы доставки противоопухолевых препаратов

Системы доставки	Особенности	Примеры использования	Ссылки
mAb	Воздействуют на клетку, помимо антигенсвязывающего фрагмента имеют лекарственную, токсическую или радиокомпоненту	Многочисленные онкопрепараты, диагностика	[59]
Липосомы	Обладают высокой способностью проникать сквозь клеточные мембраны и доставлять препараты без потери фармакологических свойств	Свыше 20 препаратов применяется в клинической практике: доксорубицин Doxil/Caelyx для терапии метастатического рака молочной железы; липосомы с mAb к HER2	[60–62]
Нановезикулы и наночастицы	Возможность задавать необходимые физико-химические свойства, способные приводить к местному тканевому ацидозу, гипертермии и сдвигу окислительно-восстановительного потенциала	Протестированы препараты с азидотимидином на клетках рака молочной железы, используются технологии молекулярного импринтинга и нанесение магнитного нанослоя Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> для управления проникновением в опухолевые ткани	[63–65]
Наночастицы золота	Возможность регулировать форму, размер, электронные, оптические, физико-химические и плазмонные характеристики	Полиакриламидные гибридные наногели, содержащие наночастицы золота, модифицированные метотрексатом, используются в химиотерапии рака молочной железы	[66–68]
Полимеры	Обладают биологической и функциональной совместимостью и способностью к деградации. Комбинация препарата с полимерами значительно снижает токсическое воздействие на здоровые клетки, поскольку последним тяжелее захватить связанный полимером препарат	Связанный с альбумином паклитаксел (абраксан) был одобрен в США для лечения метастатического рака молочной железы и успешно зарекомендовал себя в клинической практике	[69]
Нанодендримеры	Полимеры с сильно разветвленной древообразной структурой, обладающие высокой упорядоченностью, поливалентностью, способностью к самосборке, химической стабильностью, низкой цитотоксичностью и растворимостью	Использование в качестве носителей лекарственных средств не привело к заметному прогрессу в клинике, несмотря на масштабное финансирование. Одно из главных ограничений – низкая разлагаемость в физиологической среде, что приводит к серьезным побочным эффектам, вызванным накоплением искусственных макромолекул внутри клеток и в тканях	[70–72]
Золотые наночастицы, декорированные mAb	Функционализация поверхности частиц биополимерами существенно повышает их таргетные свойства, снижая риск развития побочных эффектов, увеличивая терапевтическую активность	Активно исследуются и проходят клинические испытания, также могут использоваться в диагностике	[72, 73]

например, на применении радиохимиотерапии, увеличивающей поверхностную концентрацию HSP70 на раковых клетках, и иммунотерапии с применением mAb cmHSP70.1 представляется перспективной областью для дальнейших клинических исследований.

Однако ряд исследований mAb против HSP70 демонстрирует ингибирование ими NK-клеточной противоопухолевой активности при условии связывания данных антител с внеклеточной C-концевой областью шаперона, принципиальной для узнавания HSP70 NK-клет-

ками [44, 73]. В таком случае имеет смысл иммунизация, например, пептидом ТКД, который способен стимулировать пролиферативную и цитолитическую способность НК-клеток. Для изучения влияния предварительной активации клеток селезенки на уничтожение mHSP70-положительных опухолевых клеток карциномы мышцы СТ26 *in vitro* была введена комбинация ТКД/IL-2, что привело к значительному увеличению количества CD49b<sup>+</sup>-НК-клеток и CD25<sup>+</sup>-клеток и способствовало лизису опухолевых клеток [72].

Исходя из данных по способности некоторых mAb против HSP70 активировать клеточную цитотоксичность, встает вопрос о возможности индуцирования ими системы комплемента для подавления опухолей. Известно, что внеклеточный HSP70, являясь сигналом стресса, может самостоятельно активировать систему комплемента [84]; то же самое относится и к аутоантителам против HSP при атеросклерозе [85]. Антитела BD091, узнающие C-концевой домен поверхностных HSP70, аналогично аутоантителам, образующимся при атеросклерозе, активировали систему комплемента и клеточную цитотоксичность под действием липопротеинов низкой плотности, что приводило к развитию аутоиммунного заболевания и лизису HSP70-положительных клеток крысы. В то же время mAbs SPA-810 к HSP70, узнающие другой эпитоп, не демонстрировали аналогичный эффект [85].

## 7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Белки теплового шока, появляющиеся на поверхности опухолевых клеток при некоторых формах рака, могут являться мишенью для целевой доставки различных противоопухолевых препаратов. Антителами к мембраноассоциированным HSP декорируют различные носители (наночастицы, липосомы). Низкомолекулярные ингибиторы, подавляющие функциональную активность HSP, используются в комбинации с цитотоксическими препаратами, что усиливает действие терапевтических молекул за счет подавления шаперонной функции HSP в опухолевых клетках. Использование полноразмерных антител к HSP (в том числе к HSP70) и их фрагментов – перспективный подход к таргетированной доставке терапевтических препаратов к солидным опухолям.

В настоящий момент в клинике используется ограниченное количество маркеров опухолей различной локализации. Расширение спектра опухолевых маркеров и их сочетание может оказаться эффективным подходом к терапии рака.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-15-00472).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящий обзор не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fu Z., Li S., Han S., Shi C., Zhang Y.* // Signal Transduct. Target Ther. 2022. V. 7. P. 93.  
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-00947-7>
2. *Beck A., Goetsch L., Dumontet C., Corvaia N.* // Nat. Rev. Drug. Discov. 2017. V. 16. P. 315–337.  
<https://doi.org/10.1038/nrd.2016.268>
3. *Richter K., Haslbeck M., Buchner J.* // Mol. Cell. 2010. V. 40. P. 253–266.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.006>
4. *Mertz-Henning L.M., Pegoraro C., Maia L.C., Venske E., Rombaldi C.V., Costa de Oliveira A.* // Genet. Mol. Res. 2016. V. 15. P. gmr.15027954.  
<https://doi.org/10.4238/gmr.15027954>
5. *Cedraz H., Gromboni J.G.G., Garcia A.A.P., Jr., Farias Filho R.V., Souza T.M., Oliveira E.R., Oliveira E.B., Nascimento C.S.D., Meneghetti C., Wenceslau A.A.* // PLoS One. 2017. V. 12. P. e0186083.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186083>
6. *Taha E.A., Ono K., Eguchi T.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 4588.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20184588>
7. *García Lorenzo J., León Vintrol X., Camacho Pérez de Madrid M.* // Acta Otorrinolaringol. Esp. 2016. V. 67. P. 130–134.  
<https://doi.org/10.1016/j.otorri.2015.03.002>
8. *Minnaar C.A., Szasz A.* // Cells. 2022. V. 11. P. 1838.  
<https://doi.org/10.3390/cells11111838>
9. *Youness R.A., Gohar A., Kiriacos C.J., El-Shazly M.* // Adv. Exp. Med. Biol. 2023. V. 1409. P. 193–203.  
[https://doi.org/10.1007/5584\\_2022\\_736](https://doi.org/10.1007/5584_2022_736)
10. *Lianos G.D., Alexiou G.A., Mangano A., Mangano A., Rauseri S., Boni L., Dionigi G., Roukos D.H.* // Cancer Lett. 2015. V. 360. P. 114–118.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.02.026>

11. Wu J., Liu T., Rios Z., Mei Q., Lin X., Cao S. // Trends Pharmacol. Sci. 2017. V. 38. P. 226–256. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.11.009>
12. Yun C.W., Kim H.J., Lim J.H., Lee S.H. // Cells. 2019. V. 9. P. 60. <https://doi.org/10.3390/cells9010060>
13. Fernández-Fernández M.R., Gragera M., Ochoa-Ibarrola L., Quintana-Gallardo L., Valpuesta J.M. // FEBS Lett. 2017. V. 591. P. 2648–2660. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12751>
14. Havalová H., Ondrovičová G., Keresztesová B., Bauer J.A., Pevala V., Kutejová E., Kunová N. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 8077. <https://doi.org/10.3390/ijms22158077>
15. Stangl S., Gehrmann M., Riegger J., Kuhs K., Riederer I., Sievert W., Hube K., Mocikat R., Dreschel R., Kremmer E., Pockley A.G., Friedrich L., Vigh L., Skerra A., Multhoff G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 733–738. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016065108>
16. Liu Q., Liang C., Zhou L. // Protein Sci. 2020. V. 29. P. 378–390. <https://doi.org/10.1002/pro.3725>
17. Fan W., Fan S.S., Feng J., Xiao D., Fan S., Luo J. // PLoS One. 2017. V. 12. P. e0185563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185563>
18. Shiber A., Ravid T. // Biomolecules. 2014. V. 4. P. 704–724. <https://doi.org/10.3390/biom4030704>
19. Werner C., Stangl S., Salvermoser L., Schwab M., Shevtsov M., Xanthopoulos A., Wang F., Dezfouli A.B., Thölke D., Ostheimer C., Medenwald D., Windberg M., Bache M., Schlapschy M., Skerra A., Multhoff G. // Cancers. 2021. V. 13. P. 3706. <https://doi.org/10.3390/cancers13153706>
20. Zolkiewski M., Zhang T., Nagy M. // Arch. Biochem. Biophys. 2012. V. 520. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.01.012>
21. Wang X.Y., Subjeck J.R. // Int. J. Hyperthermia. 2013. V. 29. P. 364–375. <https://doi.org/10.3109/02656736.2013.803607>
22. Hightower L.E., Guidon P.T., Jr. // J. Cell Physiol. 1989. V. 138. P. 257–266. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041380206>
23. Mambula S.S., Calderwood S.K. // J. Immunol. 2006. V. 177. P. 7849–7857. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.7849>
24. Li D.Y., Liang S., Wen J.H., Tang J.X., Deng S.L., Liu Y.X. // Molecules. 2022. V. 27. P. 2361. <https://doi.org/10.3390/molecules27072361>
25. Broquet A.H., Thomas G., Masliah J., Trugnan G., Bachelet M. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 21601–21606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302326200>
26. Gehrmann M., Liebisch G., Schmitz G., Anderson R., Steinem C., De Maio A., Pockley G., Multhoff G. // PLoS One. 2008. V. 3. P. e1925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001925>
27. Bilog A.D., Smulders L., Oliverio R., Labanieh C., Zapanta J., Stahelin R.V., Nikolaidis N. // Biomolecules. 2019. V. 9. P. 152. <https://doi.org/10.3390/biom9040152>
28. Pomorski T., Holthuis J.C., Herrmann A., van Meer G. // J. Cell Sci. 2004. V. 117. P. 805–813. <https://doi.org/10.1242/jcs.01055>
29. Schilling D., Gehrmann M., Steinem C., De Maio A., Pockley A.G., Abend M., Molls M., Multhoff G. // FASEB J. 2009. V. 23. P. 2467–2477. <https://doi.org/10.1096/fj.08-125229>
30. Shevtsov M.A., Komarova E.Y., Meshalkina D.A., Bychkova N.V., Aksenov N.D., Abkin S.V., Margulis B.A., Guzhova I.V. // Oncotarget. 2014. V. 5. P. 3101–3114. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1820>
31. Benaroudj N., Ebel C., Ladjimi M.M. // Eur. J. Biochem. 1999. V. 259. P. 379–384. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00053.x>
32. Rafiee M., Kanwar J.R., Berg R.W., Lehnert K., Lisowska K., Krissansen G.W. // Cancer Gene Ther. 2001. V. 8. P. 974–981. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700395>
33. Bethke K., Staib F., Distler M., Schmitt U., Jonuleit H., Enk A.H., Galle P.R., Heike M. // J. Immunol. 2002. V. 169. P. 6141–6148. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6141>
34. Luo H., Yang H., Lin Y., Zhang Y., Pan C., Feng P., Yu Y., Chen X. // Oncotarget. 2017. V. 8. P. 98455–98470. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21427>
35. Yurinskaya M.M., Kochetkova O.Y., Shabarchina L.I., Antonova O.Y., Suslikov A.V., Evgen'ev M.B., Vinokurov M.G. // Cell Stress Chaperones. 2017. V. 22. P. 163–171. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0743-z>
36. Evgen'ev M.B. // Cell Stress Chaperones. 2021. V. 26. P. 617–627. <https://doi.org/10.1007/s12192-021-01219-z>
37. Komarova E.Y., Marchenko L.V., Zhakhov A.V., Nikotina A.D., Aksenov N.D., Suezov R.V., Ischenko A.M., Margulis B.A., Guzhova I.V. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 21. P. 59–77. <https://doi.org/10.3390/ijms21010059>

38. Shevtsov M.A., Pozdnyakov A.V., Mikhrina A.L., Yakovleva L.Y., Nikolaev B.P., Dobrodumov A.V., Meshalkina D.A., Ischenko A.M., Pitkin E., Guzhova I.V., Margulis B.A. // *Int. J. Cancer*. 2014. V. 135. P. 2118–2128. <https://doi.org/10.1002/ijc.28858>
39. Lobinger D., Gempt J., Sievert W., Barz M., Schmitt S., Nguyen H.T., Stangl S., Werner C., Wang F., Wu Z., Fan H., Zanth H., Shevtsov M., Pilz M., Riederer I., Schwab M., Schlegel J., Multhoff G. // *Front. Mol. Biosci.* 2021. V. 8. P. 669366. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.669366>
40. Krause S.W., Gastpar R., Andreesen R., Gross C., Ullrich H., Thonigs G., Pfister K., Multhoff G. // *Clin. Cancer Res.* 2004. V. 10. P. 3699–3707. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0683>
41. Kaczmarek M., Lagiedo M., Masztalerz A., Kozłowska M., Nowicka A., Brajer B., Batura-Gabryel H., Sikora J. // *Immunobiology*. 2018. V. 223. P. 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.025>
42. Tukaj S., Sitko K. // *Biomolecules*. 2022. V. 12. P. 1153. <https://doi.org/10.3390/biom12081153>
43. Wachstein J., Tischer S., Figueiredo C., Limbourg A., Falk C., Immenschuh S., Blaszczak R., Eiz-Vesper B. // *PLoS One*. 2012. V. 7. P. e51747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051747>
44. Botzler C., Li G., Issels R.D., Multhoff G. // *Cell Stress Chaperones*. 1998. V. 3. P. 6–11. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(1998\)003<0006:doeleo>2.3.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(1998)003<0006:doeleo>2.3.co;2)
45. Affatigato L., Licciardi M., Bonamore A., Martorana A., Incocciati A., Boffi A., Militello V. // *Molecules*. 2023. V. 28. P. 1163. <https://doi.org/10.3390/molecules28031163>
46. Shevtsov M., Huile G., Multhoff G. // *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2018. V. 373. P. 20160526. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0526>
47. Shevtsov M.A., Nikolaev B.P., Ryzhov V.A., Yakovleva L.Y., Marchenko Y.Y., Parr M.A., Rolich V.I., Mikhrina A.L., Dobrodumov A.V., Pitkin E., Multhoff G. // *Nanoscale*. 2015. V. 7. P. 20652–20664. <https://doi.org/10.1039/c5nr06521f>
48. Shaterabadi Z., Nabiyouni G., Soleymani M. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2018. V. 133. P. 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.10.001>
49. Johannsen M., Thiesen B., Wust P., Jordan A. // *Int. J. Hyperthermia*. 2010. V. 26. P. 790–795. <https://doi.org/10.3109/02656731003745740>
50. Maier-Hauff K., Ulrich F., Nestler D., Niehoff H., Wust P., Thiesen B., Orawa H., Budach V., Jordan A. // *J. Neurooncol.* 2011. V. 103. P. 317–324. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0389-0>
51. Ruan S., Yuan M., Zhang L., Hu G., Chen J., Cun X., Zhang Q., Yang Y., He Q., Gao H. // *Biomaterials*. 2015. V. 37. P. 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.007>
52. Ruan S., He Q., Gao H. // *Nanoscale*. 2015. V. 7. P. 9487–9496. <https://doi.org/10.1039/c5nr01408e>
53. Gehrmann M.K., Kimm M.A., Stangl S., Schmid T.E., Noël P.B., Rummeny E.J., Multhoff G. // *Int. J. Nanomedicine*. 2015. V. 10. P. 5687–5700. <https://doi.org/10.2147/IJN.S87174>
54. Zheng Y., Hunting D.J., Ayotte P., Sanche L. // *Radiat. Res.* 2008. V. 169. P. 19–27. <https://doi.org/10.1667/RR1080.1>
55. Schuemann J., Berbeco R.I., Chithrani D.B., Cho S.H., Kumar R.R., McMahon S.J., Sridhar S., Krishnan S. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2016. V. 94. P. 189–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.09.032>
56. Ali M.R., Ali H.R., Rankin C.R., El-Sayed M.A. // *Biomaterials*. 2016. V. 102. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.017>
57. Gehrmann M., Stangl S., Foulds G.A., Oellinger R., Breuning S., Rad R., Pockley A.G., Multhoff G. // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. 105344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105344>
58. Poccia F., Piselli P., Di Cesare S., Bach S., Colizzi V., Mattei M., Bolognesi A., Stirpe F. // *Br. J. Cancer*. 1992. V. 66. P. 427–432. <https://doi.org/10.1038/bjc.1992.291>
59. Dezfouli A.B., Stangl S., Foulds G.A., Lennartz P., Pilkington G.J., Pockley A.G., Multhoff G. // *Methods Mol. Biol.* 2023. V. 2693. P. 307–324. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3342-7\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3342-7_23)
60. Madamsetty V.S., Mukherjee A., Mukherjee S. // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10. P. 1264. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01264>
61. Slingerland M., Guchelaar H.J., Gelderblom H. // *Drug Discov. Today*. 2012. V. 17. P. 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.09.015f>
62. Lu R.M., Chen M.S., Chang D.K., Chiu C.Y., Lin W.C., Yan S.L., Wang Y.P., Kuo Y.S., Yeh C.Y., Lo A., Wu H.C. // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e66128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066128>
63. Wilhelm S., Tavares A.J., Dai Q., Ohta S., Audet J., Dvorak H.F., Chan C.W. // *Nat. Rev. Mater.* 2016. V. 1. P. e16014. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>
64. Alswieleh A.M. // *J. Chem.* 2020. V. 2020. P. e9176257. <https://doi.org/10.1155/2020/9176257>

65. *Hassanpour A., Irandoust M., Soleimani E., Zhaleh H.* // *Mat. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2019. V. 103. P. 109771.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109771>
66. *Lu S., Neoh K.G., Huang C., Shi Z., Kang E.T.* // *J. Colloid Interface Sci.* 2013. V. 412. P. 46–55.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.09.011>
67. *Shevtsov M., Zhou Y., Khachatryan W., Multhoff G., Gao H.* // *Curr. Drug Metab.* 2018. V. 19. P. 768–780.  
<https://doi.org/10.2174/1389200219666180611080736>
68. *Genc S., Taghizadehghalehjoughi A., Yeni Y., Jafarizad A., Hacimuftuoglu A., Nikitovic D., Docea A.O., Mezhuiev Y., Tsatsakis A.* // *Pharmaceutics*. 2023. V. 15. P. 245.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010245>
69. *Sparreboom A., Scripture C.D., Trieu V., Williams P.J., De T., Yang A., Beals B., Figg W.D., Hawkins M., Desai N.* // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. P. 4136–4143.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2291>
70. *Svenson S.* // *Chem. Soc. Rev.* 2015. V. 44. P. 4131–4144.  
<https://doi.org/10.1039/c5cs00288e>
71. *Caminade A.M.* // *J. Pers. Med.* 2022. V. 12. P. 1334.  
<https://doi.org/10.3390/jpm12081334>
72. *Stangl S., Gehrman M., Dressel R., Alves F., Dullin C., Themelis G., Ntziachristos V., Staeblein E., Walch A., Winkelmann I., Multhoff G.* // *J. Cell Mol. Med.* 2011. V. 15. P. 874–887.  
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01067.x>
73. *Multhoff G., Pfister K., Gehrman M., Hantschel M., Gross C., Hafner M., Hiddemann W.A.* // *Cell Stress Chaperones*. 2001. V. 6. P. 337–344.  
[https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2001\)006<0337:AMHPSN>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2001)006<0337:AMHPSN>2.0.CO;2)
74. *Taglia L., Matusiak D., Benya R.V.* // *Clin. Exp. Metastasis*. 2008. V. 25. P. 451–463.  
<https://doi.org/10.1007/s10585-008-9151-9>
75. *Gobbo J., Marcion G., Cordonnier M., Dias A.M.M., Pernet N., Hammann A., Richaud S., Mjahed H., Isambert N., Clausse V., Rébé C., Bertaut A., Gousot V., Lirussi F., Ghiringhelli F., de Thonel A., Fumoleau P., Seigneuric R., Garrido C.* // *J. Natl. Cancer Inst.* 2015. V. 108. P. djv330.  
<https://doi.org/10.1093/jnci/djv330>
76. *Schmitt E., Maingret L., Puig P.E., Rerole A.L., Ghiringhelli F., Hammann A., Solary E., Kroemer G., Garrido C.* // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 4191–4197.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3778>
77. *McKeon A.M., Egan A., Chandanshive J., McMahon H., Griffith D.M.* // *Molecules*. 2016. V. 21. P. 949.  
<https://doi.org/10.3390/molecules21070949>
78. *Adam C., Baeurle A., Brodsky J.L., Wipf P., Schrama D., Becker J.C., Houben R.* // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e92041.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092041>
79. *Prince T., Ackerman A., Cavanaugh A., Schreiber B., Juengst B., Andolino C., Danella J., Chernin M., Williams H.* // *Oncotarget*. 2018. V. 9. P. 32702–32717.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.26021>
80. *Li X., Srinivasan S.R., Connarn J., Ahmad A., Young Z.T., Kabza A.M., Zuiderweg E.R.P., Sun D., Gestwicki J.E.* // *ACS Med. Chem. Lett.* 2013. V. 4. P. 1042–1047.  
<https://doi.org/10.1021/ml400204n>
81. *Wadhwa R., Sugihara T., Yoshida A., Nomura H., Reddel R.R., Simpson R., Maruta H., Kaul S.C.* // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 6818–6821.
82. *Koya K., Li Y., Wang H., Ukai T., Tatsuda N., Kawakami M., Shishido T., Chen L.B.* // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 538–543.
83. *Modica-Napolitano J.S., Koya K., Weisberg E., Brunelli B.T., Li Y., Chen L.B.* // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 544–550.
84. *Schett G., Xu Q., Amberger A., Van der Zee R., Reichel H., Willeit J., Wick G.* // *J. Clin. Invest.* 1995. V. 96. P. 2569–2577.  
<https://doi.org/10.1172/JCI118320>
85. *Leng X., Wang X., Pang W., Zhan R., Zhang Z., Wang L., Gao X., Qian L.* // *Cell Stress Chaperones*. 2013. V. 18. P. 483–493.  
<https://doi.org/10.1007/s12192-013-0404-4>

## Heat Shock Proteins on the Surface of Tumor Cells as a Target for Anti-Tumor Therapy

A. O. Makarova<sup>\*, \*\*</sup>, V. V. Kostenko<sup>\*, \*\*</sup>, O. V. Ovryanikova<sup>\*, \*\*</sup>, E. V. Svirshchevskaya<sup>\*</sup>,  
G. V. Lutsenko<sup>\*</sup>, and A. M. Sapozhnikov<sup>\*, #</sup>

<sup>#</sup> Phone: +7 (495) 330-40-11; e-mail: amsap@mail.ru

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

<sup>\*\*</sup> Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia

According to WHO, oncological diseases are the cause of ~5 million people deaths annually. To date, there is no universal solution to fight cancer, despite outstanding achievements in the field of radiotherapy, chemotherapy, and immunotherapy. In this regard, there is a need to develop new approaches to antitumor therapy, in particular based on the search and use of targeted molecules that allow killing tumor cells of various types with high efficiency, without significant toxic effects on healthy organs and tissues. This review presents the characteristics of the main heat shock protein (HSP) families, the features of their expression in tumor cells and the possibility of using monoclonal antibodies to these proteins as a guiding vector for antitumor immunotherapy.

*Keywords: HSP, monoclonal antibodies, targeted delivery, oncology, antitumor therapy*



УДК 575.112

# БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ И ПРОДУКТОВ ТРАНС-СПЛАЙСИНГА<sup>1</sup>

© 2024 г. И. Ю. Мусатов\*, \*\*, #, М. И. Сорокин\*\*, А. А. Буздин\*, \*\*\*, \*\*\*\*

\* ФГАОУ ВО “Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)”,  
Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9\*\* Институт персонализированной онкологии и персонализированного здравоохранения  
ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет),  
Россия, 119048 Москва, ул. Трубецкая, 8/2\*\*\* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,  
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10\*\*\*\* ГНЦ РФ ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии”  
Минздрава России, Россия, 117292 Москва, ул. Дм. Ульянова, 11

Поступила в редакцию 23.11.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 14.12.2023 г.

Гибридные гены и транскрипты могут являться маркерами и быть причинами развития опухоли за счет дополнительной функциональности получающихся генных продуктов. Современные алгоритмы и методы высокопроизводительного секвенирования, позволяющие детектировать гибридные гены, развиваются как взаимно дополняющие ключи к разгадке вопроса возникновения и диагностики опухоли, а также к фундаментальному вопросу возникновения гибридов и их влияния на молекулярные процессы. Разработаны десятки алгоритмов для детектирования гибридных генов, отличающиеся скоростью, чувствительностью и специфичностью, а также ориентированные на определенный дизайн эксперимента. В зависимости от длины прочтения (50–300 п.н. – короткие прочтения, 5000–100 000 п.н. – длинные прочтения) существуют три типа алгоритмов: работающие только с короткими, только с длинными прочтениями или совмещающие возможности обоих подходов. Кроме того, сами программы разделяют на: 1) программы-картировщики на геном/транскриптом, которые осуществляют поиск прочтений по ряду признаков, например, поиск таких прочтений, которые картируются одновременно на экзоны разных генов и, тем самым, подтверждают наличие гибрида в образце (STAR-Fusion, Arriba); 2) программы-сборщики генома/транскриптома *de novo* с последующим отбором гибридных транскриптов (Fusion-Bloom); 3) программы, использующие “псевдовыравнивание” (Kallisto&Pizzly), когда реального картирования не происходит, а идет сравнение предварительно вычисленного индекса для подпоследовательности транскрипта с индексом, вычисляемым для подпоследовательности конкретного прочтения. В данном обзоре рассмотрены основные классы имеющихся программных инструментов для детектирования гибридных генов, приведены характеристики этих программ, их достоинства и недостатки. Наиболее ресурсоемкими и медленными на сегодняшний момент по-прежнему остаются алгоритмы, осуществляющие сборку генома, их опережают алгоритмы-картировщики. Наиболее быстрыми и сберегающими компьютерные ресурсы являются алгоритмы, осуществляющие псевдовыравнивание, что снижает качество выравнивания в целом.

*Ключевые слова:* РНК-секвенирование, гибридные гены, гибридные транскрипты, опухоль, фиксированные формалином парафинизированные образцы ткани, псевдовыравнивание, сборка генома *de novo*, сборка транскриптома *de novo*, транс-сплайсинг

DOI: 10.31857/S0132342324030033, EDN: OAIWBS

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0132342324030033 для авторизованных пользователей.

Сокращения: ММП – максимальный отображаемый префикс; ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз; STAR – алгоритм выравнивания сплайсированных транскриптов на эталонный геном/транскриптом; SNP – однонуклеотидный полиморфизм.

# Автор для связи: (тел.: +7 (985) 147-97-18; эл. почта: musatov.mailbox@yandex.ru).

## СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	232
2. ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К ДЕТЕКЦИИ ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ	233
3. ПРОГРАММЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ ВЫРАВНИВАНИЕ НА ГЕНОМ/ТРАНСКРИПТОМ. STAR и STAR-FUSION	234
3.1. Программа STAR	234
3.2. STAR-Fusion	237
4. ФИЛЬТР ПАРАЛОГОВ	237
5. ФИЛЬТР ПРОЧТЕНИЙ, КАРТИРУЮЩИХСЯ ОДНОВРЕМЕННО В НЕСКОЛЬКО МЕСТ	238
6. STAR и ARRIBA	238
7. ПРОГРАММЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ СБОРКУ ТРАНСКРИПТОМА <i>de novo</i> . FUSION-BLOOM и RNA-BLOOM	241
8. ПРОГРАММЫ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ ПСЕВДОВЫРАВНИВАНИЕ. KALLISTO и PIZZLY	241
9. ПРОГРАММЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ В ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛИННЫМИ ПРОЧТЕНИЯМИ. JAFFA И JAFFAL	242
10. LONG GF	244
11. FUSIONSEEKER	244
12. ДОСТОИНСТВА И НЕДОСТАТКИ АКТУАЛЬНЫХ ПОДХОДОВ К ДЕТЕКЦИИ И ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ И ТРАНСКРИПТОВ. СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СУЩЕСТВУЮЩИХ ПРОГРАММ ДЛЯ ПОИСКА ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ И ИХ ПРОДУКТОВ	245
13. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ПРОГРАММ И МЕТОДОВ ПОИСКА ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ И ИХ ПРОДУКТОВ	247
14. ОБСУЖДЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ И ОГРАНИЧЕНИЙ СУЩЕСТВУЮЩИХ ПРОГРАММ ДЛЯ ПОИСКА ГИБРИДОВ И ИХ ПРОДУКТОВ	247
15. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	251
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	251

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Гибридными (химерными) генами называют гены, образовавшиеся в результате слияния двух ранее независимых генов или их частей. Такие гибриды могут образоваться в результате хромосомных перестроек или *цис/транс*-сплайсинга. *Цис*-сплайсинг близлежащих генов (*cis*-SAGE) возникает в результате игнорирования ДНК-зависимой РНК-полимеразой стоп-кодона транскрипции; вместо этого последовательности ДНК двух соседних генов считываются и транскрибируются в гибридный транскрипт мРНК [1–3].

*Транс*-сплайсинг генов – молекулярный процесс, в результате которого транскрипты двух разных генов соединяются в один. *Транс*-сплайсинг хорошо задокументирован у низших эукариот, однако в ряде исследований такие события были обнаружены и в опухолях человека [3–5].

Еще один процесс, приводящий к образованию гибридов, – соматические хромосомные перестройки (транслокации, инверсии и делеции). Хромосомная транслокация была первым известным механизмом, приведшим к возникновению гибридного гена [6], а именно гена *BCR::ABL1*, известного как ген “филадельфийской хромосомы”, который образуется в результате несбалансированной соматической транслокации участков хромосом 9 и 22 [t(9;22)(q34;q11.2)] [7, 8]. Наличие этого гена приводит к возникновению в клетке постоянно активной тирозинкиназы, что вызывает постоянную пролиферацию такой клетки и ее невосприимчивость к сигналам апоптоза. Эти процессы ускоряют мутагенез и позволяют опухолевым клеткам стать устойчивыми к воздействию лекарственных препаратов [9, 10].

В результате такая перестройка приводит к возникновению ХМЛ (хронического миелолейкоза) и встречается в 90% случаев данного вида миелолейкоза. Такие гибриды оказывают влияние на развитие рака, например, за счет нарушения регуляции некоторого молекулярного пути. В таком случае продукт некоторого гена  $A$  получает дополнительную регулируемую активность, не свойственную данному гену  $A$ . Со времени обнаружения первого гибридного гена в ХМЛ было открыто множество гибридов, встречающихся в других типах рака [11–18]. Наличие гибридов может быть, как непосредственным признаком наличия болезни, так и ее причиной, поэтому были созданы препараты, нацеленные на ряд хорошо известных гибридов в различных типах рака [11].

Ввиду того, что гибридные гены могут быть как маркерами, так и потенциальными целями противораковых препаратов, поиск гибридов представляет собой актуальную задачу. Высокопроизводительное секвенирование трансформировало сферу геномики рака, позволив секвенировать целые геномы и транскриптомы злокачественных опухолей человека по сравнительно небольшой стоимости, что привело к экспоненциальному возрастанию объема обрабатываемых данных и разработке различных программных инструментов и алгоритмов для поиска гибридных генов. В настоящем обзоре рассмотрены различные биоинформатические подходы для детекции гибридных генов, успешно применяемые в последние несколько лет, их преимущества, недостатки и перспективы развития данной области исследований.

## 2. ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ

На сегодняшний день разработано большое количество алгоритмов и инструментов, позволяющих детектировать гибридные гены в больших массивах данных, генерируемых методами высокопроизводительного секвенирования. Существующие алгоритмы, дающие наиболее эффективную прогностическую оценку транскриптов как кандидатов в новые ранее не открытые гибриды, часто используют данные секвенирования как генома, так и транскриптома для образца. Такие алгоритмы называются метаалгоритмы.

Поиск гибридов и продуктов *транс*-сплайсинга в таких алгоритмах реализован двумя способами:

1) выравниванием прочтения на эталонную последовательность, например, чтобы идентифицировать последовательности, которые одновременно картируются в несколько мест (*multimapping reads*) [19–21] (рис. 1);

2) сборкой прочтений в более длинные транскрипты *de novo* за счет перекрывающихся последовательностей длиной  $k$  нуклеотидов ( $k$ -меры) (рис. 2). Такая сборка может осуществляться либо из  $k$ -меров прочтений (рис. 3), либо для этого могут быть использованы транскрипты эталонного транскриптома. Тогда из транскриптов эталонного транскриптома составляется структура из подпоследовательностей нуклеотидов длиной  $k$ , именуемая граф де Брюйна из  $k$ -меров транскриптома/генома [21, 22]. Если  $k$ -мер имеет сходную подпоследовательность с  $(k + 1)$ -мером, т.е. является префиксом или суффиксом  $(k + 1)$ -мера, то такой  $k$ -мер будет иметь связь в графе де Брюйна с  $(k + 1)$ -мером эталонного транскриптома (см. Дополнительные материалы к статье). В результате сборки получится набор транскриптов, который будет либо соответствовать эталонным транскриптам из эталонного транскриптома, либо будет собран гибридный транскрипт, не присутствующий в эталонном транскриптоме.

Таким образом,  $k$ -меры, которые имеют префикс и суффикс, соответствующие разным генам, при сравнении с эталонным транскриптом идентифицируют как потенциальные гибриды – такие  $k$ -меры (собранные алгоритмом в гипотетические транскрипты) могут соответствовать хромосомным перестройкам.

Собранная длинная последовательность из перекрывающихся подпоследовательностей прочтений называется контигом. Такие контиги затем сравниваются с числом транскрибируемых генов с учетом альтернативного сплайсинга, что позволяет оценить информативность сборки.

Подход, использующий в качестве первого шага выравнивание, более чувствителен с точки зрения числа детектируемых гибридов и продуктов *транс*-сплайсинга.

В то же время сборка прочтений в более длинные транскрипты *de novo* может быть полезна исследователю для поиска новых изоформ гибрида [23], не указанных в различных базах данных, или таких изоформ, для которых:

1) отсутствует аннотация или эталонная последовательность;

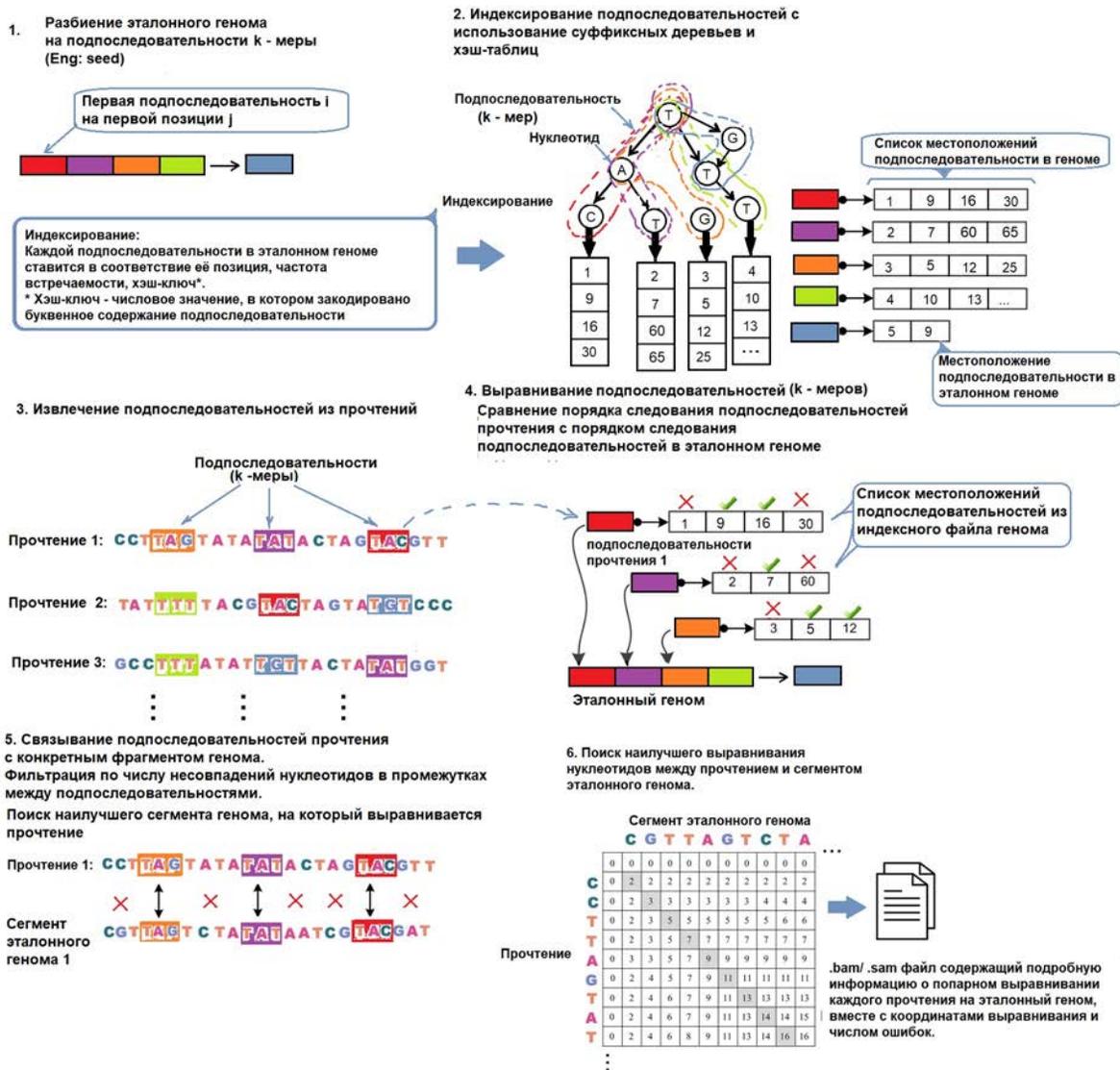


Рис. 1. Основные этапы работы алгоритмов картирования прочтений на геном (транскриптом). Рисунок подготовлен и переработан на базе материалов статьи Alser et al. [63].

2) имеется аннотация для обоих экзонов в отдельности, при этом ни один транскрипт, объединяющий данные экзоны, не аннотирован;

3) в геноме имеются недавно возникшие гены-паралоги, которые производят две изоформы, различающиеся в последовательности [23].

Один из “золотых стандартов”, использующих предварительное выравнивание прочтений с последующей фильтрацией прочтений, – программа картирования STAR с соответствующей ей надстройкой STAR-Fusion [21, 24].

### 3. ПРОГРАММЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ ВЫРАВНИВАНИЕ НА ГЕНОМ/ТРАНСКРИПТОМ. STAR И STAR-FUSION

#### 3.1. Программа STAR

Программа STAR (Spliced Transcripts Alignment to the Reference) была разработана для выравнивания несмежных последовательностей непосредственно с эталонным геномом. Алгоритм STAR состоит из нескольких основных этапов: этапа

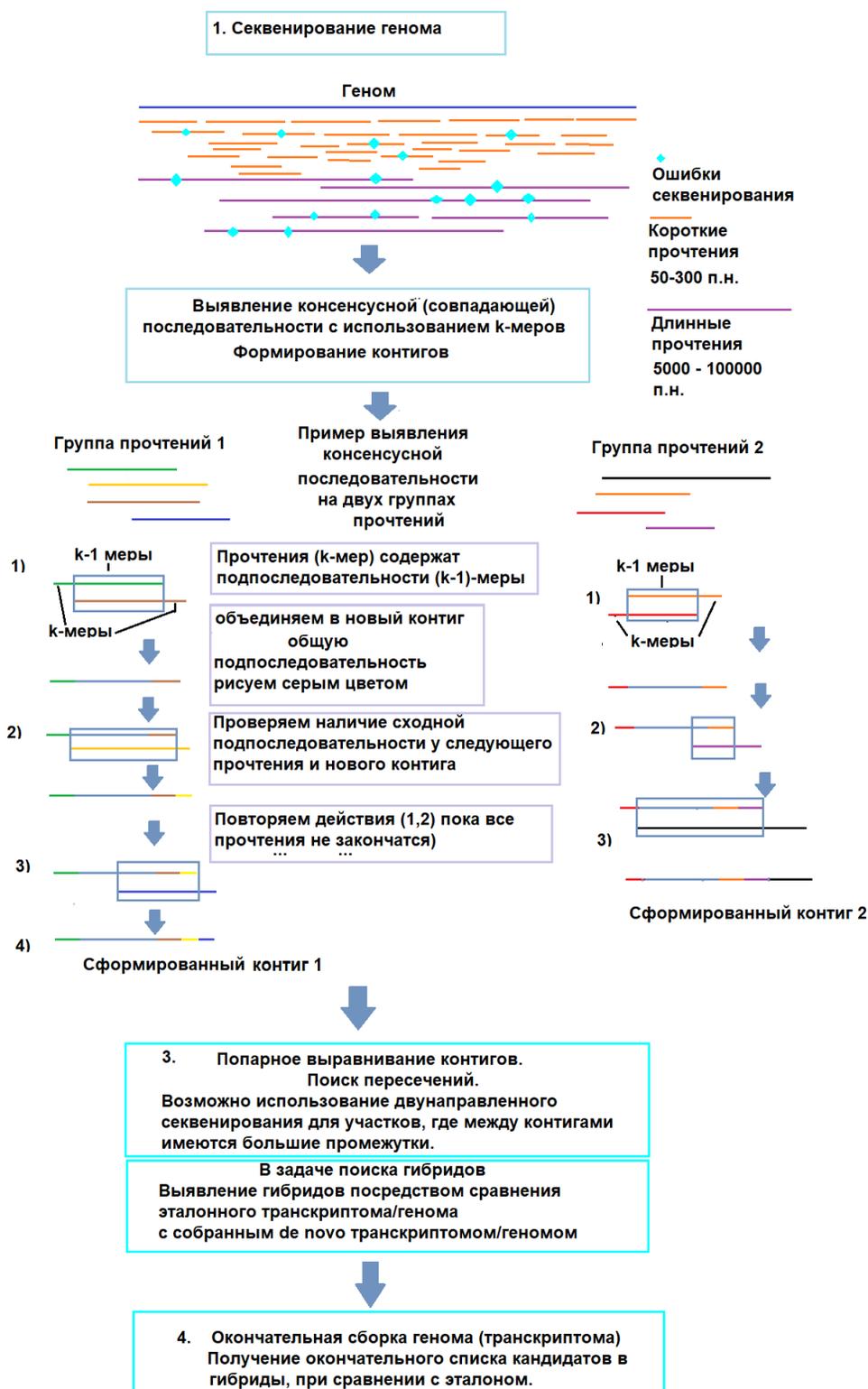
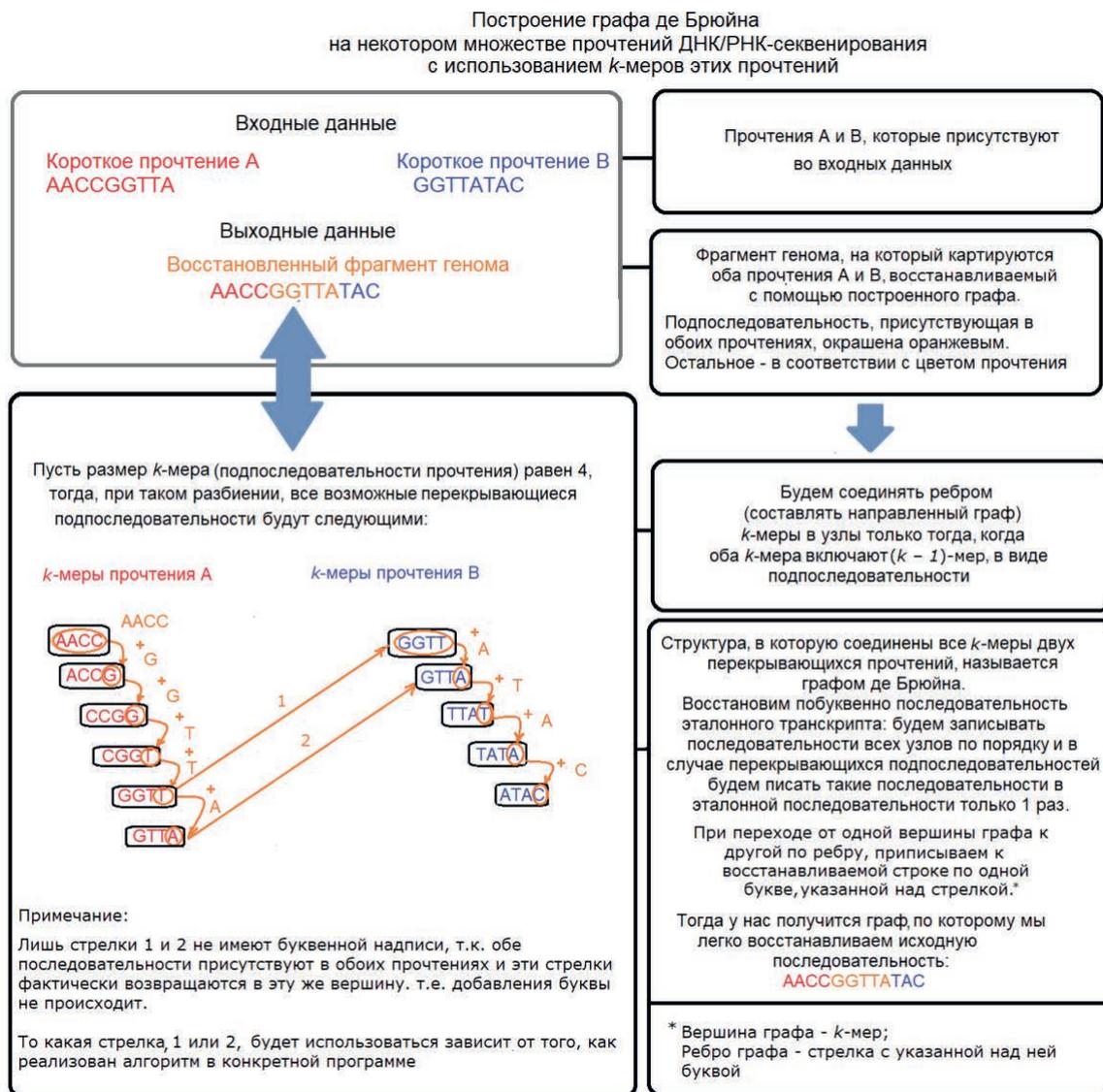


Рис. 2. Основные этапы работы алгоритмов-сборщиков генома (транскриптома) *de novo*.



**Рис. 3.** Построение графа де Брюйна на некотором множестве прочтений ДНК/РНК-секвенирования с использованием  $k$ -меров (подпоследовательностей) таких прочтений.

поиска начального максимального по длине картируемого отображения – максимального отображаемого префикса (ММП – maximum mappable prefix) – и этапов кластеризации, сшивания и оценки [19, 21].

STAR будет искать самую длинную подпоследовательность прочтения, которая соответствует одному или нескольким местам в эталонном геноме. Эти длинные совпадающие подпоследовательности называются максимальными отображаемыми префиксами (ММП).

Алгоритм картирует прочтение на геном, и если какая-то часть последовательности прочтения не картируется (т.е. во время поиска ММП выравнивание не проходит до конца прочтения), то прочтение разбивается на картированный и некартированный фрагменты. Положение, где прочтение будет разбито на две части, будет в таком случае гипотетической точкой разрыва (breakpoint), а найденный ММП относится к конкретному гену в геноме. Далее для некартированной части прочтения (суффикса) будет произведена аналогичная

процедура [21]. Первый этап – поиск ММР – реализован как поиск в бинарной строке для нежатых суффиксных массивов, что выполняется быстрее (в отличие от стандартного поиска полноразмерного совпадения) и работает как для самого прочтения, так и для дополняющей его обратнo-комплементарной последовательности.

Таким образом, можно найти не только последовательности, которые при прочих равных и так успешно выравнивались на геном, но и гибридные прочтения, состоящие из экзонов двух разных генов.

Если в прочтении имеются несовпадения, то берется следующий нуклеотид (буква), и если число ошибок при увеличении размера суффикса последовательно растет, то расширенная часть прочтения обрезается.

На втором этапе происходит окончательное выравнивание последовательности с учетом того, какой ММР был выбран (так называемый “якорный ММР” с наилучшим выравниванием). Далее последовательность ММР сшивается с оставшимися выровненными частями прочтений, причем так, чтобы все выравнивания попали в так называемое окно выравнивания. Такое окно формируется следующим образом: первоначально геном разбивается на фрагменты одинаковой длины, начальные координаты которых совпадают с координатами якорных ММР. Затем все якорные ММР, которые находятся на расстоянии  $i$  букв между друг другом (такое расстояние в  $i$  букв указывается пользователем в качестве размера интрона), составят окно выравнивания. После этого начинается сшивание фрагментов в соответствии с наилучшими значениями выравнивания для оставшихся ММР с помощью алгоритма динамического программирования, при этом алгоритм допускает произвольное число несовпадений, но только одну делецию или одну инсерцию в ходе сшивания ММР.

Если выравнивание происходит в пределах одного геномного окна и не охватывает прочтение целиком, STAR попытается найти два или более окон, охватывающих всю последовательность, в результате чего образуется химерное выравнивание с различными частями прочтения, сопоставленными с дистальными геномными локусами или разными хромосомами [21].

При сшивании двух ММР используется схема оценки локального выравнивания с учетом штрафов за несовпадения в последовательности, делеции и инсерции, а также оценки за верное выравнивание, задаваемые пользователем и изменяемые в зависимости от длины прочтения. Это позволяет также выравнивать прочтения, полученные методами секвенирования третьего поколения – РНК-секвенирования длинными прочтениями [19, 25].

### 3.2. STAR-Fusion

STAR-Fusion – надстройка над основной программой картирования STAR-Aligner и компонент инструмента Trinity Cancer Transcriptome Analysis Toolkit (CTAT), которая в ходе картирования прочтений на геном возвращает наиболее вероятные химерные прочтения. Фильтрация результатов выдачи картировщика STAR-Aligner проводится этой надстройкой в два этапа: базовая и продвинутая фильтрация [24].

На первом этапе исключаются все прочтения, которые попадают на участки, имеющие попарное сходство нуклеотидной последовательности, посредством поиска по базе эталонных транскриптов комплементарной ДНК, проиндексированных алгоритмом BLASTN [26]. Также исключаются дубликаты парноконцевых прочтений.

После этого отбираются химерные гибриды так, чтобы направление транскрипции для экзонов, составляющих гибрида, совпадало, и точка разрыва поддерживалась как минимум двумя прочтениями. Если точка разрыва соответствует сайтам сплайсинга экзонов, то как минимум одно из прочтений должно поддерживать данную точку разрыва. В случае же несоответствия точки разрыва эталонным сайтам сплайсинга экзонов требуются как минимум три прочтения для того, чтобы подтвердить такую точку разрыва. При этом если точка разрыва не соответствует эталонным сайтам сплайсинга, то для прочтений, перекрывающих точку разрыва, требуется картирование как минимум 25 нуклеотидов по обе стороны от точки разрыва [24].

## 4. ФИЛЬТР ПАРАЛОГОВ

На более глубоком уровне фильтрации анализируются уже индивидуальные характеристики каждого гибрида. Так, например, из выдачи исклю-

чаются прочтения, которые картируются на гибриды, состоящие из генов, являющихся паралогами друг друга. Также исключаются случаи, если два гибрида содержат гены, являющиеся паралогами друг друга, причем в большинстве своем поддерживается только один из паралогов [21].

Пусть, например, в гибридах “Ген\_1\_Ген\_2” и “Ген\_1\_Ген\_3” Ген\_2 и Ген\_3 являются паралогами друг друга; и пусть прочтений и прочих свидетельств, поддерживающих “Ген\_1\_Ген\_2”, больше, чем прочтений, поддерживающих “Ген\_1\_Ген\_3”. Тогда в качестве финального результата будет выбран тот гибрид, который имеет большее количество прочтений, относящихся к данному гибриду.

### 5. ФИЛЬТР ПРОЧТЕНИЙ, КАРТИРУЮЩИХСЯ ОДНОВРЕМЕННО В НЕСКОЛЬКО МЕСТ

Если имеется несколько гибридных генов, состоящих из некоторого определенного гена и других генов с разным числом прочтений, относящихся к каждому гибриду, т.е. пусть существуют гибриды “Ген\_1\_Ген\_2”, “Ген\_1\_Ген\_3”, “Ген\_1\_Ген\_4”, и уровень поддержки (число прочтений, относящихся к данному гибриду) одного из них в 20 раз превышает уровень поддержки остальных. Тогда останется только гибрид с максимальным уровнем поддержки, а прочие гибриды будут исключены из рассмотрения. При этом если у Гена\_1 имеется >10 вариантов генов-партнеров, образующих гибрид с этим геном, то все гибриды, включающие Ген А, исключаются из рассмотрения [21].

Вследствие высокого полиморфизма, гомологии и ошибок секвенирования некоторые прочтения невозможно однозначно сопоставить с местом их происхождения в эталонном геноме. Поэтому из рассмотрения исключаются гибридные гены, имеющие в своем составе высокополиморфные гены комплекса гистосовместимости или митохондриальные гены, а также гибриды, присутствующие в нормальных тканях [21, 27].

Кроме того, для каждого потенциального кандидата в гибридные гены проводится оценка на основе экспрессии и глубины секвенирования. Кандидаты, отобранные как потенциальные гибриды и имеющие менее чем одно прочтение на 10 млн прочтений, отбрасываются как кандидаты с недостаточным уровнем поддержки [21].

### 6. STAR И ARRIBA

Набор фильтров Arriba основан на программе STAR-Aligner и представляет собой его дополнение (по аналогии со STAR-Fusion). Arriba позволяет использовать результаты выравнивания РНК-секвенирования (RNASeq) прочтений с помощью программы STAR и предложенные ей химерные выравнивания для дальнейшего анализа и отбора прочтений по собственным критериям Arriba.

Авторы обращают внимание, что программа STAR нацелена на поиск двух типов прочтений, подтверждающих гибридные гены:

- 1) прочтений, картированных на точку слияния/разрыва двух генов (spanning reads);
- 2) разделенных прочтений (split reads), которые картируются какой-то частью на один из генов [28].

В дополнение к прочтениям, которые находит STAR и предоставляет в качестве кандидатов в гибридные гены, Arriba также нацелена на поиск слияний, возникающих в результате фокальных делеций. При возникновении фокальных делеций 5'-конец вышестоящего гена сближается с 3'-концом нижележащего гена. STAR осуществляет выравнивание, при котором гибридные гены были бы соединены путем сплайсинга, строго по границам гена. Arriba же проверяет выдаваемый STAR список и дополняет его такими прочтениями, которые выходят за границы аннотированного гена, чтобы не пропустить гибриды, возникшие из-за фокальной делеции [28].

В дополнение к фильтрам, имеющимся в программе STAR-Aligner, в Arriba применяются дополнительные фильтры, отбрасывающие следующие прочтения:

- 1) прочтения, содержащие большое количество одинаковых нуклеотидов;
- 2) тандемные повторы;
- 3) прочтения, содержащие большое количество несовпадений между прочтением и эталоном.

Также отбрасываются прочтения из списка прочтений, соответствующих транскриптам, часто встречающимся в доброкачественных опухолях.

Список транскриптов, часто встречающихся в доброкачественных опухолях, был получен посредством машинного обучения на образцах РНК-секвенирования из пяти различных международных проектов:

1) Атласа белков человека (Human Protein Atlas), цель которого – выяснение происхождения всех белков человека с использованием современных методов [29];

2) Illumina Human BodyMap2, главная задача которого – определение профиля транскрипции для 16 типов тканей человека с использованием высокопроизводительного секвенирования [30, 31];

3) проекта ENCODE (Encyclopaedia of DNA Elements) [32], исследующего функциональные элементы генома;

4) проекта Roadmap Epigenomics [33], цель которого – создание эталонной карты эпигенетических меток;

5) проекта NCT/DKTK MASTER [34], нацеленного на исследование образцов редких типов рака, а также злокачественных образований у пациентов, у которых рак был обнаружен в молодом возрасте.

Вдобавок к вышеописанным фильтрам ложноположительных результатов Arriba имеет фильтры ложноотрицательных результатов. Такие фильтры возвращают в общий перечень кандидатов в гибридные гены кандидаты и соответствующие им прочтения:

- 1) прочтения, указанные в пользовательском списке известных или часто встречающихся гибридов;
- 2) прочтения, картированные на известные сайты сплайсинга, если такие прочтения были первоначально отброшены [21, 28].

Также Arriba имеет собственную статистическую модель, применяемую для фильтрации кандидатов в гибридные гены [28].

Здесь и далее для уточнения терминологии дадим следующее определение: будем называть точкой разрыва (breakpoint) место в нуклеотидной последовательности и его координаты, в котором произошел разрыв хромосомы, например, в результате транслокации, с последующим встраиванием участка другого гена (слиянием), в результате чего получился гибридный ген, состоящий из двух различных генов.

Разработчики Arriba отмечают, что уровень шума (число ложноположительных кандидатов в гибриды) коррелирует с глубиной секвенирования, расстояниями между точками разрыва, отношением числа интронов к числу экзонов, а также отношением между числом инверсий и прочтений с одинаковой нуклеотидной последовательностью. Коррелирующие значения влияют на базовый

уровень шума, что, в свою очередь снижает точность предсказания, поэтому величина их значения выступает как штраф, увеличивая потенциальную ошибку. В модели, используемой программой Arriba, ожидаемый уровень ( $e\_value$ ) шума оценивается как произведение следующих множителей [28]:

$$e\_value = base\_level\_background\_noise \times depth\_penalty \times distance\_penalty \times inversions\_to\_duplications\_ratio \times intron\_to\_exons\_ratio, \quad (1)$$

где  $e\_value$  – ожидаемый уровень шума;  $base\_level\_background\_noise$  – уровень базового фонового шума;  $depth\_penalty$  – штраф за глубину секвенирования;  $distance\_penalty$  – штраф за расстояния между точками разрыва;  $inversions\_to\_duplications\_ratio$  – отношение между числом инверсий и прочтений с одинаковой нуклеотидной последовательностью;  $intron\_to\_exons\_ratio$  – отношение числа интронов к числу экзонов.

В данном инструменте предполагается, что отношение числа прочтений, подтверждающих гибриды (сигнал), к общему числу прочтений (шум) распределено полиномиально. В итоговой выдаче результатов сообщается только о тех кандидатах, которые содержат число прочтений выше уровня шума. Кандидаты в гибриды, имеющие уровень  $e\_value$  (ожидаемого фонового шума) меньше установленного пользователем порога (или значения по умолчанию), будут отобраны в качестве итогового результата.

Отметим, что авторы утверждают, что предположения, на основе которых был сделан вывод о том, что данная характеристика имеет полиномиальную зависимость, основаны на эмпирических свидетельствах [28], предполагая наличие нелинейной зависимости между числом прочтений, подтверждающих гибриды, и общим числом прочтений.

Уровень базового фонового шума для каждого гена рассчитывается по формуле (2) [28]:

$$base\_level\_background\_noise = \frac{total\_candidates\_of\_gene}{sum\_of\_exon\_lengths\_of\_gene} \times (supporting\_reads - SHIFT_{noise})^{SLOPE_{noise}} \times INTERCEPT_{noise}, \quad (2)$$

где  $base\_level\_background\_noise$  – уровень базового фонового шума;  $total\_candidates\_of\_gene$  – общее число кандидатов в гибридные гены для данного гена;  $sum\_of\_exon\_lengths\_of\_gene$  – сумма длин экзонов данного гена;  $supporting\_reads$  – число прочтений, подтверждающих гибридный ген;  $SHIFT_{noise}$  – смещение  $_{шум} = -0.73$ ;  $SLOPE_{noise}$  – наклон  $_{шум} = -2.28$ ;  $INTERCEPT_{noise}$  – пересечение с осью  $y_{шум} = 10^{-1.75}$ . Причем смещение  $_{шум}$ , наклон  $_{шум}$ , пересече-

чение с осью  $y_{\text{шум}}$  – эмпирически определенные константы, которые были получены на образцах секвенирования РНК из когорты NCT/DKTK MASTER и оказались достаточно стабильными в различных наборах данных [28], а именно:

$$\text{depth\_penalty} = \text{SLOPE}_{\text{depth}} \times (\text{SLOPE\_MODIFIER})^{\text{supporting\_reads}} \times \text{mapped\_read}, \quad (3)$$

где  $\text{depth\_penalty}$  – штраф за глубину секвенирования;  $\text{SLOPE}_{\text{depth}}$  – наклон<sub>глубина</sub> =  $2 \times 10^{-11}$ ;  $\text{SLOPE\_MODIFIER}$  – модификатор наклона = 0.02;  $\text{mapped\_reads}$  – число картированных прочтений.

Отметим, что штраф за расстояние между точками разрыва  $\text{distance\_penalty}$  (4) применяется для точек, находящихся на расстоянии менее  $4 \times 10^5$  п.н. [28]. Штраф увеличивается с уменьшением расстояния между точками разрыва.

$$\text{distance\_penalty} = (\text{distance})^{\text{SLOPE}_{\text{distance}}} \times \text{INTERCEPT}_{\text{distance}}, \quad (4)$$

где  $\text{distance\_penalty}$  – штраф за расстояния между точками разрыва;  $\text{distance}$  – расстояние между точками разрыва;  $\text{SLOPE}_{\text{distance}}$  – наклон<sub>расстояние</sub>;  $\text{INTERCEPT}_{\text{distance}}$  – пересечение с осью  $y_{\text{расстояние}}$ .

В зависимости от того, находятся ли точки разрыва ближе друг к другу или на расстоянии >400 п.н., используются разные коэффициенты:

1) если расстояние между точками разрыва <400 нуклеотидов, то  $\text{SLOPE}_{\text{distance}} = -4.58$  и  $\text{INTERCEPT}_{\text{distance}} = 8.27 \times 10^{10}$ ;

2) если расстояние между точками разрыва >400 нуклеотидов, то  $\text{SLOPE}_{\text{distance}} = -1.53$  и  $\text{INTERCEPT}_{\text{distance}} = 3.73 \times 10^8$ .

Библиотеки, ориентированные согласно направлению цепи (stranded RNAseq), могут иметь дубликаты [28]. Чтобы учесть влияние протокола подготовки образцов РНК-секвенирования (stranded RNAseq/non-stranded RNAseq), Aggiba считает соотношение между инверсиями и дубликатами. И за наличие инвертированных прочтений и прочтений с повторяющимися последовательностями в конечную оценку шума для кандидата в гибридные гены входит штраф (формулы (5) и (6) [28]), называемый соотношением между инверсиями и прочтениями с повторяющимися последовательностями. Такое соотношение рассчитывается по следующим формулам:

1) если для данного кандидата в гибридный ген в прочтениях присутствует инверсия, то для расчета коэффициента используют формулу:

$$\text{inversions\_to\_duplications\_ratio} = \frac{\text{total\_inversions}}{\text{total\_candidates}}, \quad (5)$$

где  $\text{inversions\_to\_duplications\_ratio}$  – соотношение между всеми прочтениями, содержащими инверсии, и общим числом прочтений для данного кандидата в гибридный ген;  $\text{total\_inversions}$  – число всех инвертированных прочтений для данного кандидата в гибридный ген;  $\text{total\_candidates}$  – число всех прочтений для данного кандидата в гибридный ген;

2) если для данного кандидата в гибридный ген присутствуют прочтения, содержащие повторяющиеся последовательности, то коэффициент рассчитывают по формуле:

$$\text{inversions\_to\_duplications\_ratio} = \frac{\text{total\_duplicates}}{\text{total\_candidates}}, \quad (6)$$

где  $\text{inversions\_to\_duplications\_ratio}$  – соотношение между прочтениями с повторяющейся последовательностью и общим числом прочтений для данного кандидата в гибридный ген;  $\text{total\_duplicates}$  – число всех прочтений с повторяющейся последовательностью для данного гена;  $\text{total\_candidates}$  – число всех прочтений для данного гена.

Аналогичным образом кандидату в гибриды присваивается штраф (формула (7) [28]) в зависимости от местонахождения точки разрыва: в интроне, в экзоне или в месте сплайсинга. Такой штраф называется соотношением между числом интронов и числом экзонов, и в зависимости от положения точки разрыва данный коэффициент рассчитывают следующим образом [28, 35]:

$$1) \text{intron\_to\_exon\_ratio} = \frac{\text{total\_intronic\_candidates}}{\text{total\_candidates}}, \quad (7)$$

если точка разрыва (breakpoint) находится в интроне;

$$2) \text{intron\_to\_exon\_ratio} = \frac{\text{total\_exonic\_candidates}}{\text{total\_candidates}}, \quad (7)$$

если точка разрыва (breakpoint) находится в экзоне;

$$3) \text{intron\_to\_exon\_ratio} = \frac{\text{total\_spliced\_candidates}}{\text{total\_candidates}}, \quad (7)$$

если точка разрыва (breakpoint) находится в сайте сплайсинга.

В формулах (7)  $\text{total\_intronic\_candidates}$  – число всех прочтений, содержащих точку разрыва в интроне;  $\text{total\_exonic\_candidates}$  – число всех прочтений, содержащих точку разрыва в экзоне;  $\text{total\_spliced\_candidates}$  – число всех прочтений, содержащих точку разрыва в месте сплайсинга;  $\text{total\_candidates}$  – число всех прочтений для данного гена.

## 7. ПРОГРАММЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ СБОРКУ ТРАНСКРИПТОМА *DE NOVO*. FUSION-BLOOM И RNA-BLOOM

Fusion-Bloom – программа, основанная на сборке транскриптома *de novo*, использует алгоритм RNA-Bloom и программу для поиска различных структурных вариантов PAVFinder для обнаружения гибридных генов [36]. Отметим, что алгоритм RNA-Bloom был задуман как алгоритм сборки прочтений секвенирования РНК одной клетки (single-cell RNAseq). Выполнение данной программы состоит из нескольких этапов [37]. На первом этапе Прочтения РНК-секвенирования собирают в более длинные последовательности (контиги) за счет наборов перекрывающихся сегментов РНК с использованием алгоритма RNA-Bloom. Собранные таким образом последовательности получаются разной длины, поскольку перекрывающиеся фрагменты имеют разную длину и область перекрытия. Такие контиги фильтруют по длине так, чтобы длина контига была больше длины первого квартиля всей сборки, т.е. для конкретного собираемого транскриптома строится распределение длин контигов. Далее такое распределение разбивают на квартили и проверяют, чтобы длина собранного контига превышала длину контига, соответствующего первому квартилю распределения для всей сборки. На следующем этапе используется несколько алгоритмов выравнивания, чтобы установить в дальнейшем прочтения, поддерживающие гибридные гены. Во-первых, контиги выравниваются на геном с помощью алгоритма GMAP, во-вторых, эти же контиги выравниваются на эталонные транскрипты алгоритмом BWA MEM. Отметим, что эталонные транскрипты были получены с использованием скрипта “extract\_transcript\_sequence.py” входящего в пакет программ PAVFinder (Post Assembly Variant Finder) [36, 38]. Картирование на геном с последующим картированием на эталонные транскрипты позволяет отделить контиги, которые выравниваются уникально и не уникально на определенные гены и транскрипты как на геномном, так и на транскриптомном уровнях, и, таким образом, выяснить, какие контиги являются гибридами. После этого прочтения РНК-секвенирования выравниваются на отобранные гибридные контиги с помощью алгоритма Minimap2 – для оценки уровня экспрессии пред-

полагаемых гибридных генов и последующей фильтрации гибридных контигов. Затем, руководствуясь результатами трех выравниваний (прочтений на контиги, контигов на геном и контигов на транскриптом), алгоритм PAVFinder составляет список предполагаемых гибридных генов и поддерживающих их прочтений и возвращает пользователю список предполагаемых гибридов в формате BEDPE [36].

Формат BEDPE содержит следующую информацию:

- 1) координаты генов 1 и 2, составляющих гибрида;
- 2) ориентация генов;
- 3) число экзонов для генов 1 и 2;
- 4) идентификатор соответствующего контига в сборке, на который картирован гибрида;
- 5) информацию о сдвиге рамки считывания в гибриде;
- 6) число прочтений, картированных непосредственно на точку разрыва;
- 7) число прочтений, картированных на тот же гибрида, но располагающихся по флангам относительно точки разрыва.

Более подробно ознакомиться с данным форматом можно, используя статью авторов алгоритма Fusion-Bloom, а также спецификацию данного формата [36, 39, 40]. На сегодняшний день, по словам авторов, Fusion-Bloom представляет собой один из наиболее удачных инструментов для поиска химерных генов, использующих технологию сборки транскриптома *de novo*.

## 8. ПРОГРАММЫ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ ПСЕВДОВЫРАВНИВАНИЕ. KALLISTO И PIZZLY

Kallisto – инструмент для оценки сырых данных РНК-секвенирования, осуществляющий процедуру псевдовыравнивания, чтобы подсчитать число выровненных прочтений без проведения выравнивания. Основной подход такого выравнивания – использовать  $k$ -мер транскрипта (часть транскрипта, состоящего из  $k$ -букв) и с применением хэш-таблицы сравнивать, насколько  $k$ -мер, соответствующий данному транскрипту, схож с прочтением [41]. Кроме того, транскрипты сопоставляются с прочтениями, как правило, на основе некоторого статистического порога, поэтому авторы

поменяли постановку вопроса: не где в транскрипте картировано прочтение, а какие транскрипты могли породить такое прочтение.

Рассмотрим, как происходит процедура псевдовыравнивания. Сравнение прочтений секвенирования с транскриптами выполняется с использованием графа де Брюйна. Такой граф строится на основе  $k$ -меров транскриптома, т.е. последовательностей длиной  $k$  букв, выбранных из транскрипта. Каждый такой  $k$ -мер связан с набором транскриптов, для которого этот  $k$ -мер является подпоследовательностью, а набор соответствующих транскриптов – “классом эквивалентности”.

После построения графа де Брюйна создается хэш-таблица, содержащая соответствие между  $k$ -мерами и участками *de novo* собранного транскриптома (контигами), более точно –  $k$ -мер прочтения, имеющий хэш-ключ, наиболее близкий по значению хэш-ключу  $k$ -мера контига транскриптома.

Затем для каждого прочтения РНК-секвенирования берется его подпоследовательность из  $k$ -букв, называемая  $k$ -мером прочтения, и далее, чтобы найти транскрипты, на которые можно картировать прочтение, алгоритм выбирает пересечение по хэш-таблице для всех  $k$ -меров прочтения и всех соответствующих им  $k$ -меров транскриптов (рис. 1).

Таким образом, процедура псевдовыравнивания заключается в том, чтобы обойти по эйлеровому пути граф де Брюйна, содержащий наборы транскриптов, составляющих в сумме весь транскриптом, и сравнить хэш-ключи  $k$ -меров таких транскриптов с хэш-ключами  $k$ -меров прочтений, что осуществляется с помощью EM-алгоритма (максимизации ожидаемого сходства) и позволяет осуществлять сверхбыстрый анализ [41].

Таким образом, каждому прочтению будут соответствовать некоторые множества транскриптов, содержащих этот  $k$ -мер, которые называют классами эквивалентности. Обычному прочтению, которое возникло в ходе секвенирования обычного транскрипта, будет соответствовать хотя бы один транскрипт, следовательно, пересечение прочтения с классами эквивалентности не будет пустым.

Отсюда следует, что прочтению, которое картируется на стыке двух экзонов, не будет соответствовать ни один транскрипт, и его пересечение с классами эквивалентности будет пустым. При должных

настройках Kallisto в режиме поиска гибридных генов находит либо прочтения, которые имеют пустое пересечение с классом эквивалентности, либо такие прочтения, которые можно разбить на две части, где каждая часть будет относиться к своему классу эквивалентности, и при этом полное прочтение нельзя будет отнести ни к одному из классов эквивалентности.

В случае парноконцевого секвенирования (paired-end sequencing) отбираются случаи, когда каждое из пары прочтений имеет непустое пересечение с некоторым классом эквивалентности, но при этом вместе парноконцевые прочтения не имеют общего класса эквивалентности.

На выходе Kallisto выдает список прочтений с соответствующими кандидатами в гибридные гены. Набор фильтров Pizzly, в свою очередь, принимает на вход такой список и, уже придерживаясь геномной аннотации, анализирует список гибридных генов для повышения специфичности метода детекции [42]. Pizzly удаляет прочтения, которые картируются на транскрипты в нескольких геномных локациях, кроме того, удаляются парноконцевые прочтения, которые поддерживают транскрипты одного и того же гена, содержащие однонуклеотидный полиморфизм (SNP) [42].

## 9. ПРОГРАММЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ В ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛИННЫМИ ПРОЧТЕНИЯМИ. JAFFA И JAFFAL

Программа JAFFA специализируется на коротких прочтениях. JAFFA сравнивает и обрабатывает транскриптомные данные, полученные от некоторой раковой линии клеток, и данные эталонного транскриптома, где эталонными считаются транскрипты, полученные из GENCODE [43] (проекта, цель которого – аннотирование всех генов в геномах человека и мыши; является частью более глобального проекта ENCODE (Encyclopaedia of DNA Elements)). Эта программа имеет три режима для поиска гибридных генов:

- 1) режим сборки – короткие прочтения собираются в более длинные транскрипты на этапе, предшествующем поиску гибридов;
- 2) прямой режим – режим, при котором алгоритм использует прочтения для картирования на эталонный транскриптом непосредственно, с последующим отбором гибридных транскриптов;

3) гибридный режим – режим, в котором происходит как сборка транскриптов, так и выявляются прочтения, не соответствующие ни эталонному транскриптому, ни сборке.

Необходимый режим можно выбрать на основании длины прочтения. По умолчанию JAFFA предполагает использование прочтений не короче 60 п.н. и не длиннее 99 п.н., а потому требует, чтобы как минимум 30 нуклеотидов выровнились по обе стороны от точки разрыва, и использует BLAT в качестве картировщика, что соответствует гибричному режиму работы [44, 45].

Для прочтений короче 60 п.н. JAFFA использует режим сборки транскриптов *de novo*, а для прочтений длиннее 100 п.н. и более – прямой режим. Сборка транскриптов *de novo* осуществляется с помощью программных пакетов Oases [46, 47] и Velvet [46, 47], реализующих непосредственную сборку прочтений в контиги.

Вне зависимости от используемого режима работы прочтения выравниваются на геном. Затем прочтения, выравнивающиеся на интронные или межгенные участки, удаляются первыми для улучшения производительности. После этого, в зависимости от длины прочтений, подразумевающих выбранный оптимальный режим, происходит либо сборка транскриптов *de novo* и получаются собранные транскрипты и оставшиеся прочтения, либо прочтения используются непосредственно.

В любом случае – как при наличии сборки *de novo*, так и при ее отсутствии – следующим шагом происходит отбор прочтений, которые выравниваются на несколько генов, и выполняется подсчет числа прочтений, поддерживающих данную точку разрыва. Затем уже потенциальные кандидаты в гибридные гены выравниваются еще раз на геном – для определения координаты точки разрыва. Далее следует этап фильтрации и классификации кандидатов на основе следующих метрик: числа поддерживающих прочтений, выравнивания точек разрыва по границам экзонов, а также величины геномного интервала между собранными транскриптами. В результате фильтрации программа JAFFA представляет список кандидатов в гибриды вместе с их последовательностью.

JAFFAL, в свою очередь, является развитием программы JAFFA для длинных прочтений, генерируемых платформами секвенирования третьего

поколения PacBio [48] и ONT [49, 50]. JAFFAL написан на языке *brpirc*, придуманном специально для работы с биоинформатическими программными инструментами [43, 51, 52]. JAFFAL использует прямой режим, который был ранее описан в JAFFA, и состоит из следующих шагов:

1) прочтения выравниваются посредством алгоритма Minimap2 [53] на эталонный транскриптом (Gencode 22, hg38) [54];

2) прочтения, картированные алгоритмом одновременно на экзоны разных генов, отбираются для дальнейшего анализа;

3) отобранные прочтения повторно выравниваются алгоритмом Minimap2 на эталонный геном hg38. Те прочтения, которые не выравниваются на несколько генов одновременно, удаляются. Этот шаг значительно уменьшает объем анализируемых данных и сокращает время работы;

4) затем кандидаты в гибридные гены повторно выравниваются на геном – для определения координаты точки разрыва. Основным критерий – это выравнивание точек разрыва на соответствующие границы экзонов.

В данной программе считается, что точки разрыва (breakpoints) выравниваются по границам экзонов, если границы экзонов находятся не далее 20 п.н. от исходных точек разрыва выравнивания.

Инсерции и делеции, точки разрыва в теле экзона приводят к тому, что многие прочтения не удовлетворяют условию совпадения координат точки разрыва между прочтениями. Такие прочтения сгруппированы по месту картирования в геноме. В таком случае для каждого кластера назначается такая точка разрыва, которая сохраняет границы экзонов, либо такая точка разрыва, которая имеет самое большое число выровненных прочтений. При этом кластеризация осуществляется посредством перебора всех точек разрыва, не принадлежащих экзонам, начиная с тех точек разрыва, которые имеют наименьшее число выровненных прочтений.

Группа прочтений, соответствующих точке разрыва 1, будет переназначена на ближайшую точку разрыва 2, связанную со второй группой прочтений, если первая группа прочтений находится не далее 50 п.н. При этом если в пределах 50 п.н. не обнаружено другой точки разрыва, будет назначена текущая точка разрыва;

5) в итоге точки разрыва, как и в JAFFA, разбиваются по классам – в соответствии с рангом:

– высокая достоверность – точки разрыва поддерживаются двумя и более прочтениями с такими точками разрыва, при этом точки разрыва совпадают с границами экзонов;

– низкая достоверность – точки разрыва поддерживаются двумя или более прочтениями, но точки разрыва не совпадают с границами экзонов;

– потенциальный *транс*-сплайсинг – точки разрыва поддерживаются единственным прочтением, при этом точки разрыва совпадают с границами экзонов.

Стоит отметить, что в образцах РНК-секвенирования здоровых тканей наблюдаются многочисленные события потенциального *транс*-сплайсинга – такие события должны быть отфильтрованы [43, 55]. Случается, что о некоторых настоящих гибридах JAFFAL сообщает как о потенциальном *транс*-сплайсинге, однако авторы оправдывают это либо низким уровнем экспрессии или низкой долей раковых клеток в тканях солидной опухоли, называемой “чистотой опухоли” (“tumor purity”) [51, 56]. Доля раковых клеток в тканях влияет на последующее РНК-секвенирование и соответствующий анализ. Существующие на данный момент методы нормализации и коррекции не устраняют данную проблему [51, 56].

Также отфильтровываются гибриды, в которых участвует митохондриальная ДНК. Если же точки разрыва находятся в пределах 200 т.п.н., где гены транскрибируются в том же порядке, что и эталонный геном, то прочтения, поддерживающие такие точки разрыва, также отфильтровываются по умолчанию [51, 57].

Для каждой точки разрыва, которая проходит фильтрацию, JAFFAL сообщает следующую информацию:

- задействованные гены;
- геномные координаты;
- число прочтений, подтверждающих слияние;
- соответствующий ранг;
- совпадает ли гибрид с рамкой считывания относительно имеющейся точки разрыва, наблюдалась ли такая точка разрыва ранее в базах данных геномных перестроек Мительмана [51].

Одна из основных особенностей JAFFAL – присваивание прочтению ранга, соответствующе-

щего рангу точки разрыва и с учетом сохранения открытой рамки считывания (ORF) для данной точки разрыва [51, 57].

## 10. LONG GF

Long GF был одним из первых программных инструментов, предназначенных для поиска гибридных транскриптов в транскриптомных или экзомных данных, полученных методом секвенирования длинными прочтениями. Он написан на языке C++ и использует по умолчанию алгоритм Minimap2 [53] для картирования прочтений на транскриптом. Как и некоторые картировщики, обрабатывающие короткие прочтения, Long GF картирует длинные прочтения на эталонный транскриптом, после чего отбирает такие длинные прочтения, которые картируются на несколько генов так, чтобы прочтение, картированное на несколько генов, имело при этом достаточное перекрытие как с первым, так и со вторым геном [58], т.е. ищет прочтения, картирующиеся в несколько мест, и порог перекрытия в таком случае устанавливается пользователем.

При этом в качестве входных данных требуется BAM-файл, содержащий выравненные длинные прочтения (по умолчанию LongGF использует Minimap2 и файл аннотации GTF, содержащий информацию о генах). На выходе же пользователь получает файл с прочтениями, отсортированными по приоритету, которые LongGF соотносит с потенциальными гибридами и сортирует такие гибриды по числу прочтений, поддерживающих гибриды [57, 58].

## 11. FUSIONSEEKER

Одна из недавно выпущенных программ FusionSeeker [59] осуществляет поиск гибридов в данных секвенирования длинными прочтениями. На вход данная программа принимает сортированный файл в формате .bam, который был предварительно выровнен картирующим алгоритмом, например, Minimap2 [53], на геном человека (Genome Reference Consortium Human Build 38 (GRCh38) – эталонная сборка генома версии 38) с версией аннотации № 104 проекта Ensembl (научного проекта, цель которого – поддержка и создание геномных баз данных 50 видов позвоночных, включая человека). После обработки предоставленных данных программа возвращает список кандидатов в гибридные гены и список

*de novo* реконструированных транскриптов (консенсусных последовательностей).

Файл в формате .bam содержит два раздела: раздел “Заголовок” и раздел “Выравнивания”. Раздел “Заголовок” содержит информацию о названии образца, длине образца и методе выравнивания. Раздел “Выравнивания” включает информацию о названии прочтения, хромосоме, начальной координате выравнивания, качестве выравнивания, последовательности прочтения, качестве прочтения и пользовательские теги.

На первом этапе FusionSeeker проверяет файл выравнивания, полученный на входе, и выявляет случаи, когда прочтение выравнивается на число генов большее либо равное двум. В таких случаях каждому прочтению ставятся в соответствие гены, на которые выравнивается такое прочтение [59].

FusionSeeker сообщает о гипотетическом гибриде в том случае, если соблюдаются следующие условия:

- 1) две точки разрыва для прочтения относятся к двум разным генам (*Ген\_1* и *Ген\_2*);
- 2) длина выравнивания для обоих генов превышает 100 п.н. для каждого из генов;
- 3) длина перекрытия между двумя выравниваниями сегментов прочтения, картированных на каждый из генов в отдельности, менее 100 п.н.;
- 4) координаты *Гена\_1* и *Гена\_2* не перекрываются в файле аннотации (.gtf);
- 5) *Ген\_1* не является бессмысленной последовательностью *Гена\_2*.

Затем прочтения кластеризуют так, чтобы каждому гибриду, состоящему из пары или большего числа генов, соответствовал список прочтений, которые картируются на такой гибриде. После того как гипотетическому гибриду (паре генов) поставлены в соответствие прочтения, содержащие сегменты, картированные на такие гены, прочтения кластеризуют на основе точек разрыва. При этом допустимое расстояние между точками разрыва в прочтениях, подтверждающих гибриды, составляет не более 20 п.н. для прочтений HiFi (PacBio High Fidelity reads – прочтения с высоким уровнем достоверности 99.9%, точность совпадения нуклеотидов при секвенировании) и не более 40 п.н. для остальных прочтений [48]. В таком случае точкой разрыва назначается точка, представляющая собой среднее значение среди всех прочтений, поддерживающих гибриды. Эта

процедура осуществляется алгоритмом DBSCAN (Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise) [60].

После этого прочтения фильтруются посредством установки нижней границы для числа прочтений, картирующихся на гибриды, чтобы отсеять прочтения, содержащие большое число ошибок или ошибочно выровненных на гибриды.

По умолчанию минимальное число прочтений рассчитывается как  $N_{min} = N_{can}/50000 + 3$ , где  $N_{can}$  – общее количество кандидатов в гибридные гены, обнаруженных в данном наборе данных. Отметим, что автор не уточняет причины выбора константы 50000 [59].

После фильтрации FusionSeeker осуществляет множественное выравнивание последовательностей прочтений РНК-секвенирования, содержащих кандидаты в гибридный ген, чтобы сгенерировать *de novo* консенсусную последовательность транскрипта с помощью алгоритма bsalgn [61]. Затем консенсусные последовательности собираются в отдельный FASTA-файл, где каждый гибриды имеет свой ID. Далее консенсусные последовательности (транскрипты, собранные *de novo*) выравниваются повторно на геном для уточнения координат точки разрыва. После этого координата точки разрыва, рассчитанная как среднее значение, заменяется на координату точки разрыва, полученную при картировании реконструированного транскрипта *de novo* – для всех прочтений, поддерживающих данный гибриды.

## 12. ДОСТОИНСТВА И НЕДОСТАТКИ АКТУАЛЬНЫХ ПОДХОДОВ К ДЕТЕКЦИИ И ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ И ТРАНСКРИПТОВ. СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СУЩЕСТВУЮЩИХ ПРОГРАММ ДЛЯ ПОИСКА ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ И ИХ ПРОДУКТОВ

Для алгоритмов, описанных выше, проводились сравнительные исследования с точки зрения ресурсоемкости, использованного компьютерного времени, чувствительности и специфичности методов.

Касательно коротких прочтений, размер которых находится в пределах 50–100 п.н., то в следующем исследовании от 2021 г. [28] указывалось, что на сегодняшний день наиболее точным среди алгоритмов картировщиков, выявляющих ранее обнаруженные гибриды, является Arriba. Arriba

совмещает в себе высокий уровень чувствительности и специфичности, а вторым по данным показателям ожидаемо стал STAR-Fusion [24]. Более раннее исследование 2019 г. указывало на то, что, наоборот, наибольшую эффективность имеет STAR-Fusion [21]. Однако оба алгоритма основаны на картирующей программе STAR и отличаются скорее набором фильтров, которые могут играть как положительную роль, повышая точность исследования, так и отрицательную – сокращая чувствительность. Причем, поскольку истинный набор гибридов в транскриптоме опухолевой ткани определить бывает весьма сложно [21], то, в некотором смысле, успех будет зависеть и от качества предоставленных данных и самого образца [21].

STAR-Fusion – один из первых вариантов программ для поиска гибридов, основанных на картирующей программе STAR. Оба алгоритма наиболее быстрые (согласно оценкам авторов исследования [28]), однако стоит отметить, что данный алгоритм потребляет наибольший объем памяти среди всех описанных алгоритмов за счет размера индексных файлов, созданных программой STAR [19].

Отметим также другой подход, позволяющий осуществлять сверхбыстрое сопоставление между прочтениями РНК-секвенирования и эталонным транскриптомом, основанный на псевдовыравнивании.

Программы, использующие данный подход, такие как Kallisto и Pizzly [41, 42], имеют как свои преимущества (в виде высокой скорости и небольшого уровня потребления памяти), так и свои недостатки (например, они не осуществляют локального выравнивания прочтений, как это делает большинство алгоритмов-картировщиков) [21, 41]. Также алгоритмы, основанные на псевдовыравнивании, имеют меньшую точность с точки зрения выявления гибридов [21, 41].

Kallisto и Pizzly пробуют искать максимальную совпадающую с эталоном подпоследовательность, чтобы локализовать местоположение прочтения в эталонном транскриптом, а далее с помощью графа де Брюйна, построенного заранее из последовательностей эталонного транскриптома, – точнее локализовать ген или транскрипт, на который может выравниваться такое прочтение. Локальное выравнивание в таком случае не осуществляется, как это происходит в алгоритмах-картировщиках, осуществ-

ляющих помимо глобального еще и локальное выравнивание [62, 63]. Такой информации достаточно для оценки уровней экспрессии генов в образце. Например, возможно оценить уровень экспрессии хорошо известных генов, у которых уровень экспрессии выше среднего, как, например, у ряда белок-кодирующих генов [63].

Появление технологий секвенирования третьего поколения [48–50], генерирующих прочтения длиной в десятки тысяч пар нуклеотидов (так называемые “длинные” прочтения), потребовало создания новых алгоритмов, позволяющих картировать такие прочтения. Кроме того, это позволило изучать новые изоформы (structural variants) транскриптов, которые ранее невозможно было детектировать [57, 64, 65]. Однако на сегодняшний день технологии длинного секвенирования и алгоритмы, осуществляющие картирование таких прочтений, имеют меньшее геномное покрытие и все еще более высокий уровень ошибок по сравнению с секвенированием короткими прочтениями. В настоящее время наибольшую чувствительность, согласно существующим оценкам, имеет программа FusionSeeker [59], однако более высокую точность показал алгоритм LongGF, как и сравнимую по уровню чувствительность.

Алгоритмы, созданные для работы с длинными прочтениями, вдобавок к гибридам, имеющим строение, похожее на то, что выявлялось ранее, находят, например, гибриды, содержащие большую интронную вставку [56]. Некоторые из существующих программ по выравниванию длинных прочтений разбивают прочтение на несколько подпоследовательностей – сегментов, например, длиной 250 п.н., и выравнивают каждый сегмент в отдельности, другие используют хэширование (см. Дополнительные материалы) для последовательности [63].

На сегодняшний день возможности программ, выявляющих гибриды, ограничены подходами, заложенными в модели поиска и прогноза форм и путей образования гибридов, узкой направленностью по отношению к форматам используемых данных и источниками информации, которые они используют. Так, например, программы, сначала выравнивающие прочтения на эталонную последовательность для идентификации последовательностей, картирующихся в несколько мест, как правило, имеют высокую чувствительность, однако могут быть недоста-

точно специфичными [66]. Поэтому исследователи вынуждены создавать различные типы фильтров, основанные как на объективных критериях (таких как, например, дубликаты прочтений или прочтения, картированные на паралоги генов), так и на вероятностной эвристике разного рода, такой как частота встречаемости однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), уровень экспрессии транскрипта, число прочтений, поддерживающих данную точку разрыва/слияния, и прочие характеристики, которые хотя и ориентированы на экспериментальные данные, но отличаются в зависимости от инструмента и образца [24, 57, 67]. Кроме того, алгоритмы-картировщики, как правило, наиболее ресурсоемкие.

Программы, собирающие прочтения в более длинные транскрипты *de novo* за счет ориентации на предполагаемые продукты экзонов с последующей идентификацией химерных РНК-транскриптов, соответствующих хромосомным перестройкам, могут находить различные новые изоформы гибридных генов. Однако такие программы порождают много искусственных химерных прочтений, которые бывает сложно выявить. Кроме того, этот подход также весьма ресурсоемкий [67].

Программы, использующие псевдовыравнивание на транскриптом с целью идентификации химерных транскриптов, – как правило, самые быстрые алгоритмы, но при этом наименее точные и более других основаны на вероятностном подходе [42].

Все программы различаются по объемам используемого времени и оперативной памяти компьютера, по скорости вычислений и имеют значительные различия как с точки зрения “прогностической эффективности”, так и с точки зрения сопоставимости результатов работы алгоритма. Это происходит ввиду различных моделей и источников используемой информации, а также специфичной работы самой программы и ее алгоритма. Существующие на данный момент инструменты, кроме прочего, производят ограниченное количество совпадающих между самими программами экспериментально валидированных результатов. Тем не менее с важными с точки зрения поиска гибридов характеристиками, такими как чувствительность и специфичность алгоритмов, для всех описанных в статье алгоритмов, можно ознакомиться в табл. 1–4.

### 13. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ПРОГРАММ И МЕТОДОВ ПОИСКА ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ И ИХ ПРОДУКТОВ

На сегодняшний день все большее распространение получают программы, сочетающие в себе результаты секвенирования как с помощью длинных, так и с помощью коротких прочтений. С одной стороны, это обосновано фундаментальным интересом в отношении наличия любых других форм гибридных генов и их транскриптов, а также необходимостью изучения молекулярных взаимодействий, которые такие мультисегментные формы транскриптов, содержащие некоторую вставку (например, интронную), способны породить; с другой стороны – повышением качества данных, которые получаются в результате секвенирования [57]. Однако существуют и более узкие задачи, которые также имеют важное приложение, например, в клинической практике, где онкологические образцы часто представлены в виде фиксированных формалином парафинизированных тканей [68], в которых длинное секвенирование (5000–100000 п.н.) может быть не оправдано ввиду коротких фрагментов РНК (не более 300 п.н. на фрагмент), содержащихся в самой ткани после такой обработки [69].

В связи с ежегодным увеличением вычислительной мощности компьютеров, авторам настоящего обзора также видится, что развитие методов картирования продолжится в сторону уменьшения ресурсоемкости, а также увеличения чувствительности и специфичности для усиления прогностической ценности имеющихся моделей [70].

### 14. ОБСУЖДЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ И ОГРАНИЧЕНИЙ СУЩЕСТВУЮЩИХ ПРОГРАММ ДЛЯ ПОИСКА ГИБРИДОВ И ИХ ПРОДУКТОВ

Стоит отметить, что алгоритмы, используемые для поиска гибридов, также ориентируются на протокол проведения эксперимента, т.е. на то, какое секвенирование выбрано (одноконцевое или парноконцевое), какой длины прочтения рассматриваются (от десятков до тысяч пар оснований), специфично ли такое секвенирование относительно направления цепи (*strand-specific*) или не специфично. С помощью секвенирования длинными прочтениями можно находить сложные формы мультисегментных гибридов, например, гибридов, содержащих интронную вставку. В то же время короткие прочтения часто имеют более высокую чувствительность по сравнению

**Таблица 1.** Сравнение чувствительности (%) программ, использующих короткие прочтения РНК-секвенирования, на синтетических наборах данных для инструментов Fusion-Bloom, JAFFA, STAR-Fusion и pizzly в зависимости от концентрации гибрида в образце

Образцы	Молярность, $-\log_{10}$ пкмоль	Чувствительность*, %			
		Fusion-Bloom	JAFFA	STAR-Fusion	pizzly
SRR1659951	3.47	100	89	100	100
SRR1659961	4.17	100	89	100	100
SRR1659953	4.87	100	89	100	100
SRR1659963	5.57	100	89	100	100
SRR1659959	5.87	100	89	100	100
SRR1659964	6.17	100	89	100	100
SRR1659965	6.57	100	89	100	100
SRR1659957	6.87	100	89	100	78
SRR1659958	7.17	100	89	100	89
SRR1548811	8.57	100	78	100	78

Примечание: таблица сравнения приведена в сокращенном виде из дополнительных материалов статьи Chiu et al. [36], в которой сравнение чувствительности алгоритмов проводилось на синтетических образцах из статьи Tembe et al. [75], в которых присутствовали уже хорошо изученные девять гибридов (EWS-ATF1, TMPRSS2-ETV1, EWS-FLI1, NTRK3-ETV6, CD74-ROS1, HOOK3-RET, EML4-ALK, AKAP9-BRAF, BRD4-NUT) в разной концентрации в образце.

\* Чувствительность =  $(TP/9) \times 100$ , где TP – число верно найденных гибридов, 9 – общее число гибридов в каждом образце [36].

**Таблица 2.** Сравнение чувствительности программ, использующих короткие прочтения РНК-секвенирования для поиска гибридов в наборах данных реальных 56 раковых транскриптомов\* для инструментов Arriba, STAR-Fusion, JAFFA, Pizzly

Название инструмента	Чувствительность, %	Специфичность, %	Ссылки
Arriba	80	63	[28]
STAR-Fusion	85	78	[24]
JAFFA-Assembly**	65	47	[43]
JAFFA-Direct**	78	35	[43]
JAFFA-Hybrid**	60	20	[43]
Pizzly	48	44	[42]

Примечание: расчеты в таблице сравнения сделаны на основе материалов статьи Naas et al. [21]. Чувствительность =  $(TP/(TP+FN)) \times 100$ ; Специфичность =  $(FP/(FP+TP)) \times 100$ ; где TP – число гибридов, найденное всеми шестью программами; FP – число гибридов, не найденное другими программами, но найденное текущей программой; FN – число гибридов, не найденное текущей программой, но найденное остальными программами из набора (TP).

\* Поскольку истинный набор гибридов в транскриптоме раковых клеток определить на данный момент нельзя, в статье используется принцип согласованности программ: гибрид считается истинным, если он подтверждается вышеуказанными программами одновременно [21].

\*\* JAFFA-Assembly, JAFFA-Direct, JAFFA-Hybrid – три различных режима поиска гибридов программы JAFFA.

**Таблица 3.** Сравнение чувствительности программ, использующих длинные прочтения РНК-секвенирования, на синтетических наборах данных для инструментов JAFFAL, FusionSeeker и LongGF в зависимости от уровня экспрессии гипотетического гибрида в образце

Название инструмента	Номер образца*	Тип прочтений						Ссылки
		PacBio IsoSeq			ONT			
		Уровень экспрессии			Уровень экспрессии			
		высокий (100×)	средний (50×)	низкий (10×)	высокий (100×)	средний (50×)	низкий (10×)	
Чувствительность, %								
FusionSeeker	Образец 1	96.00	97.96	90.20	98.00	100.0	100.0	[59]
	Образец 2	100.0	94.12	88.64	100.0	98.04	95.45	
	Образец 3	100.0	100.0	91.84	100.0	100.0	100.0	
	Среднее	98.67	97.36	90.22	99.33	99.35	98.48	
JAFFAL	Образец 1	54.00	55.10	33.33	62.00	57.14	35.29	[51]
	Образец 2	49.09	56.86	43.18	52.73	62.75	45.45	
	Образец 3	57.45	57.41	53.06	61.70	61.11	53.06	
	Среднее	53.51	56.46	43.19	58.81	60.33	44.60	
LongGF	Образец 1	82.00	85.71	64.71	84.00	87.76	70.59	[58]
	Образец 2	81.82	86.27	90.91	81.82	90.20	90.91	
	Образец 3	80.85	81.48	87.76	80.85	81.48	91.84	
	Среднее	81.56	84.49	81.12	82.22	86.48	84.44	

Примечание: сравнение чувствительности приведено из дополнительных материалов статьи Chen et al. [59]. Алгоритм картирования прочтений во всех трех случаях – Minimap2 [53], для PacBio Isoseq гибриды смоделированы с помощью Badread (v0.2.0) [76]; для ONT (Nanopore) – с помощью pbsim [77].

\* Образец здесь указан в качестве повторности: для каждого образца генерировался свой набор гибридов по следующему принципу: общее число искусственных гибридов составляло 150, причем 100 имели точку разрыва в экзоне, а 50 – в интроне. Каждому гибриду был случайно присвоен разный уровень экспрессии из трех возможных: 10×, 50× или 100×. Чувствительность (%) = (TP/150) × 100, где TP – число верно найденных гибридов, 150 – общее число сгенерированных истинных гибридов.

**Таблица 4.** Сравнение точности программ, использующих длинные прочтения РНК-секвенирования, на синтетических наборах данных для инструментов JAFFAL, FusionSeeker и LongGF в зависимости от уровня экспрессии гипотетического гибрида в образце

Название инструмента	Номер образца*	Тип прочтений						Ссылки
		PacBio IsoSeq			ONT			
		уровень экспрессии			уровень экспрессии			
		высокий (100×)	средний (50×)	низкий (10×)	высокий (100×)	средний (50×)	низкий (10×)	
точность, %								
FusionSeeker	Образец 1	94.56	65.31	29.25	92.81	61.44	31.37	[59]
	Образец 2	93.29	61.74	31.54	88.41	58.54	29.88	
	Образец 3	94.63	63.76	30.87	91.82	61.64	30.19	
	Среднее	94.16	63.60	30.56	91.02	60.54	30.48	
JAFFAL	Образец 1	82.56	79.07	3.49	82.80	76.34	6.45	[51]
	Образец 2	78.13	70.83	7.29	75.00	67.59	7.41	
	Образец 3	87.50	75.00	12.50	88.89	75.76	13.13	
	Среднее	82.73	74.97	7.76	82.23	73.23	9.00	
LongGF	Образец 1	96.67	78.33	18.33	96.03	76.19	19.84	[58]
	Образец 2	94.85	70.59	24.26	94.24	70.50	23.74	
	Образец 3	96.90	75.97	20.93	95.49	75.19	20.30	
	Среднее	96.14	74.96	21.18	95.26	73.96	21.29	

Примечание: таблица сравнения точности приведена по данным статьи Chen et al. [59]. Алгоритм картирования прочтений во всех трех случаях – Minimap2 [53]. Для PacBio Isoseq гибриды смоделированы с помощью Badread (v0.2.0) [76], для ONT (Nanopore) – с помощью pbsim [77].

\* Образец указан в качестве повторности: для каждого образца генерировался свой набор гибридов по следующему принципу: общее число искусственных гибридов составляло 150, причем 100 имели точку разрыва в экзоне, а 50 – в интроне. Каждому гибриду был случайно присвоен разный уровень экспрессии из трех возможных: 10×, 50× или 100×. Точность (%) = (TP/TP + FP) × 100, где TP – число верно найденных гибридов, FP – число ложноположительных гибридов.

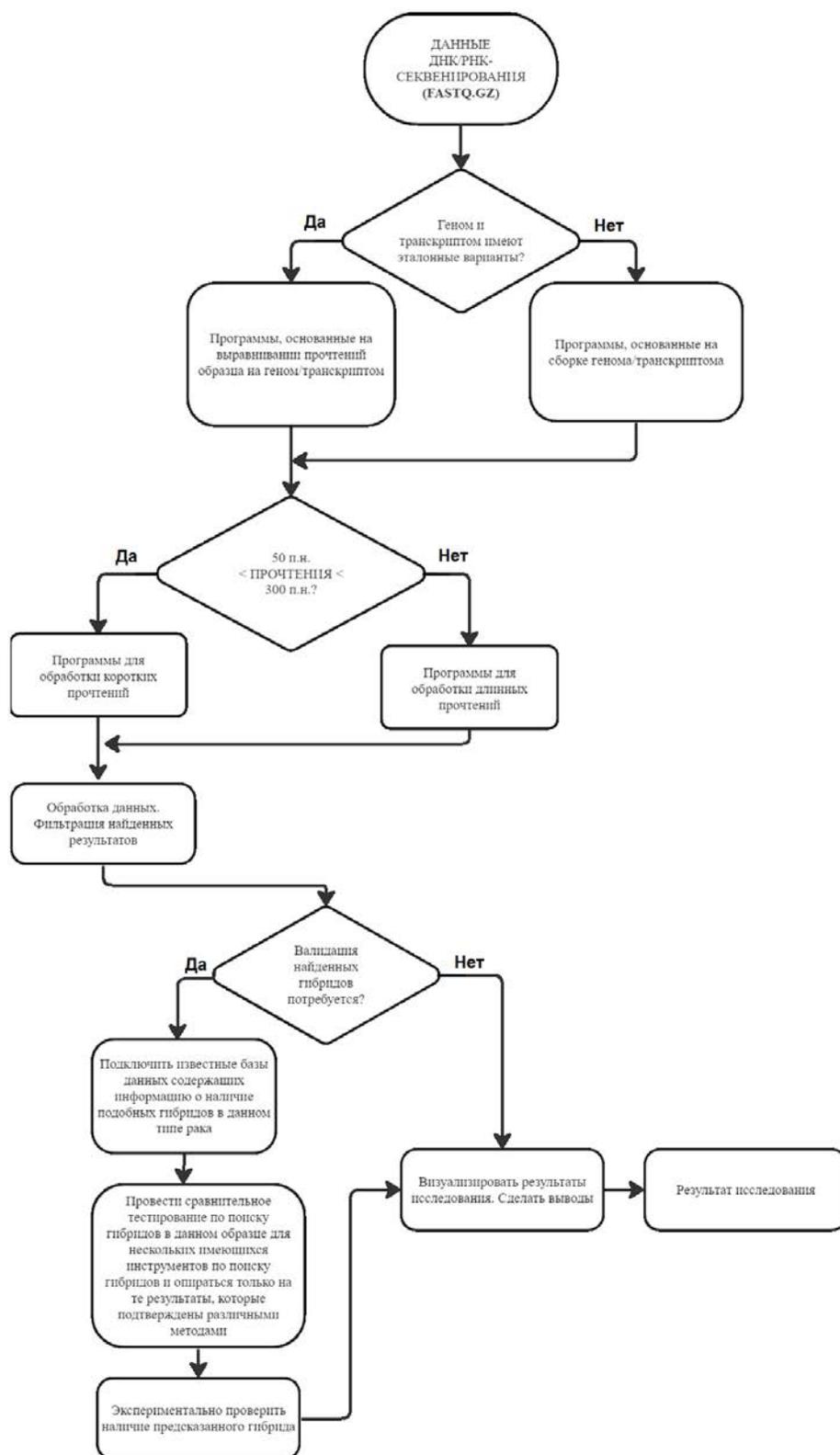


Схема 1. Общая схема действий при исследовании образца ДНК/РНК-секвенирования на наличие гибридов.

с секвенированием длинными прочтениями [57]. Для удобства использования имеющихся знаний об алгоритмах и составлении плана обработки различных наборов данных секвенирования с целью поиска новых или уже известных гибридов авторы настоящего обзора подготовили схему 1.

Проблема создания эффективного поиска гибридов алгоритмом заключается в том, что качество работы алгоритма фактически оценивается по тому, насколько хорошо такой алгоритм выявляет уже ранее найденные экспериментально гибриды. Это фактически ограничивает “прогностическую” способность алгоритма и сводит его работу к выявлению ранее незамеченных гибридов, формирование которых потенциально подчиняется определенным закономерностям, детектируемым компьютерно [71]. При этом алгоритмы в больших массивах данных могут находить ранее не известные гибриды, которые валидируются исключительно экспериментально, что является дополнительным ограничением компьютерных методов. Тем не менее, даже несмотря на такие сильные ограничения с точки зрения исследования, компьютерные методы не ограничены в гипотезах о закономерностях, которые выявляются с их помощью. Поэтому задача биоинформатики в этом смысле заключается в создании таких алгоритмов, которые бы эффективно связывали и устанавливали закономерности формирования таких гибридов, которые невозможно детектировать без компьютера. Кроме того, необходимо с использованием различных гипотез и моделей выстроить такую систему, которая позволила бы эффективнее ставить экспериментальные цели и видеть исследование на шаг вперед.

Более того, поскольку поиск гибридов осуществлялся в разные годы разными методами, образцы хранились по-разному, и сами эксперименты проводились разными людьми, часто возникает проблема сравнения данных, полученных тем или иным способом. Для этого на сегодняшний момент разрабатываются так называемые “гармонизаторы” данных, т.е. программы, позволяющие при определенной обработке сравнивать данные, полученные разными способами [72–74].

## 15. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день наиболее быстрыми и эффективными из существующих программ для поиска гибридных генов являются программы-картировщики, такие как STAR-Fusion и Arriba. Другой интересный подход использует программы-

сборщики транскриптома, такие как Fusion-Bloom, которые способны эффективно определять изоформы транскриптов, слабо представленные в референсной ДНК: например, последовательности бактериальных и вирусных геномов. Наконец, наиболее быстрыми, но вместе с тем наименее точными являются программы, основанные на псевдовыравнивании (Kallisto, Pizzly), которые при должной фильтрации могут обеспечить эффективное выявление гибридов. С учетом развития технологий секвенирования для анализа образцов нуклеиновых кислот высокого качества перспективными выглядят алгоритмы, работающие с длинными прочтениями, такие как LONG GF и FusionSeeker, при этом на текущий момент первый имеет наибольшую точность, а второй – наибольшую чувствительность.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Статья подготовлена на основании результатов, полученных в ходе реализации Соглашения о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научных центров мирового уровня, выполняющих исследования и разработки по приоритетам научно-технологического развития от 20 апреля 2022 г. № 075-15-2022-310.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barresi V., Cosentini I., Scuderi C., Napoli S., Di Bella V., Spampinato G., Condorelli D.F. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. E5252. <https://doi.org/10.3390/ijms20215252>
2. Friedrich S., Sonnhammer E.L.L. // *BMC Med. Genomics.* 2020. V. 13. P. 110., <https://doi.org/10.1186/s12920-020-00738-5>
3. Sun Y., Li H. // *Genes (Basel).* 2022. V. 13. P. 741. <https://doi.org/10.3390/genes13050741>
4. Li Z., Qin F., Li H. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2018. V. 48. P. 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.10.002>

5. Xie Z., Babiceanu M., Kumar S., Jia Y., Qin F., Barr F.G., Li H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. 13126–13131.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1612734113>
6. Shtivelman E., Lifshitz B., Gale R.P., Canaani E. // Nature. 1985. V. 315. P. 550–554.  
<https://doi.org/10.1038/315550a0>
7. Pagani I.S., Dang P., Kommers I.O., Goyne J.M., Nicola M., Saunders V.A., Braley, J., White D.L., Yeung D.T., Branford S., Hughes T.P., Ross D.M. // Haematologica. 2018. V. 103. P. 2026–2032.  
<https://doi.org/10.3324/haematol.2018.189787>
8. Zhou T., Medeiros L.J., Hu S. // Curr. Hematol. Malig. Rep. 2018. V. 13. P. 435–445.  
<https://doi.org/10.1007/s11899-018-0474-6>
9. Mertens F., Johansson B., Fioretos T., Mitelman F. // Nat. Rev. Cancer. 2015. V. 15. P. 371–381.  
<https://doi.org/10.1038/nrc3947>
10. Sorokin M., Rabushko E., Rozenberg J.M., Mohamad T., Seryakov A., Sekacheva M., Buzdin A. // Ther. Adv. Med. Oncol. 2022. V. 14. P. 108.  
<https://doi.org/10.1177/17588359221144108>
11. Salokas K., Dashi G., Varjosalo M. // Cancers (Basel). 2023. V. 15. P. 3678.  
<https://doi.org/10.3390/cancers15143678>
12. Stransky N., Cerami E., Schalm S., Kim J.L., Lengauer C. // Nat. Commun. 2014. V. 5. P. 4846.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms5846>
13. Salokas K., Weldatsadik R.G., Varjosalo M. // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 14169.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71040-8>
14. Chu Y.-H. // Surg. Pathol. Clin. 2023. V. 16. P. 57–73.  
<https://doi.org/10.1016/j.path.2022.09.007>
15. Nagy Z., Jeselsohn R. // Front. Oncol. 2022. V. 12. P. 1037531.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1037531>
16. Apfelbaum A.A., Wrenn E.D., Lawlor E.R. // Front. Oncol. 2022. V. 12. P. 1044707.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1044707>
17. Bowling G.C., Rands M.G., Dobi A., Eldhose B. // Mol. Cancer Ther. 2023. V. 22. P. 168–178.  
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-22-0527>
18. Shen Z., Qiu B., Li L., Yang B., Li G. // Front. Oncol. 2022. V. 12. P. 1033484.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1033484>
19. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. // Bioinformatics. 2013. V. 29. P. 15–21.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
20. Петров С.Н., Урошлев Л.А., Касьянов А.С., Макеев В.Ю. // Мол. биофизика. 2018. Т. 63. С. 421–429.
21. Haas B.J., Dobin A., Li B., Stransky N., Pochet N., Regev A. // Genome Biol. 2019. V. 20. P. 213.  
<https://doi.org/10.1186/s13059-019-1842-22>
22. Nurk S., Bankevich A., Antipov D., Gurevich A.A., Korobeynikov A., Lapidus A., Prjibelski A.D., Pyshkin A., Sirotkin A., Sirotkin Y., Stepanauskas R., Clingenpeel S.R., Woyke T., McLean J.S., Lasken R., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. // J. Comput. Biol. 2013. V. 20. P. 714–737.  
<https://doi.org/10.1089/cmb.2013.0084>
23. Benoit-Pilven C., Marchet C., Chautard E., Lima L., Lambert M.-P., Sacomoto G., Rey A., Cologne A., Terrone S., Dulaurier L., Claude J.-B., Bourgeois C.F., Auboef D., Lacroix V. // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 4307.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21770-7>
24. Haas B., Dobin A., Stransky N., Li B., Yang X., Tickle T., Bankapur A., Ganote C., Doak T., Pochet N., Sun J., Wu C., Gingeras T., Regev A. // BioRxiv. 2017. P. 120295.  
<https://doi.org/10.1101/120295>
25. Križanovic K., Echchiki A., Roux J., Šikic M. // Bioinformatics. 2018. V. 34. P. 748–754.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx668>
26. Chen Y., Ye W., Zhang Y., Xu Y. // Nucleic Acids Res. 2015. V. 43. P. 7762–7768.,  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv784>
27. Conesa A., Madrigal P., Tarazona S., Gomez-Cabre-ro D., Cervera A., McPherson A., Szczesniak M.W., Gaffney D.J., Elo L.L., Zhang X., Mortazavi A. // Genome Biol. 2016. V. 17. P. 13.  
<https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>
28. Uhrig S., Ellermann J., Walther T., Burkhardt P., Fröhlich M., Hutter B., Toprak U.H., Neumann O., Stenzinger A., Scholl C., Fröhling S., Brors B. // Genome Res. 2021. V. 31. P. 448–460.  
<https://doi.org/10.1101/gr.257246.119>
29. Uhlén M., Fagerberg L., Hallström B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson Å., Kampf C., Sjöstedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szigartyo C.A., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J.O., Hober S., Alm T., Pontén F. // Science. 2015. V. 347. P. 1260419.  
<https://doi.org/10.1126/science.1260419>
30. Barbosa-Morais N.L., Irimia M., Pan Q., Xiong H.Y., Gueroussov S., Lee L.J., Slobodeniuc V., Kutter C., Watt S., Colak R., Kim T., Misquitta-Ali C.M., Wilson M.D., Kim P.M., Odom D.T., Frey B.J., Blencowe B.J. // Science. 2012. V. 338. P. 1587–1593.  
<https://doi.org/10.1126/science.1230612>

31. Expression Atlas. RNA-Seq of human individual tissues and mixture of 16 tissues (Illumina Body Map). <https://www.ebi.ac.uk/gxa/experiments/E-MTAB-513/Results>
32. ENCODE Project Consortium // A User's Guide to the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. P. e1001046. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001046>
33. Roadmap Epigenomics Consortium, Kundaje A., Meuleman W., Ernst J., Bilenky M., Yen A., Heravi-Moussavi A., Kheradpour P., Zhang Z., Wang J., Ziller M.J., Amin V., Whitaker J.W., Schultz M.D., Ward L.D., Sarkar A., Quon G., Sandstrom R.S., Eaton M.L., Wu Y.-C., Kellis M. // *Nature.* 2015. V. 518. P. 317–330. <https://doi.org/10.1038/nature14248>
34. Jahn A., Rump A., Widmann T.J., Heining C., Horak P., Hutter B., Paramasivam N., Uhrig S., Gieldon L., Drukewitz S., Kübler A., Bermudez M., Hackmann K., Porrmann J., Wagner J., Arlt M., Franke M., Fischer J., Kowalzyk Z., William D., Klink B. // *Ann. Oncol.* 2022. V. 33. P. 1186–1199. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.07.008>
35. Arriba. Documentation: workflow, internal algorithm, visualization. <https://arriba.readthedocs.io/en/latest/visualization/>
36. Chiu R., Nip K.M., Birol I. // *Bioinformatics.* 2020. V. 36. P. 2256–2257. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz902>
37. Nip K.M., Chiu R., Yang C., Chu J., Mohamadi H., Warren R.L., Birol I. // *BioRxiv.* 2019. P. 701607. <https://doi.org/10.1101/701607>
38. PAVFinder – Post Assembly Variants Finder (Github). <https://github.com/bcgsc/pavfinder>
39. Quinlan A.R., Hall I.M. // *Bioinformatics.* 2010. V. 26. P. 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
40. Aaron R. Quinlan, Ira M. // Hall. *Bedtools 2.31.0 // BEDTools\_documentation. BEDPE Format.* 2010. <https://bedtools.readthedocs.io/en/latest/content/general-usage.html#bedpe-format>
41. Bray N.L., Pimentel H., Melsted P., Pachter L. // *Nat. Biotechnol.* 2016. V. 34. P. 525–527. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>
42. Melsted P., Hateley S., Joseph I.C., Pimentel H., Bray N., Pachter L. // *bioRxiv.* 2017. P. 166322. <https://doi.org/10.1101/166322>
43. Frankish A., Diekhans M., Jungreis I., Lagarde J., Loveland J.E., Mudge J.M., Sisu C., Wright J.C., Armstrong J., Barnes I., Berry A., Bignell A., Boix C., Carbonell Sala S., Cunningham F., Di Domenico T., Donaldson S., Fiddes I.T., Garcia Girón C., Gonzalez J.M., Flicek P. // *Nucleic Acids Res.* 2021. V. 49. P. D916–D923. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1087>
44. Davidson N.M., Majewski I.J., Oshlack A. // *Genome Med.* 2015. V. 7. P. 43. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0167-x>
45. Kent W.J. // *Genome Res.* 2002. V. 12. P. 656–664. <https://doi.org/10.1101/gr.229202>
46. Schulz M.H., Zerbino D.R., Vingron M., Birney E. // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. P. 1086–1092. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts094>
47. Zerbino D.R., Birney E. // *Genome Res.* 2008. V. 18. P. 821–829. <https://doi.org/10.1101/gr.074492.107>
48. Hon T., Mars K., Young G., Tsai Y.-C., Karalius J.W., Landolin J.M., Maurer N., Kudrna D., Hardigan M.A., Steiner C.C., Knapp S.J., Ware D., Shapiro B., Peluso P., Rank D.R. // *Sci. Data.* 2020. V. 7. P. 399. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-00743-4>
49. Logsdon G.A., Vollger M.R., Eichler E.E. // *Nat. Rev. Genet.* 2020. V. 21. P. 597–614. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0236-x>
50. Kasianowicz J.J., Brandin E., Branton D., Deamer D.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 13770–13773. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13770>
51. Davidson N.M., Chen Y., Sadras T., Ryland G.L., Blombery P., Ekert P.G., Göke J., Oshlack A. // *Genome Biol.* 2022. V. 23. P. 10. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02588-5>
52. Sadedin S.P., Pope B., Oshlack A. // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. P. 1525–1526. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts167>
53. Li H. // *Bioinformatics.* 2018. V. 34. P. 3094–3100. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191>
54. Harrow J., Frankish A., Gonzalez J.M., Tapanari E., Diekhans M., Kokocinski F., Aken B.L., Barrell D., Zaidissa A., Searle S., Barnes I., Bignell A., Boychenko V., Hunt T., Kay M., Mukherjee G., Rajan J., Despacio-Reyes G., Saunders G., Steward C., Hubbard T.J. // *Genome Res.* 2012. V. 22. P. 1760–1774. <https://doi.org/10.1101/gr.135350.111>
55. Lei Q., Li C., Zuo Z., Huang C., Cheng H., Zhou R. // *Genome Biol. Evol.* 2016. V. 8. P. 562–577. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw025>
56. Molania R., Foroutan M., Gagnon-Bartsch J.A., Gandolfo L.C., Jain A., Sinha A., Olshansky G., Dobrovic A., Papenfuss A.T., Speed T.P. // *Nat. Biotechnol.* 2023. V. 41. P. 82–95. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01440-w>

57. Dorney R., Dhungel B.P., Rasko J.E.J., Hebbard L., Schmitz U. // *Brief. Bioinformatics*. 2023. V. 24. <https://doi.org/10.1093/bib/bbac519>
58. Liu Q., Hu Y., Stucky A., Fang L., Zhong J.F., Wang K. // *BMC Genomics*. 2020. V. 21. P. 793. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07207-4>
59. Chen Y., Wang Y., Chen W., Tan Z., Song Y., Human Genome Structural Variation Consortium, Chen H., Chong Z. // *Cancer Res*. 2023. V. 83. P. 28–33. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-1628>
60. Ester M., Kriegel H.-P., Sander J., Xu X.A. // *KDD'96: Proceedings of the Second International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*. 1996. P. 226–231. <https://dl.acm.org/doi/10.5555/3001460.3001507>
61. GitHub – ruanjue/bsalign: Banded Striped DNA Sequence Alignment. <https://github.com/ruanjue/bsalign>
62. Illumina Online Support Service – RNAseq Analysis Methods – STAR. [https://support.illumina.com/help/BS\\_App\\_RNA-Seq\\_Alignment\\_OLH\\_1000000006112/Content/Source/Informatics/STAR\\_RNAseq.htm](https://support.illumina.com/help/BS_App_RNA-Seq_Alignment_OLH_1000000006112/Content/Source/Informatics/STAR_RNAseq.htm)
63. Alser M., Rotman J., Deshpande D., Taraszka K., Shi H., Baykal P.I., Yang H.T., Xue V., Knyazev S., Singer B.D., Balliu B., Koslicki D., Skums P., Zelikovsky A., Alkan C., Mutlu O., Mangul S. // *Genome Biol*. 2021. V. 22. P. 249. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02443-7>
64. Jain M., Koren S., Miga K.H., Quick J., Rand A.C., Sasani T.A., Tyson J.R., Beggs A.D., Dilthey A.T., Fiddes I.T., Malla S., Marriott H., Nieto T., O'Grady J., Olsen H.E., Pedersen B.S., Rhee A., Richardson H., Quinlan A.R., Snutch T.P., Loose M. // *Nat. Biotechnol*. 2018. V. 36. P. 338–345. <https://doi.org/10.1038/nbt.4060>
65. Merker J.D., Wenger A.M., Sneddon T., Grove M., Zappala Z., Fresard L., Waggott D., Utiramerur S., Hou Y., Smith K.S., Montgomery S.B., Wheeler M., Buchan J.G., Lambert C.C., Eng K.S., Hickey L., Korlach J., Ford J., Ashley E.A. // *Genet. Med*. 2018. V. 20. P. 159–163. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.86>
66. Carrara M., Beccuti M., Lazzarato F., Cavallo F., Cordero F., Donatelli S., Calogero R.A. // *Biomed Res. Int*. 2013. V. 2013. P. 340620. <https://doi.org/10.1155/2013/340620>
67. Kumar S., Razzaq S.K., Vo A.D., Gautam M., Li H. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 2016. V. 7. P. 811–823. <https://doi.org/10.1002/wrna.1382>
68. Suntsova M., Gaifullin N., Allina D., Reshetun A., Li X., Mendeleeva L., Surin V., Sergeeva A., Spirin P., Prassolov V., Morgan A., Garazha A., Sorokin M., Buzdin A. // *Sci. Data*. 2019. V. 6. P. 36. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0043-4>
69. Yi Q.-Q., Yang R., Shi J.-F., Zeng N.-Y., Liang D.-Y., Sha S., Chang Q. // *J. Int. Med. Res*. 2020. V. 48. P. 1259. <https://doi.org/10.1177/0300060520931259>
70. Langmead B., Salzberg S.L. // *Nat. Methods*. 2012. V. 9. P. 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
71. Rabushko E., Sorokin M., Suntsova M., Seryakov A.P., Kuzmin D.V., Poddubskaya E., Buzdin A.A. // *Bio-medicines*. 2022. V. 10. P. 1866. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081866>
72. The Harmonizome 3.0: Integrated Knowledge about Genes and Proteins. <https://maayanlab.cloud/Harmonizome/about>
73. Rouillard A.D., Gundersen G.W., Fernandez N.F., Wang Z., Monteiro C.D., McDermott M.G., Ma'ayan A. // *Database (Oxford)*. 2016. V. 2016. P. baw100. <https://doi.org/10.1093/database/baw100>
74. Borisov N., Buzdin A. // *Biomedicines*. 2022. V. 10. P. 2318. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092318>
75. Tembe W.D., Pond S.J., Legendre C., Chuang H.Y., Liang W.S., Kim N.E., Montel V., Wong S., McDaniel T.K., Craig D.W., Carpten J.D. // *BMC Genomics*. 2014. V. 15. P. 824. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-824>
76. Wick R.R. // *J. Open Source Software*. 2019. V. 4. P. 1316. <https://doi.org/10.21105/joss.01316>
77. Yukiteru O., Kiyoshi A., Michiaki H. // *Bioinformatics*. 2013. V. 29. P. 119–121. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts649>

# Bioinformatic Approaches for Detection of Fusion Genes and *Trans*-Splicing Products

I. Yu. Musatov<sup>\*, \*\*, #</sup>, M. I. Sorokin<sup>\*\*</sup>, and A. A. Buzdin<sup>\*, \*\*\*, \*\*\*\*</sup>

<sup>#</sup> Phone: +7 (985) 147-97-18; e-mail: musatov.mailbox@yandex.ru

<sup>\*</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia

<sup>\*\*</sup> Institute for Personalized Oncology of World-Class Research Center “Digital Biodesign and Personalized Healthcare”, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119048 Russia

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

<sup>\*\*\*\*</sup> Endocrinology Research Centre, ul. Dm. Ulyanova 11, Moscow, 117292 Russia

Chimeric genes and transcripts can be biological markers as well as the reasons for tumor progression and development. Modern algorithms and high-throughput sequencing are the complementary clues to the question of the tumor origin and cancer detection as well as to the fundamental question of chimeric genes origin and their influence on molecular processes of the cell. A wide-range of algorithms for chimeric genes detection was developed, with various differences in computing speed, sensitivity, specificity, and focus on the experimental design. There exist three main types of bioinformatic approaches, which act according to the sequencing read length. Algorithms, which focus on short-read high-throughput sequencing (about 50–300 bp of read length) or long-read sequencing (about 5000–100000 bp of read length) exclusively or algorithms, which combine the results of both short and long-read sequencing. These algorithms are further subdivided into: 1) mapping-first approaches (STAR-Fusion, Arriba), which map reads to the genome or transcriptome directly and search the reads supporting the fused gene or transcript; 2) assembly-first approaches (Fusion-Bloom), which assemble the genome or transcriptome from the overlapping reads, and then compare the results to the reference transcriptome or genome to find transcripts or genes not present in the reference and therefore raising questions; 3) pseudoalignment approaches, which do not make local alignment, but just search for the closest transcript subsequence to the reads seed, following the precomputed index for all reference transcripts and provides the results. This article describes the main classes of available software tools for chimeric gene detection, provides the characteristics of these programs, their advantages and disadvantages. To date the most resource intensive and slowest are still assembly-first algorithms. Mapping-first approaches are quite fast and rather accurate at fusion detection, still the fastest and resource-saving are the pseudoalignment algorithms, but, worth noting, that the quick search is carried out at the expense of chimeras search quality decrease.

*Keywords:* RNAseq, chimeric genes, chimeric transcripts, tumor, FFPE samples, pseudoalignment, genome de novo assembly, transcriptome de novo assembly, trans-splicing



УДК 547.915.5

# СИНТЕЗ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЛИПОФИЛЬНЫХ КОНСТРУКТОВ

© 2024 г. Д. О. Анисимова\*, М. С. Савченко\*, А. Б. Тузиков\*, А. С. Парамонов\*,  
А. О. Чижов\*\*, Н. В. Бовин\*, И. М. Рыжов\*, #

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

\*\* Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Россия, 119991, Москва, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 27.11.2023 г.

После доработки 09.12.2023 г.

Принята к публикации 10.12.2023 г.

Способность гликолипидов встраиваться в мембрану живых клеток открывает возможность модифицировать клеточную поверхность синтетическими аналогами, несущими заданный гликан (или другой молекулярный фрагмент). Для отслеживания местоположения введенных таким образом в состав мембраны гликанов с помощью конфокальной микроскопии используют соответствующие флуоресцентно-меченные антитела. Ди- (IgG) и тем более декавалентные (IgM) молекулы антител способны существенно исказить распределение гликолипида в мембране, поэтому необходима прямая визуализация встроенных липофильных конструкторов, для чего флуоресцентная метка должна быть введена непосредственно в их состав и при этом находиться на достаточном расстоянии от углеводного фрагмента. В данной работе предложены и реализованы два подхода к получению синтетических липофильных конструкторов, содержащих тетрасахарид (А тип 2) и флуоресцентную метку: в одном случае флуоресцеин, а в другом – сульфоцианин-3.

*Ключевые слова:* гликолипид, флуоресцеин, сульфоцианин-3, тетрасахарид А (тип 2), диолеилфосфатидилэтаноламин, карбоксиметилглицин, клик-химия

DOI: 10.31857/S0132342324030046, EDN: OABYOT

## ВВЕДЕНИЕ

Способность гликолипидов (ГЛ) самопроизвольно встраиваться в клеточную мембрану из межклеточной среды [1] открыла широкие возможности для модификации клеточной поверхности [2]. Использование для этого природных ГЛ затруднено тем, что их сложно выделять из природных источников (ввиду низкого содержания и значительного структурного разнообразия), а полный химический синтез таких соединений неоправданно дорог. Значительно более перспективным оказался подход, основанный на применении синтетических аналогов ГЛ – неогликолипидов [3], которые содержат сам гликан (функциональную часть), липидный фрагмент, необходимый для встраивания в мембрану, а также спейсер,

соединяющий их. Одно из основных преимуществ неогликолипидов – простота синтеза, т.к. входящие в их состав блоки могут быть соединены при помощи эффективных и надежных методов конъюгации. Дальнейшим развитием этого подхода стало введение в практику так называемых *активных спейсеров*, т.е. групп, которые не только соединяют гликан и липид, но и придают молекуле необходимые характеристики. Так, применение полярных и заряженных *N*-карбоксиметилглициновых (CMG) спейсеров позволяет регулировать баланс гидрофильности/гидрофобности молекулы и придавать растворимость в водных средах (свойство, крайне важное для работы с живыми клетками) и даже молекулам с гидрофобной функциональной частью [4, 5]. Это открыло возможность значительно расширить репертуар

Сокращения: ГЛ – гликолипид; нГЛ – неогликолипид; СЛК – синтетический липофильный конструктор; Ad – адипиноил; Asc – аскорбат; A<sub>tetra</sub> – тетрасахарид А; CMG – *N*-карбоксиметилглицин; DOPE – диолеилфосфатидилэтаноламин; TBUTU – 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиния тетрафторборат; THPTA – трис-гидроксипропилтриазолилметиламин; SuCy-3 – сульфоцианин-3.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-03-00; эл. почта: imryzhov@gmail.com).

функциональных фрагментов и помимо гликанов вводить в состав липидных производных пептиды [6], флуоресцентные метки [7], лиганды для селективной ковалентной и нековалентной [4] конъюгации и т.д. Наиболее корректное общее наименование для таких соединений – синтетические липофильные конструкторы (СЛК), в англоязычной литературе также используют аббревиатуру FSL (Function–Spacer–Lipid).

Возможность модифицировать гликаном клеточную мембрану без нарушения ее жизнедеятельности открывает практически неограниченные перспективы для исследования роли гликанов в функционировании клетки и ее взаимодействии с окружающей средой. Более того, модифицированные таким образом клетки и сами являются инструментом для изучения процессов взаимодействия клеточных гликанов с углеводными белками [8–10].

Ранее были синтезированы СЛК, несущие в качестве функциональной части различные флуоресцентные метки. Ими окрашивают как отдельные клетки, так и органы, и целые живые организмы, т.е. проводят окрашивание *in vivo* [7]. Такие конструкторы позволяют детально исследовать механизмы и кинетику транспорта липидных молекул в клетку и из нее: их проникновение через гликокаликс, распределение в мембране, интернализацию в клетку и выход из нее – при помощи флуоресцентной микроскопии [1].

Применение конфокальной микроскопии для исследований с участием углеводсодержащих СЛК предполагает визуализацию флуоресцентно-меченными антигликановыми антителами. Антитела способны к мультивалентному взаимодействию с гликанами, а это, в свою очередь, может приводить к кластеризации нескольких (до десяти в случае декавалентных IgM) гликанов одной молекулой антитела и существенно искажать естественное распределение гликолипидов в мембране. Применение флуоресцентно-меченных антигликановых антител также не позволяет изучать взаимодействие гликанов, введенных в состав мембраны при помощи СЛК, с углевод-связывающими белками (например, галектинами), т.к. в такой ситуации будет наблюдаться конкуренция между флуоресцентно-мечеными антителами и рецепторами за связывание с гликаном.

Для снятия таких ограничений необходимы конструкторы, которые содержат как исследуемый гликан, так и флуоресцентную метку. Некоторые подходы к получению флуоресцентно-меченных

гликолипидов известны. Так, возможно нерегio-селективное введение метки в уже полученный углеводсодержащий СЛК. Таким образом был синтезирован BODIPY-меченный конструктор на основе олигомеров гиалуроновой кислоты [1]. Недостаток подхода – статистическое распределение флуоресцентной метки: образуется смесь исходного конструктора и продуктов с различным количеством BODIPY-меток в молекуле, т.е. требование к однозначности структуры полученного СЛК не соблюдается. Также описаны методы введения флуоресцентной метки в природные ганглиозиды [11]. Введение осуществляется путем дезацетилирования NAc-группы нейрамина кислоты щелочным гидролизом и последующего ацилирования полученного амина соответствующим производным BODIPY. При этом наблюдалось и частичное дезацелирование аминокислоты сфингозина, т.е. потеря остатка жирной кислоты. Возможен синтез олигосахарида, модифицированного флуоресцентной меткой, и дальнейшее введение его в состав неогликолипида. Так, в работе Yamaguchi et al. [12] описан полный химический синтез ганглиозида GD2, в котором к атому C6 остатка GalNAc $\beta$  присоединена флуоресцентная метка ATTO594. Крайне высокая трудоемкость получения модифицированного гликана и необходимость разрабатывать для каждого нового соединения свою схему синтеза не позволяет использовать такой подход как универсальный для получения бифункциональных СЛК. Но самый крупный недостаток введения флуоресцентной метки в состав гликановой части СЛК (если гликан – олигосахарид, а не полисахарид) – это безусловное искажение свойств гликана, как физико-химических, так и биологических.

Введение флуоресцентной метки в спейсерную группу углеводсодержащих липофильных конструкторов позволит получить СЛК, лишенные описанных выше недостатков. Целью данного исследования был синтез таких бифункциональных СЛК, содержащих одинаковые углеводные и спейсер-липидные блоки, но отличающихся друг от друга флуоресцентной меткой, с использованием двух различных подходов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа посвящена получению двух бифункциональных СЛК. Оба конструктора содержат следующие структурные фрагменты (рис. 1): тетрасахарид А (тип 2) (A<sub>tetra</sub> (тип 2), гликан) и блок CMG–DOPE, где CMG – это N-карбокиси-

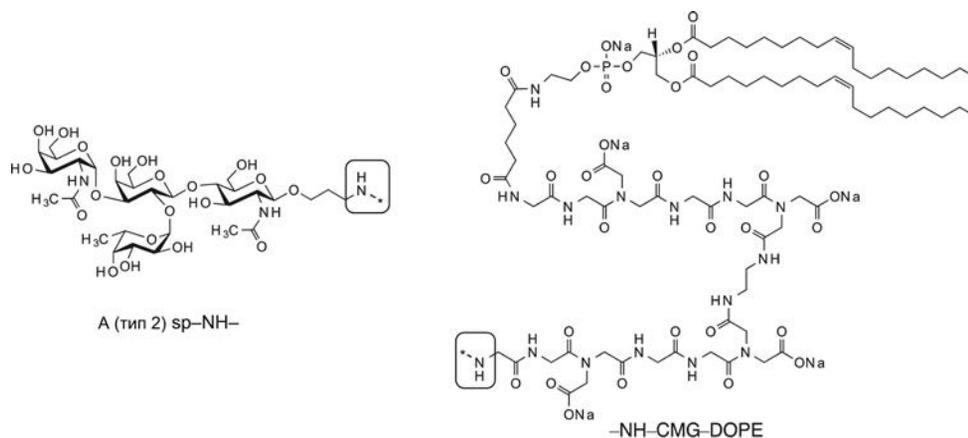


Рис. 1. Общие структурные фрагменты полученных СЛК: тетрасахарид А (тип 2) и блок CMG-DOPE.

метилглициновый спейсер, а DOPE – это диолеилфосфатидилэтаноламин (липид).

Тетрасахарид А (тип 2) [13] был выбран нами в качестве углеводной составляющей получаемых СЛК по нескольким причинам. Во-первых, это “модельный” гликан для различных типов синтезируемых конструкторов. Нами уже был синтезирован ряд СЛК с  $A_{tetra}$  (тип 2), отличающихся строением спейсера и липида [14]. Наличие такой серии соединений позволяет оценить влияние архитектуры конструкторов на аффинность взаимодействия их углеводной части с соответствующими антителами. Во-вторых, одна из целей получения бифункциональных флуоресцентно-меченных СЛК заключается в исследовании взаимодействия галектинов с их лигандами в составе клеточной мембраны, а АВ0-антигены являются лигандами некоторых галектинов [10, 15].

На сегодняшний день CMG – наиболее часто используемый в синтезе СЛК спейсер. Он позволяет вводить в состав СЛК функциональные группы различной природы (даже гидрофобные), а его вытянутая за счет распределенных по длине отрицательно заряженных групп структура отделяет функциональную часть от мембраны, увеличивая доступность функциональной группы для взаимодействия извне [3].

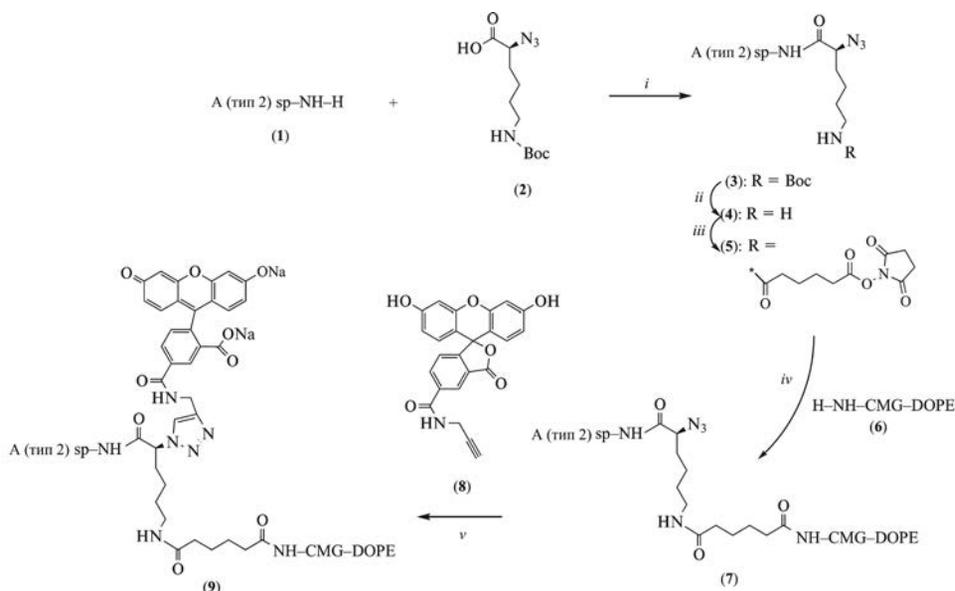
DOPE – также основной липид, применяемый в составе СЛК, т.к. он позволяет добиться надежного и равномерного встраивания конструкторов в мембрану клетки [16].

Один из синтезированных нами конструкторов в качестве флуоресцентной метки содержит флуоресцеин, а второй – сульфацианин-3. В работе

опробованы два разных синтетических подхода, отличающиеся друг от друга последовательностью введения гликана, флуоресцентной метки и спейсер-липидного блока. В первом случае был получен гликан-содержащий СЛК, в структуре которого присутствовал сайт для присоединения флуоресцентной группы. Во втором случае была получена сложная функциональная часть, включающая гликан и флуоресцентную метку. Ее конъюгацией со спейсер-липидным блоком был получен целевой СЛК.

Структуру целевых конструкторов и промежуточных соединений подтверждали методами  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

**Получение бифункционального СЛК введением флуоресцентной метки на последней стадии.** Для получения бифункциональных СЛК необходим центральный фрагмент, позволяющий проводить ортогональную конъюгацию трех структурных элементов: гликана, метки, а также спейсер-липиды. Для реализации первого синтетического подхода в качестве такого звена мы выбрали производное  $\alpha$ -азидолизина (2) (схема 1) с Вос-защитенной  $\epsilon$ -аминогруппой. На первой стадии вводили углеводную часть, для чего карбоксильную группу в производном (2) активировали при помощи TBUTU [17] и конъюгировали с аминопропилгликозидом тетрасахарида А (тип 2) (1). Выход продукта (3) составил 75%. Далее Вос-защитную группу в производном (3) удаляли быстрой (5 мин) обработкой 95%-ной трифторуксусной кислотой при охлаждении (такие мягкие условия были необходимы, чтобы не затронуть лабильный в кислых условиях остаток  $\alpha$ -L-фукозы в тетрасахара-

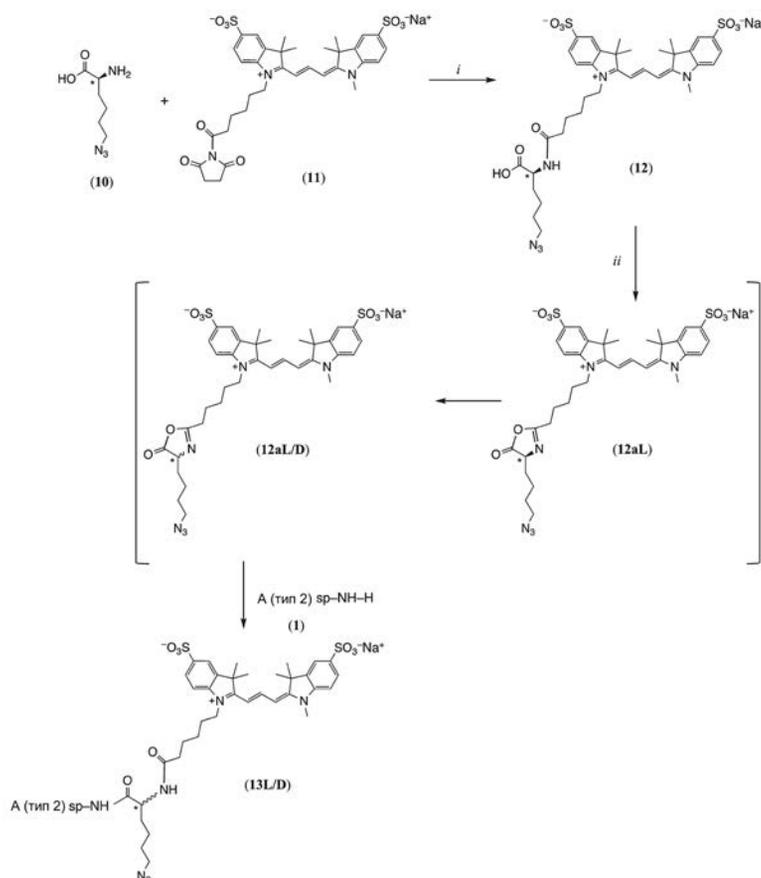


**Схема 1.** Получение СЛК (9). Реагенты и условия: *i* – TBTU, DIPEA/DMF, 75%; *ii* – 95%-ная CF<sub>3</sub>COOH, 4°C, 5 мин, выход количественный; *iii* – Ad(ONSu)<sub>2</sub> (10 экв.), DMSO, *iv* – NaHCO<sub>3</sub> (водн.) (50 мМ)–*i*-PrOH (2 : 1), 87% (на две стадии); *v* – CuSO<sub>4</sub>, NaAsc, THPTA/DMSO–вода (1 : 1), 77%.

ридном фрагменте). Амин (4), полученный таким образом с количественным выходом, далее превращали в активированный эфир (5) обработкой значительным (10 экв.) избытком дисукцинимидного эфира адипиновой кислоты (избыток необходим для минимизации образования продукта присоединения (4) по обеим карбоксильным группам адипиновой кислоты [18]). Конъюгацией активированного эфира (5) со спейсер-липидным блоком H<sub>2</sub>N–CMG–DOPE (6) получали СЛК (7), который был выделен с выходом 87% методом гель-хроматографии. В структуре СЛК (7) присутствует азидная группа, позволяющая вводить дополнительные молекулярные фрагменты при помощи азид-алкиновой клик-реакции (CuAAC) [19]. Такие реакции протекают в нейтральных условиях, катализируются катионами Cu<sup>+</sup>, поэтому не затрагивают большинство компонентов, используемых для конструирования СЛК (гликаны, флуоресцентные метки, липиды). Более того, существуют биоортогональные варианты клик-реакций с участием напряженных циклических алкинов, не требующие катализа катионами меди(I), что позволяет конъюгировать молекулы *in vivo* [20]. Для введения флуоресцентной метки в СЛК (7) была использована клик-реакция. Конъюгацию СЛК (7) с производным флуоресцеина (8), содержащим алкиновый фрагмент, проводили в условиях, описанных Ростовцевым [21]: в качестве растворителя использовали смесь DMSO–вода, в

качестве источника ионов меди – CuSO<sub>4</sub>, восстановление Cu<sup>2+</sup>→Cu<sup>+</sup> проводили под действием аскорбата натрия. Для стабилизации ионов Cu<sup>+</sup> использовали лиганд THPTA [22, 23]. Целевой продукт (9) выделяли методом гель-хроматографии с выходом 77%.

**Конъюгация гликана и флуоресцентной метки с последующим введением спейсер-липиды.** Для второго пути получения бифункциональных СЛК в качестве центрального звена, к которому присоединяются все блоки, был выбран ε-азидолизин (10) (схема 2). В данном случае мы планировали сначала получить составную функциональную часть введением флуоресцентной метки и гликана по амино- и карбоксильной группам производного (10) соответственно, которую затем нужно было конъюгировать со спейсер-липидным блоком. В качестве флуоресцентной метки в данном случае был выбран сульфоцианин-3. Конъюгация активированного эфира сульфоцианина-3 (11) с ε-азидолизином (10) приводила к получению производного (12) с выходом 85%. Следующий шаг – введение углеводного фрагмента, для чего карбоксильную группу в соединении (12) активировали TBTU и вводили в реакцию с аминопропилгликозидом тетрасахарида А (тип 2) (1). Было обнаружено, что в ходе этой конъюгации происходил побочный процесс – рацемизация остатка лизина, поэтому полученный таким



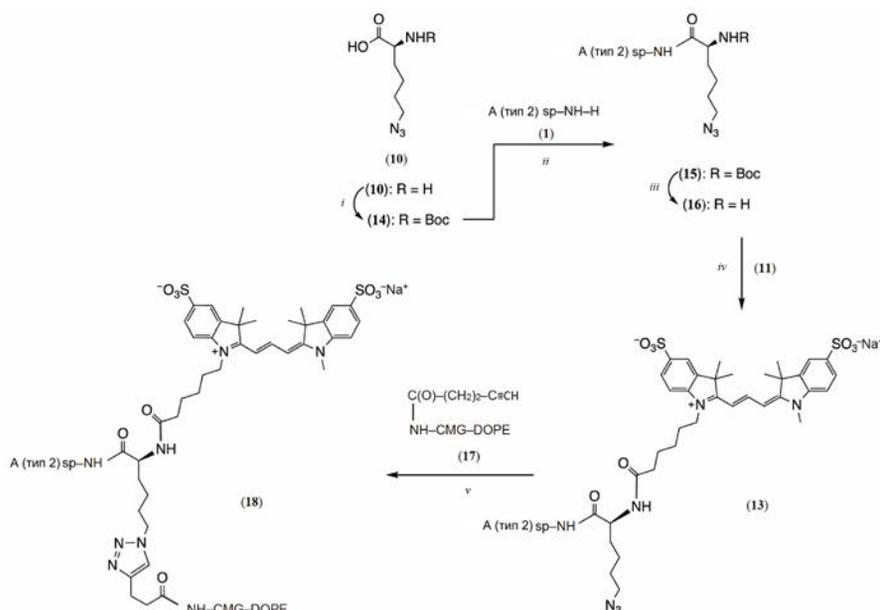
**Схема 2.** Рацемизация при конъюгации с тетрасахаридом (1). Реагенты и условия: *i* – DIPEA/DMSO, 85%; *ii* – TBUTU, DIPEA/DMF, затем соединение (1), 72%, L/D = 1 : 1.

путем продукт (72%) представлял собой смесь L- и D-изомеров с соотношением 1 : 1 (13L/D). Об этом свидетельствовали данные  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии: в спектре (13L/D) протон в  $\alpha$ -положении лизина, а также некоторые сигналы тетрасахаридного фрагмента (H1 и ацетильная группа звена GlcNAc,  $\text{CH}_3$ -группа  $\alpha$ -L-фукозы) проявлялись в виде пар идентичных сигналов с соотношением интегральных интенсивностей 1 : 1. Рацемизация аминокислот при активации их карбоксильных групп действием как TBUTU, так и других реагентов, описана в литературе [24]. Предполагается, что она протекает через образование циклического азлактона (12a) (схема 2), в котором  $\alpha$ -протон обладает повышенной кислотностью, что и способствует образованию смеси изомеров (12aL/D) и далее диастереомеров (13L/D).

Sturabotti et al. [24] также показали, что замена N-ацильной группы на N-карбамоильную в производном аминокислоты полностью подавляет рацемизацию при активировании карбоксила. Поэтому мы решили изменить план синтеза (схема 3).

Сначала аминогруппу в соединении (10) защищали Boc-группой: обрабатывали соединение (10)  $\text{Boc}_2\text{O}$  в присутствии  $\text{Et}_3\text{N}$ , что приводило к получению карбамоильного N-Boc-производного (14) с выходом 81%. Далее соединение (14) конъюгировали с аминопропилгликозидом (1) в присутствии TBUTU в условиях, аналогичных получению соединения (3). Обработкой продукта (15) 95%-ной трифторуксусной кислотой при охлаждении (как было описано выше для получения производного (4)) был получен амин (16) с выходом 72% на две стадии.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр амина (16) соответствовал только одному изомеру, т.е. рацемизации при конъюгации (1) и (14) не наблюдалось.

Ацилирование амина (16) активированным эфиром сульфоцианина-3 (11) приводило к получению производного (13), которое было выделено методом колоночной хроматографии на силикагеле с выходом 89% (схема 3). Для завершения синтеза целевого СЛК производное (13), включающее углеводную часть и флуоресцентную метку, необходимо было конъюгировать со спейсер-липидным



**Схема 3.** Получение СЛК (18). Реагенты и условия: *i* –  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}/\text{MeOH}$ , 81%; *ii* – TBTU, DIPEA/DMF, затем соединение (1); *iii* – 95%-ная  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 5 мин, 72% (на две стадии); *iv* – DIPEA/DMSO, 89%; *v* –  $\text{CuSO}_4$ , NaAsc, THPTA/DMSO–вода (1 : 1), 86%.

блоком. Это было целесообразно осуществить также при помощи клик-реакции, т.к. в соединении (13) присутствует азидная группа. В качестве алкиновой компоненты использовали производное (17) – продукт ацилирования амина  $\text{H}_2\text{N}-\text{CMG}-\text{DOPE}$  (6) 4-пентиновой кислотой. Клик-конъюгацию соединений (13) и (17) осуществляли в условиях, аналогичных получению СЛК (9). Целевой СЛК (18) выделяли методом гель-хроматографии с выходом 86%.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Тетрасахарид А (тип 2) (1) [25] и амин  $\text{H}_2\text{N}-\text{CMG}-\text{DOPE}$  (6) [3] получали в лаборатории углеводов Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по известным методикам. Производное (17) получали там же конъюгацией 4-пентиновой кислоты и амина (6) при помощи TBTU [17] и выделяли методом гель-фильтрации (описание синтеза будет опубликовано). Использовали коммерчески доступные производные лизина (2) и (10) (IRIS Biotech GmbH, Германия), флуоресцеина (8) и сульфоцианина-3 (11) (ООО “Люмипроб РУС”, Россия). Остальные реагенты также были коммерчески доступны (Acros Organics, США; Sigma-Aldrich, США). Растворители (Химмед, Реахим, Экос, Россия) перед использованием очищали стандартными методами.

Тонкослойную хроматографию проводили на алюминиевых пластинках Silica gel 60 (1.05554.0001, Merck, Германия), вещества обнаруживали обработкой пластинок 7%-ным водным раствором ортофосфорной кислоты и прогревом до  $150^\circ\text{C}$  (обугливание) или раствором нингидрина (для аминов, 3 г/л в смеси бутанол/уксусная кислота, 30 : 1). Колоночную хроматографию проводили на Silica gel 60 0.040–0.063 мм (Merck, Германия), гель-хроматографию – на Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Швеция). Растворители упаривали на роторном испарителе в вакууме при  $40\text{--}45^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H}$ -ЯМР-спектры регистрировали на приборах AVANCE (700 МГц) и Avance III (800 МГц) (Bruker, Германия) при  $30^\circ\text{C}$ . Значения химических сдвигов в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах ( $\delta$ , м.д.) приведены с использованием для калибровки сигналов остаточных протонов растворителей  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\delta = 4.750$ ),  $\text{CD}_2\text{HOD}$  ( $\delta = 3.306$  в  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta = 3.341$  в  $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{OD}$  2 : 1), константы спин-спиновой взаимодействия измерены в герцах.

$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры регистрировали на приборах AVANCE (700 МГц) и Avance III (800 МГц) (Bruker, Германия) при  $30^\circ\text{C}$ . Значения химических сдвигов в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах ( $\delta$ , м.д.) приведены с использованием для калибровки сигналов растворителей  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta = 49.00$ ) и  $\text{DMSO}-d_6$  ( $\delta = 39.52$ ).

Отнесение сигналов в ЯМР-спектрах осуществляли сопоставлением зарегистрированных спектров

ров со спектрами охарактеризованных исходных и промежуточных соединений. Дополнительная информация о взаимном расположении сигналов в спектрах тетрасахарида А (тип 2) взята из работы Meloncelli et al. [26].

Масс-спектры высокого разрешения (МСВР) регистрировали на масс-спектрометре maXis (Bruker, Германия) с использованием ионизации электрораспылением (ИЭР), шприцевой ввод растворов в смеси ацетонитрил–вода 50 : 50 (об. %) со скоростью 3 мкл/мин, полярность наблюдаемых ионов выбирали в зависимости от функциональных групп исследуемых веществ. Использовали программное обеспечение ESI Compass 1.3 (Bruker, Германия), параметры настройки прибора устанавливали в соответствии со стандартными методами, предоставляемыми в пакете программного обеспечения производителем. Обработку спектров проводили с использованием пакета программ Data Analysis Version 4.0 SP1 (Bruker, Германия).

**Получение СЛК (7).** К раствору производного лизина (**2**) (4.1 мг, 0.015 ммоль) в 0.5 мл DMF добавляли TBTU (4.9 мг, 0.015 ммоль) и DIPEA (2.6 мкл, 0.015 ммоль), а через 10 мин – аминопропилгликозид (**1**) (10 мг, 0.013 ммоль). Через 1 ч реакционную смесь подвергали гель-хроматографии (CH<sub>3</sub>CN–H<sub>2</sub>O, 1 : 1). Фракции, содержащие продукт, объединяли и концентрировали. Полученный остаток дополнительно очищали колоночной хроматографией на силикагеле (элюция смесью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–EtOH–H<sub>2</sub>O, 6 : 5 : 0.5). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали лиофильной сушке из воды, получили 9.9 мг (75%) производного (**3**) в виде белой пены, *R<sub>f</sub>* 0.42 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–EtOH–H<sub>2</sub>O, 6 : 5 : 0.5), <sup>1</sup>H-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD, 700 МГц): 5.34 (д, *J*<sub>1,2</sub> 4.0, 1H, H1 Fucα), 5.16 (д, *J*<sub>1,2</sub> 3.8, 1H, H1 GalNAcα), 4.53 (д, *J*<sub>1,2</sub> 7.7, 1H, H1 Galβ), 4.39 (д, *J*<sub>1,2</sub> 8.4, 1H, H1 GlcNAcβ), 4.35–4.29 (м, 2H, H2 GalNAcα, H5 Fucα), 4.17 (ддд, *J* 7.4, 4.3, 1.3, 1H, H5 GalNAcα), 4.11 (д, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 3.0, H4 Galβ), 4.00 (дд, *J*<sub>2,3</sub> 9.9, *J*<sub>1,2</sub> 7.7, 1H, H2 Galβ), 3.94–3.88 (м, 4H, 3H (A<sub>tetra</sub>), OCHNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.86–3.81 (м, 2H, H3 GalNAcα, CH(N<sub>3</sub>)), 3.80–3.63 (м, 10H (A<sub>tetra</sub>)), 3.59 (дд, *J*<sub>3,4</sub> 10.5, *J*<sub>4,5</sub> 8.8, H4 GlcNAcβ), 3.57–3.52 (м, 2H, H5 Galβ, OCHNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.41–3.34 (м, 1H, CHNHВoc), 3.31–3.28 (м, 1H, H5 GlcNAcβ), 3.25–3.18 (м, 1H, CHNHВoc), 3.04 (т, *J* 6.9, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.00 (с, 3H, NC(O)CH<sub>3</sub>), 1.99 (с, 3H, NC(O)CH<sub>3</sub>), 1.85–1.72 (м, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, CH<sub>2</sub>), 1.53–1.48 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.47–1.37 (м, 11H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>), 1.22

(д, *J* 6.6, 3H, H6 Fucα); <sup>13</sup>C-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD, 176 МГц, DEPT): 101.51 (C1 GlcNAcβ), 100.83 (C1 Galβ), 98.91 (C1 Fucα), 92.24 (C1 GalNAcα), 77.15, 76.59, 75.80, 75.54, 72.75, 72.21, 72.17, 71.36, 70.50, 69.15, 68.70, 68.53, 67.06 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 66.31, 63.57, 62.90 (–CH(N<sub>3</sub>–), 61.99, 61.17, 60.38, 55.51, 49.91, 39.70 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 36.52 (CH<sub>2</sub>NHВoc), 31.13 (CH<sub>2</sub>), 29.13 (CH<sub>2</sub>), 29.05 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 27.42 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 22.61 (CH<sub>2</sub>), 21.50 (NC(O)CH<sub>3</sub>), 21.19 (NC(O)CH<sub>3</sub>), 15.19 (C6 Fucα); ИЭР МСВР: найдено *m/z* 1044.4831, рассчитано для C<sub>42</sub>H<sub>74</sub>N<sub>7</sub>O<sub>23</sub><sup>+</sup>, [M + H]<sup>+</sup> 1044.4816; найдено *m/z* 1061.5096, рассчитано для C<sub>42</sub>H<sub>77</sub>N<sub>8</sub>O<sub>23</sub><sup>+</sup>, [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 1061.5081; найдено *m/z* 1066.4650, рассчитано для C<sub>42</sub>H<sub>73</sub>N<sub>7</sub>O<sub>23</sub>Na<sup>+</sup>, [M + Na]<sup>+</sup> 1066.4634; найдено *m/z* 1082.4389, рассчитано для C<sub>42</sub>H<sub>73</sub>N<sub>7</sub>O<sub>23</sub>K<sup>+</sup>, [M + K]<sup>+</sup> 1082.4373.

Колбу с производным (**3**) (9.0 мг, 0.0086 ммоль) охлаждали до 4°C и добавляли в нее 95% CF<sub>3</sub>COOH (1 мл), также охлажденную до 4°C. Через 5 мин в смесь добавляли 2 мл Et<sub>2</sub>O, что приводило к выпадению продукта в виде тонкой пленки на стенки колбы. Супернатант удаляли, пленку промывали 3 раза по 2 мл Et<sub>2</sub>O, после чего высушивали в вакууме масляного насоса. Остаток подвергали ионообменной хроматографии (Dowex 50 (H<sup>+</sup>), элюция 5% водным NH<sub>3</sub>). Лиофильной сушкой из воды получали 7.9 мг (97%) производного (**4**), белая пена, *R<sub>f</sub>* 0.63 (MeOH–1 M Py · HOAc (водн.), 5 : 1), <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O + эквивалентное к соединению (**4**) количество CF<sub>3</sub>COOH, 700 МГц): 5.36 (д, *J*<sub>1,2</sub> 4.1, 1H, H1 Fucα), 5.19 (д, *J*<sub>1,2</sub> 3.8, 1H, H1 GalNAcα), 4.61 (д, *J*<sub>1,2</sub> 7.7, 1H, H1 Galβ), 4.52 (д, *J*<sub>1,2</sub> 8.4, 1H, H1 GlcNAcβ), 4.33 (кв, 1H, *J*<sub>5,6</sub> 6, H5 Fucα), 4.27–4.20 (м, 3H, A<sub>tetra</sub>), 4.11 (дд, *J* 7.5, 5.5, 1H, CH(N<sub>3</sub>)), 4.03–3.98 (м, 3H, A<sub>tetra</sub>), 3.96–3.89 (м, 3H, 2H (A<sub>tetra</sub>), OCHNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.86–3.71 (м, 10H, A<sub>tetra</sub>), 3.70–3.62 (м, 3H, 2H (A<sub>tetra</sub>), OCHNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.46 (ддд, *J* 9.9, 6.0, 2.1, 1H, H-5 GlcNAcβ), 3.35–3.24 (м, 2H, CH<sub>2</sub>NHВoc), 3.02 (т, *J* 7.7, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.06 (с, 3H, NC(O)CH<sub>3</sub>), 2.05 (с, 3H, NC(O)CH<sub>3</sub>), 1.91–1.78 (м, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, CH<sub>2</sub>), 1.77–1.67 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.52–1.43 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.26 (д, *J* 6.7, 3H, H6 Fucα); <sup>13</sup>C-ЯМР (D<sub>2</sub>O + эквивалентное к соединению (**4**) количество CF<sub>3</sub>COOH, 176 МГц, DEPT): 101.21 (C1 GlcNAcβ), 100.15 (C1 Galβ), 98.68 (C1 Fucα), 91.41 (C1 GalNAcα), 76.36, 75.76, 75.41, 75.23, 72.43, 71.77, 71.15, 70.03, 68.55, 68.02 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 67.86, 67.72, 66.90, 63.26 (–CH(N<sub>3</sub>–), 63.11, 61.37, 61.12, 60.25, 55.44, 49.56, 39.23 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 36.55 (CH<sub>2</sub>NHВoc), 30.78 (CH<sub>2</sub>), 28.40 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 26.38 (CH<sub>2</sub>), 22.04

(NC(O)CH<sub>3</sub>), 21.99 (NC(O)CH<sub>3</sub>), 21.75 (CH<sub>2</sub>), 15.20 (C6 Fucα); ИЭР МСВР: найдено *m/z* 944.4306, рассчитано для C<sub>37</sub>H<sub>66</sub>N<sub>7</sub>O<sub>21</sub><sup>+</sup>, [M + H]<sup>+</sup> 944.4295.

Раствор производного (4) (6.7 мг, 0.0071 ммоль) в 400 мкл DMSO четырьмя равными порциями через каждые 10 мин добавляли к раствору Ad(ONSu)<sub>2</sub> (24.1 мг, 0.071 ммоль). Через 30 мин после добавления последней порции смесь подвергали гель-хроматографии (CH<sub>3</sub>CN–H<sub>2</sub>O, 1 : 1, 0.3% AcOH). Фракции, содержащие активированный эфир (5) (*R<sub>f</sub>* 0.50 (CHCl<sub>3</sub>–EtOH–H<sub>2</sub>O, 6 : 9 : 2)), объединяли, концентрировали и подвергали лиофильной сушке из 0.1% AcOH. Полученный остаток растворяли в 300 мкл DMF и добавляли тремя равными порциями через каждый 1 ч к раствору амина (6) (9.8 мг, 0.0053 ммоль) в смеси 0.5 мл 50 mM NaHCO<sub>3</sub> (водн.) и 0.25 мл *i*-PrOH (pH 8.5) при перемешивании. Через 12 ч смесь нейтрализовали AcOH (2 мкл) до pH 7.0 и подвергали гель-хроматографии (*i*-PrOH–H<sub>2</sub>O, 1 : 2, 0.25% AcOH, 0.5% пиридина). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли, концентрировали и дважды подвергали лиофильной сушке из воды. Полученный остаток растворяли в воде и титровали 50 mM NaHCO<sub>3</sub> (водн.) до pH 6.5, после чего снова подвергали лиофильной сушке из воды. Таким образом было получено 14 мг (87% при расчете на амин (6)) СЛК (7) в виде белой пены, *R<sub>f</sub>* 0.28 (*i*-PrOH–MeOH–CH<sub>3</sub>CN–H<sub>2</sub>O, 4 : 3 : 8 : 4), <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O–CD<sub>3</sub>OD, 2 : 1, 700 МГц): 5.38 (д, *J*<sub>1,2</sub> 4.2, 1H, H1 Fucα), 5.37–5.32 (м, 4H, 2 HC=CH), 5.31–5.28 (м, 1H, м, 1H, C(2)H глицерина), 5.20 (д, *J*<sub>1,2</sub> 3.9, 1H, H1 GalNAcα), 4.62 (д, *J*<sub>1,2</sub> 7.6, 1H, H1 Galβ), 4.51 (д, *J*<sub>1,2</sub> 8.5, 1H, H1 GlcNAcβ), 4.46 (д, *J* 12.1, 1H, C(1)H глицерина), 4.34 (кв, *J* 6.6, 1H, H5 Fucα), 4.31–3.89, 3.84–3.71, 3.69–3.65 (3м, 48H, 10H, 2H, 21H A<sub>tetra</sub>, 12 C(O)CH<sub>2</sub>N (CMG), 4 NCH<sub>2</sub>C(O)O (CMG), NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP, C(1)H' и C(3)H<sub>2</sub> глицерина, CH(N<sub>3</sub>), OCHNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.64–3.60 (м, 1H, OCHNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.46–3.32 (м, 7H, H5 GlcNAcβ, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.28–3.18 (м, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, CH<sub>2</sub>NC(O)), 2.44–2.21 (м, 12H, 6 C(O)CH<sub>2</sub>), 2.09–2.00 (м, 14H, 2 NC(O)CH<sub>3</sub>, 2 CH<sub>2</sub>C=CCH<sub>2</sub>), 1.88–1.77 (м, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, CH<sub>2</sub>), 1.69–1.53 (м, 14H, 6 C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>), 1.45–1.25 (м, 45H, 21 CH<sub>2</sub>, H6 Fucα), 0.91 (т, *J* 7.0, 6H, 2 CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-ЯМР (D<sub>2</sub>O–CD<sub>3</sub>OD, 2 : 1, 201 МГц): 176.66 (C=O), 176.05 (C=O), 175.93 (C=O), 175.05–174.90 (C=O), 174.51 (C=O), 174.02 (C=O), 172.06 (C=O), 171.79 (C=O), 171.59–171.06 (C=O), 170.80–170.51 (C=O), 129.59 (HC=C), 129.56 (HC=C), 129.52 (HC=C), 129.50 (HC=C), 101.19 (C1 GlcNAcβ), 100.20

(C1 Galβ), 98.65 (C1 Fucα), 91.46 (C1 GalNAcα), 76.46, 75.78, 75.39, 75.22, 72.39, 72.30, 71.79, 71.11, 70.65, 70.61, 70.02, 68.64, 67.90, 67.80, 67.64, 66.80, 64.01, 63.98, 63.44, 63.42, 63.41, 63.12, 63.08, 62.95, 62.93, 61.40, 61.11, 60.16, 55.41, 54.32, 53.03–51.95, 49.56, 42.46, 42.22, 40.72, 39.92, 39.88, 38.85, 38.41, 38.41, 36.31, 35.45, 35.35, 35.35, 35.14, 35.13, 35.06, 33.94, 33.83, 31.81, 30.89, 29.70–28.80, 28.55, 28.03, 27.01, 25.01, 24.91, 24.69, 24.64, 24.59, 24.57, 22.53, 22.22, 22.11, 21.88, 15.20 (C6 Fucα), 13.73 (2 CH<sub>3</sub>); ИЭР МСВР: найдено *m/z* 1441.1901<sup>2-</sup>, рассчитано для C<sub>124</sub>H<sub>205</sub>N<sub>22</sub>O<sub>53</sub>P, [M – 2H]<sup>2-</sup> 1441.1910; найдено *m/z* 960.4576, рассчитано для C<sub>124</sub>H<sub>204</sub>N<sub>22</sub>O<sub>53</sub>P<sup>3-</sup>, [M – 3H]<sup>3-</sup> 960.4576; найдено *m/z* 720.0914, рассчитано для C<sub>124</sub>H<sub>203</sub>N<sub>22</sub>O<sub>53</sub>P<sup>4-</sup>, [M – 4H]<sup>4-</sup> 720.0934; найдено *m/z* 575.8717, рассчитано для C<sub>124</sub>H<sub>202</sub>N<sub>22</sub>O<sub>53</sub>P<sup>5-</sup>, [M – 5H]<sup>5-</sup> 575.8744.

**Получение СЛК (9).** Раствор СЛК (7) (7.0 мг, 0.0023 ммоль) и алкина (8) (1.9 мг, 0.0046 ммоль) растворяли в смеси DMSO–H<sub>2</sub>O, 1 : 1 (0.5 мл) и замораживали жидким азотом. Колбу заполняли аргоном и давали смеси оттаять, после чего в противотоке аргоном добавляли растворы CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (0.29 мг, 0.0012 ммоль в 50 мкл H<sub>2</sub>O), NaAsc (0.23 мг, 0.0012 ммоль в 50 мкл H<sub>2</sub>O), THPTA (0.50 мг, 0.0012 ммоль в 50 мкл H<sub>2</sub>O). Через 1 ч реакционную смесь подвергали гель-хроматографии (CH<sub>3</sub>CN–H<sub>2</sub>O, 1 : 1). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали лиофильной сушке из воды, получили 6.0 мг (77%) СЛК (9) в виде желтой пены, *R<sub>f</sub>* 0.60 (CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O, 2 : 6 : 0.5), <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O–CD<sub>3</sub>OD, 2 : 1, 700 МГц): 8.45 (с, 1H, триазол), 8.18–8.13 (м, 2H, флуоресцеин), 7.35 (д, *J* 8.3, 1H, флуоресцеин), 7.04–6.95 (м, 2H, флуоресцеин), 6.84 (с, 2H, флуоресцеин), 6.73 (д, *J* 9.0, 2H, флуоресцеин), 5.38 (д, *J*<sub>1,2</sub> 4.1, 1H, H1 Fucα), 5.35–5.24 (м, 6H, 2 HC=CH, C(2)H глицерина, C(O)CHCH<sub>2</sub> (лизин)), 5.19 (д, *J*<sub>1,2</sub> 3.9, 1H, H1 GalNAcα), 4.61 (д, *J*<sub>1,2</sub> 7.6, 1H, H1 Galβ), 4.49 (д, *J*<sub>1,2</sub> 8.4, 1H, H1 GlcNAcβ), 4.45 (дд, *J* 12.2, 2.5, 1H, C(1)H глицерина), 4.34 (кв, *J* 6.8, 1H, H5 Fucα), 4.29–3.88, 3.84–3.70, 3.69–3.64 (3м, 48H, 10H, 2H, 20H A<sub>tetra</sub>, 12 C(O)CH<sub>2</sub>N (CMG), 4 NCH<sub>2</sub>C(O)O (CMG), NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP, C(1)H' и C(3)H<sub>2</sub> глицерина, OCHNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, C(O)NHCH<sub>2</sub>N (флуоресцеин)), 3.60–3.55 (м, 1H, OCHNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.46–3.28 (м, 8H, H5 GlcNAcβ, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, CHNHC(O) (лизин)), 3.27–3.21 (м, 1H, CHNHC(O)), 3.19–3.12 (м, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.41–2.17 (м, 12H, 6 C(O)CH<sub>2</sub>), 2.06 (с, 3H, NC(O)CH<sub>3</sub>), 2.02 (с, 3H, NC(O)CH<sub>3</sub>),

2.00–1.92 (м, 8H, 2  $CH_2C=CCH_2$ ), 1.81–1.75 (м, 2H,  $OCH_2CH_2CH_2N$ ), 1.67–1.53 (м, 16H, 6  $C(O)CH_2CH_2$ , 2  $CH_2$ ), 1.39–1.19 (м, 45H, 21  $CH_2$ , H6 Fuc $\alpha$ ), 0.86 (т,  $J$  7.0, 6H, 2  $CH_3$ );  $^{13}C$ -ЯМР ( $D_2O$ - $CD_3OD$ , 2 : 1, 201 МГц): 183.09 ( $C=O$ ), 174.56–172.80 ( $C=O$ ), 171.89 ( $C=O$ ), 170.05–169.85 ( $C=O$ ), 169.38 ( $C=O$ ), 168.50 ( $C=O$ ), 160.94, 144.80, 136.08, 130.11 ( $C=C$ ), 130.02 ( $C=C$ ), 129.75 ( $C=C$ ), 128.34 ( $C=C$ ), 122.60 (CH триазол), 115.22, 109.96, 102.83, 101.27 (C1 GlcNAc $\beta$ ), 100.90 (C1 Gal $\beta$ ), 99.06 (C1 Fuc $\alpha$ ), 92.17 (C1 GalNAc $\alpha$ ), 78.02, 76.18, 75.65, 75.43, 72.41, 71.99, 71.87, 71.42, 70.85, 70.10, 68.84, 68.18, 67.93, 66.94, 66.33, 63.39–62.99, 62.78, 61.62, 60.61, 60.20, 55.33, 53.97, 53.49–52.11, 49.67, 44.70, 42.29, 42.21, 40.61, 38.48, 38.36, 36.43, 35.53, 35.46, 35.28, 35.18, 34.04, 33.88, 31.60, 30.90, 29.46–28.69, 28.51, 26.92, 26.88, 25.31, 25.23, 25.11, 24.99, 24.81, 24.76, 22.93, 22.44, 16.49 (C6 Fuc $\alpha$ ), 14.25 (2  $CH_3$ ); ИЭР МСВР: найдено  $m/z$  1098.1543, рассчитано для  $C_{148}H_{219}N_{23}O_{59}P^3-$ ,  $[M - 3H]^3-$  1098.1557; найдено  $m/z$  823.3639, рассчитано для  $C_{148}H_{218}N_{23}O_{59}P^4-$ ,  $[M - 4H]^4-$  823.3655; найдено  $m/z$  658.4897, рассчитано для  $C_{148}H_{217}N_{23}O_{59}P^5-$ ,  $[M - 5H]^5-$  658.4915; найдено  $m/z$  548.5735, рассчитано для  $C_{148}H_{216}N_{23}O_{59}P^6-$ ,  $[M - 6H]^6-$  548.5757.

**Смесь эимеров (13L/D).** К раствору производного (10) (1.8 мг, 0.010 ммоль) в 100 мкл DMSO добавляли раствор активированного эфира (11) (6.8 мг, 0.0092 ммоль) в 200 мкл DMSO и 0.5 мкл (0.0028 ммоль)  $Et_3N$ . Через 2 ч реакцию смесь подвергали гель-хроматографии ( $CH_3CN-H_2O$ , 1 : 1). Фракции, содержащие продукт, объединяли, концентрировали и подвергали колоночной хроматографии на силикагеле ( $CH_2Cl_2-EtOH-H_2O$ , 6 : 5 : 0.5); фракции содержащие чистый продукт объединяли, концентрировали и подвергали лиофильной сушке из воды, получили 6.2 мг (85%) производного (12) в виде розовой пены,  $R_f$  0.45 ( $CH_2Cl_2-EtOH-H_2O$ , 6 : 5 : 0.5),  $^1H$ -ЯМР ( $D_2O$ , 700 МГц): 8.53 (т,  $J$  13.4, 1H,  $C=CH$ ), 7.91 (т,  $J$  1.6, 2H, ArH), 7.86 (т,  $J$  2.0, 1H,  $C=CH$ ), 7.85 (т,  $J$  1.9, 1H,  $C=CH$ ), 7.36 (дд,  $J$  8.4, 6.6, 2H, ArH), 6.38 (дд,  $J$  13.5, 10.2, 2H, ArH), 4.16 (дд,  $J$  8.9, 4.7, 1H,  $C(O)CHN$ ), 4.13–4.06 (м, 2H,  $CH_2$ ), 3.62 (с, 3H,  $N(CH_3)$ ), 3.25 (тд,  $J$  6.7, 3.0, 2H,  $CH_2$ ), 2.31 (тд,  $J$  7.1, 2.7, 2H,  $CH_2$ ), 1.87–1.82 (м, 2H,  $CH_2$ ), 1.75 (с, 12H, 2  $C(CH_3)_2$ ), 1.74–1.60 (м, 4H, 2  $CH_2$ ), 1.57–1.49 (м, 2H,  $CH_2$ ), 1.47–1.24 (м, 4H, 2  $CH_2$ );  $^{13}C$ -ЯМР ( $D_2O$ , 176 МГц, ДЕПТ): 151.95 ( $C=CH$ ), 126.66 (2  $C=CH$ ), 119.83 ( $C-Ar$ ), 119.70 ( $C-Ar$ ), 111.45 ( $C-Ar$ ), 111.29 ( $C-Ar$ ), 103.57 ( $C-Ar$ ), 103.48 ( $C-Ar$ ), 54.41 ( $C(O)CHN$ ),

50.91, 44.09, 35.44, 30.91, 27.61, 26.51, 25.46, 25.03, 22.56; ИЭР МСВР: найдено  $m/z$  769.2695, рассчитано для  $C_{36}H_{45}N_6O_9S_2-$ ,  $[M - H]^-$  769.2692; найдено  $m/z$  384.1311, рассчитано для  $C_{36}H_{44}N_6O_9S_2^{2-}$ ,  $[M - 2H]^{2-}$  384.1305.

К раствору производного (12) (6.0 мг, 0.0076 ммоль) в 0.5 мл DMF добавляли раствор ТВТУ (2.4 мг, 0.0076 ммоль) в 100 мкл DMF и DIPEA (1.3 мкл, 0.0076 ммоль), а через 10 мин – аминопропилгликозид (1) (5.4 мг, 0.0068 ммоль). Через 4 ч реакцию смесь подвергали гель-хроматографии ( $CH_3CN-H_2O$ , 1 : 1). Фракции, содержащие продукт, объединяли, концентрировали и полученный остаток дополнительно очищали колоночной хроматографией на силикагеле ( $CHCl_3-MeOH$ , 2 : 3). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали лиофильной сушке из воды, в результате получили 7.4 мг (72%) смеси (13L/D) (по данным  $^1H$ -ЯМР соотношение изомеров 1 : 1) в виде розовой пены,  $R_f$  0.32 ( $CH_2Cl_2-EtOH-H_2O$ , 6 : 5 : 1),  $^1H$ -ЯМР ( $CD_3OD$ , 700 МГц): характеристические сигналы 8.60–8.53 (м, 1H,  $C=CH$ ), 7.95 (дд,  $J$  3.4, 1.7, 2H, ArH), 7.93 (д,  $J$  1.8, 1H,  $C=CH$ ), 7.92 (д,  $J$  1.8, 1H,  $C=CH$ ), 7.43–7.39 (м, 2H, ArH), 6.53–6.46 (м, 2H, ArH), 5.34 (д,  $J_{1,2}$  4.1, 1H, H1 Fuc $\alpha$ ), 5.15 (д,  $J_{1,2}$  3.7, 1H, H1 GalNAc $\alpha$ ), 4.53 (д,  $J_{1,2}$  7.6, 1H, H1 Gal $\beta$ ), 4.40 (д,  $J_{1,2}$  8.4, 0.5 H, H1 GlcNAc $\beta$  (L)), 4.39 (д,  $J_{1,2}$  8.4, 0.5 H, H1 GlcNAc $\beta$  (D)), 4.27–4.20 (м, 1H,  $C(O)CHN$  (L + D)), 2.00 (с, 3H,  $NC(O)CH_3$ ), 1.97 (с, 1.5 H,  $NC(O)CH_3$  (L)), 1.96 (с, 1.5 H,  $NC(O)CH_3$  (D)), 1.22 (м, 3H, H6 Fuc $\alpha$  (L + D)).

**Получение СЛК (18).** Производное (10) (10 мг, 0.029 ммоль) растворяли в MeOH (400 мкл), добавляли  $Woc_2O$  (28 мкл, 0.058 ммоль) и  $Et_3N$  (8 мкл, 0.03 ммоль). Через 24 ч смесь концентрировали и подвергали колоночной хроматографии на силикагеле, получили 12.2 мг (81%) производного (14), бесцветное стекло,  $R_f$  0.24 ( $CHCl_3-MeOH$ , 9 : 1),  $^1H$ -ЯМР (DMSO- $d_6$ , 800 МГц): 3.40 (кв,  $J$  7.4, 1H,  $C(O)CHN$ ), 3.31 (т,  $J$  6.8, 2H,  $CH_2N_3$ ), 1.71–1.63 (м, 1H,  $CHN$ ), 1.59–1.46 (м, 3H,  $CHH$ ,  $CH_2$ ), 1.38 (с, 9H,  $C(CH_3)_3$ ), 1.37–1.32 (м, 2H,  $CH_2$ );  $^{13}C$ -ЯМР (DMSO- $d_6$ , 201 МГц): 174.88 ( $C(O)OH$ ), 155.87 ( $C(O)NH$ ), 78.25 ( $C(CH_3)_3$ ), 54.17 ( $C(O)CHN$ ), 51.08 ( $CH_2N_3$ ), 31.31 ( $CH_2$ ), 28.69 ( $C(CH_3)_3$ ), 28.45 ( $CH_2$ ), 23.24 ( $CH_2$ ); ИЭР МСВР: найдено  $m/z$  273.1557, рассчитано для  $C_{11}H_{21}N_4O_4$ ,  $[M + H]^+$  273.1556; найдено  $m/z$  290.1823, рассчитано для  $C_{11}H_{24}N_5O_4^+$ ,  $[M + NH_4]^+$  290.1821; найдено  $m/z$  295.1375, рассчитано для  $C_{11}H_{20}N_4O_4Na^+$ ,  $[M + Na]^+$

295.1382; найдено  $m/z$  311.1116, рассчитано для  $C_{11}H_{20}N_4O_4K^+$ ,  $[M + K]^+$  311.1114.

К раствору производного (**14**) (3.0 мг, 0.011 ммоль) в 0.75 мл DMF добавляли раствор TBTU (3.5 мг, 0.011 ммоль) в 100 мкл DMF и DIPEA (1.9 мкл, 0.011 ммоль), а через 10 мин – аминопропилгликозид (**1**) (7.8 мг, 0.0099 ммоль). Через 30 мин реакционную смесь подвергали гель-хроматографии ( $CH_3CN-H_2O$ , 1 : 1). Фракции, содержащие продукт, объединяли и концентрировали, полученный остаток дополнительно очищали колоночной хроматографией на силикагеле ( $CH_2Cl_2-EtOH-H_2O$ , 6 : 5 : 1). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли и концентрировали. Полученный остаток, содержащий продукт (**15**) ( $R_f$  0.44,  $CH_2Cl_2-EtOH-H_2O$ , 6 : 5 : 1), охлаждали до 4°C и добавляли к нему 95%-ную  $CF_3COOH$  (1 мл), также охлажденную до 4°C. Через 5 мин в смесь добавляли 2 мл  $Et_2O$ , что приводило к выпадению продукта в виде тонкой пленки на стенки колбы. Супернатант удаляли, пленку промывали 3 раза по 2 мл  $Et_2O$ , после чего высушивали в вакууме масляного насоса. Остаток подвергали ионообменной хроматографии (Dowex 50 ( $H^+$ ), элюция 5%-ным водным  $NH_3$ ). Липофильной сушкой из воды получали 6.7 мг (72%) производного (**16**), белая пена,  $R_f$  0.20 ( $CHCl_3-MeOH-H_2O$ , 2 : 6 : 1),  $^1H$ -ЯМР ( $D_2O$  + эквивалентное к соединению (**16**) количество  $CF_3COOH$ , 800 МГц): 5.36 (д,  $J_{1,2}$  4.2, 1H, H1 Fuc $\alpha$ ), 5.19 (д,  $J_{1,2}$  3.9, 1H, H1 GalNAc $\alpha$ ), 4.60 (д,  $J_{1,2}$  7.7, 1H, H1 Gal $\beta$ ), 4.50 (д,  $J_{1,2}$  8.5, 1H, H1 GlcNAc $\beta$ ), 4.32 (кв,  $J_{5,6}$  6.6, 1H, H5 Fuc $\alpha$ ), 4.27–4.20 (м, 3H, H2 GalNAc $\alpha$ , H5 Gal $\beta$ , H4 Gal $\beta$ ), 4.03–3.88 (м, 7H, 6H  $A_{tetra}$ , OCHNCH $_2$ CH $_2$ N), 3.86–3.70 (м, 10H, 9H  $A_{tetra}$ , C(O)CHNH $_2$ ), 3.70–3.66 (м, 2H,  $A_{tetra}$ ), 3.65–3.61 (м, 1H, OCHNCH $_2$ CH $_2$ N), 3.45 (ддд,  $J$  10.0, 6.0, 2.1, 1H, H5 GlcNAc $\beta$ ), 3.42–3.34 (м, 3H, OCH $_2$ CH $_2$ CHHN, CH $_2$ N $_3$ ), 3.26–3.21 (м, 1H, OCH $_2$ CH $_2$ CHHN), 2.06 (с, 3H, NC(O)CH $_3$ ), 2.05 (с, 3H, NC(O)CH $_3$ ), 1.93–1.88 (м, 2H, OCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N), 1.81 (п,  $J$  6.5, 2H, CH $_2$ ), 1.66 (п,  $J$  6.9, 2H, CH $_2$ ), 1.49–1.42 (м, 2H, CH $_2$ ), 1.26 (д,  $J_{5,6}$  6.6, 3H, H6 Fuc $\alpha$ );  $^{13}C$ -ЯМР ( $D_2O$  + эквивалентное к соединению (**16**) количество  $CF_3COOH$ , 201 МГц): 174.88 (NC(O)C), 174.68 (NC(O)C), 169.50 (NC(O)C), 101.26 (C1 GlcNAc $\beta$ ), 100.15 (C1 Gal $\beta$ ), 98.68 (C1 Fuc $\alpha$ ), 91.4 (C1 GalNAc $\alpha$ ), 76.37, 75.75, 75.39, 75.22, 72.44, 72.31, 71.77, 71.15, 70.03, 68.55, 68.02, 67.85, 67.72, 66.89, 63.10, 61.36, 61.20, 60.23, 55.43, 53.25, 50.69, 49.56, 36.73 (OCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N), 30.38 (OCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N), 28.30 (CH $_2$ ), 27.60 (C(CH $_3$ ) $_3$ ), 22.24 (CH $_2$ ), 21.99 (NC(O)CH $_3$ ), 21.55 (NC(O)CH $_3$ ), 15.20 (C6 Fuc $\alpha$ ); ИЭР МСВР: найдено  $m/z$

944.4306, рассчитано для  $C_{37}H_{66}N_7O_{21}^+$ ,  $[M + H]^+$  944.4295.

К раствору производного (**16**) (5.0 мг, 0.0053 ммоль) в DMSO (0.5 мл) добавляли раствор активированного эфира (**11**) (4.3 мг, 0.0055 ммоль) в DMSO (0.5 мл) и DIPEA (0.28 мкл, 0.0017 ммоль). Через 1 ч реакционную смесь подвергали гель-хроматографии ( $CH_3CN-H_2O$ , 1 : 1). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли и концентрировали; фракции, содержащие чистый продукт с примесями, объединяли, концентрировали и подвергали дополнительной очистке колоночной хроматографией на силикагеле ( $CH_2Cl_2-EtOH-H_2O$ , 6 : 5 : 1). Все фракции с чистым продуктом объединяли, концентрировали и подвергали липофильной сушке из воды, в результате получили 7.4 мг (89%) продукта (**13**) в виде розовой пены,  $R_f$  0.32 ( $CH_2Cl_2-EtOH-H_2O$ , 6 : 5 : 1),  $^1H$ -ЯМР ( $CD_3OD$ , 800 МГц): 8.57 (т,  $J$  13.4, 1H, C=CH), 7.95 (дд,  $J$  2.9, 1.7, 2H, ArH), 7.92 (д,  $J$  1.8, 1H, C=CH), 7.91 (д,  $J$  2.0, 1H, C=CH), 7.41 (дд,  $J$  9.8, 8.3, 2H, ArH), 6.50 (дд,  $J$  15.0, 13.4, 2H, ArH), 5.34 (д,  $J_{1,2}$  4.0, 1H, H1 Fuc $\alpha$ ), 5.15 (д,  $J_{1,2}$  3.9, 1H, H1 GalNAc $\alpha$ ), 4.53 (д,  $J_{1,2}$  7.7, 1H, H1 Gal $\beta$ ), 4.39 (д,  $J_{1,2}$  8.6, 1H, H1 GlcNAc $\beta$ ), 4.34–4.29 (м, 2H,  $A_{tetra}$ ), 4.25 (дд,  $J$  8.9, 5.5, 1H, C(O)CHN), 4.23–4.14 (м, 2H, 1H  $A_{tetra}$ , CH $_2$ ), 4.10 (д, 1H,  $J_{3,4}$  3.1, H4 Gal $\beta$ ), 4.00 (дд,  $J_{2,3}$  9.9,  $J_{1,2}$  7.7, 1H, H2 Gal $\beta$ ), 3.93–3.88 (м, 4H, 3H  $A_{tetra}$ , OCHNCH $_2$ CH $_2$ N), 3.82 (дд,  $J_{2,3}$  11.0,  $J_{3,4}$  3.2, 1H, H3 GalNAc $\alpha$ ), 3.80–3.63 (м, 15H, 12  $A_{tetra}$ , N(CH $_3$ )), 3.61–3.49 (м, 4H, 1H  $A_{tetra}$ , CH $_2$ , OCHNCH $_2$ CH $_2$ N), 3.34–3.27 (м, 4H, H5 GlcNAc $\beta$ , OCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N, CHN), 3.22–3.17 (м, 1H, CHN), 2.35–2.25 (м, 2H, CH $_2$ ), 2.00 (с, 3H, NC(O)CH $_3$ ), 1.97 (с, 3H, NC(O)CH $_3$ ), 1.90–1.84 (м, 2H, OCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ N), 1.79 (с, 12H, 2 C(CH $_3$ ) $_2$ ) 1.78–1.70 (м, 4H, 2 CH $_2$ ), 1.67–1.55 (м, 4H, 2 CH $_2$ ), 1.35–1.26 (м, 2H, CH $_2$ ), 1.21 (д,  $J_{5,6}$  6.7, 3H, H6 Fuc $\alpha$ );  $^{13}C$ -ЯМР ( $CD_3OD$ , 201 МГц): 176.21, 175.40, 174.49, 173.08, 173.01, 172.20, 143.97, 143.32, 142.76, 142.70, 140.79, 140.74, 126.94, 126.83, 120.11, 120.00, 110.84, 110.62, 103.50, 103.24, 101.55 (C1 GlcNAc $\beta$ ), 100.82 (C1 Gal $\beta$ ), 98.90 (C1 Fuc $\alpha$ ), 92.23 (C1 GalNAc $\alpha$ ), 77.15, 76.57, 75.75, 75.56, 72.88, 72.47, 72.19, 72.14, 71.34, 70.47, 69.17, 68.68, 68.55, 67.31, 66.32, 66.19, 63.56, 63.04, 61.98, 61.18, 60.35, 55.41, 53.47, 50.89, 49.89, 49.35, 49.33, 43.99, 36.47, 35.04, 31.66, 31.27, 29.49–28.78, 28.09, 26.86, 26.84, 26.73, 26.69, 25.85, 24.97, 22.91, 22.31, 21.68, 21.34, 19.30, 15.21 (C6 Fuc $\alpha$ ); ИЭР МСВР: найдено  $m/z$  771.8093, рассчитано для  $C_{67}H_{101}N_9O_{28}S_2^{2+}$ ,  $[M + 2H]^{2+}$  771.8093.

Алкин (**17**) (5.6 мг, 0.0023 ммоль) и азид (**13**) (4.0 мг, 0.0026 ммоль) растворяли в смеси DMSO–H<sub>2</sub>O, 1 : 1 (0.5 мл) и замораживали жидким азотом. Колбу заполняли аргоном и давали смеси оттаять, после чего в противотоке аргоном добавляли растворы CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (0.29 мг, 0.0012 ммоль в 50 мкл H<sub>2</sub>O), NaAsc (0.23 мг, 0.0012 ммоль в 50 мкл H<sub>2</sub>O), ТНРТА (0.50 мг, 0.0012 ммоль в 50 мкл H<sub>2</sub>O). Через 1 ч реакционную смесь подвергали гель-хроматографии (CH<sub>3</sub>CN–H<sub>2</sub>O, 1 : 1); фракции, содержащие чистый продукт объединяли, концентрировали и подвергали лиофильной сушке из воды, получили 6.9 мг (86%) СЛК (**18**) в виде розовой пены,  $R_f$  0.22 (*i*-PrOH–MeOH–CH<sub>3</sub>CN–H<sub>2</sub>O, 4 : 3 : 8 : 4), <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O–CD<sub>3</sub>OD, 2 : 1, 800 МГц): 8.59 (т, *J* 13.3, 1H, C=CH SuCy-3), 7.94 (с, 2H, ArH), 7.91 (т, *J* 8.8, 2H, 2 C=CH SuCy-3), 7.82 (с, 1H, триазольный цикл), 7.45 (т, *J* 9.1 2H, ArH), 6.47 (дд, *J* 13.5, 8.0, 2H, ArH), 5.37 (д, *J*<sub>1,2</sub> 4.8, 1H, H1 Fucα), 5.37–5.33 (м, 4H, 2 HC=CH), 5.30–5.26 (м, 1H, C(2)H глицерина), 5.19 (д, *J*<sub>1,2</sub> 3.9, 1H, H1 GalNAcα), 4.61 (д, *J*<sub>1,2</sub> 7.6, 1H, H1 Galβ), 4.50 (д, *J*<sub>1,2</sub> 8.4, 1H, H1 GlcNAcβ), 4.45 (дд, *J* 12.3, 2.1, 1H, C(1)H глицерина), 4.39 (м, 1H, H5 Galβ), 4.34 (кв, *J* 6.5, 1H, H5 Fucα), 4.30–4.26 (м, 2H, H2 GalNAcα, H-4 Galβ) 4.34–3.86, 3.83–3.64 (2м, 49H, 12H, 17H A<sub>tetra</sub>, 12 C(O)CH<sub>2</sub>N (CMG), 4 NCH<sub>2</sub>C(O)O (CMG), NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP, C(1)H' и C(3)H<sub>2</sub> глицерина, ОСННCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, CH<sub>2</sub>N SuCy3, C(O)CHN лизин, NCH<sub>3</sub>), 3.58–3.54 (м, 1H, ОСННCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.46–3.22 (м, 8H, H5 GlcNAcβ, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, ОСН<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHHN), 3.17–3.12 (м, 1H, ОСН<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHHN), 3.02 (т, *J* 7.4, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.70 (т, *J* 7.4, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.40 – 2.26 (м, 12H, 6 C(O)CH<sub>2</sub>), 2.06 (с, 3H, NC(O)CH<sub>3</sub>), 2.03 (с, 3H, NC(O)CH<sub>3</sub>), 2.00–1.92 (м, 8H, 2 CH<sub>2</sub>C=CCH<sub>2</sub>), 1.92–1.84 (м, 4H, ОСН<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, CH<sub>2</sub>), 1.81 (с, 12H, 2 C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.80–1.55 (м, 20H, 6 C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, 4 CH<sub>2</sub>), 1.39–1.19 (м, 45H, 21 CH<sub>2</sub>, H6 Fucα), 0.87 (т, *J* 7.1, 6H, 2 CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-ЯМР (D<sub>2</sub>O–CD<sub>3</sub>OD, 2 : 1, 201 МГц, DEPT): 153.33 (C=CH SuCy-3), 129.62 (C=C олеoil), 127.05 (C=CH SuCy-3), 123.12 (CH триазол), 119.73 (C(Ar)H SuCy-3), 111.44 (C(Ar)H SuCy-3), 103.73 (C(Ar)H SuCy-3), 101.16 (C1 GlcNAcβ), 100.19 (C1 Galβ), 98.97 (C1 Fucα), 91.65 (C1 GalNAcα), 76.41, 75.78, 75.42, 75.22, 72.51, 72.11, 71.76, 71.32, 70.64, 70.61, 70.02, 68.45, 67.99, 67.81, 67.78, 66.77, 64.16, 63.98, 63.44, 63.19, 61.98, 61.94, 61.89, 61.55, 62.43, 61.40, 61.11, 60.62, 55.41, 54.32, 52.91–51.85, 51.60, 50.84, 49.56, 44.13–43.90, 40.50–40.01, 39.98,

39.83, 38.84, 38.75, 38.52, 36.10, 35.26, 35.19, 34.81, 34.30–33.63, 31.90, 30.76, 30.52, 30.60–29.48, 29.28, 28.64, 27.12–26.55, 25.53, 25.45–24.59, 22.74, 22.42, 22.10, 21.92, 15.45 (C6 Fucα), 13.90 (2 CH<sub>3</sub>); ИЭР МСВР: найдено *m/z* 1725.2752, рассчитано для C<sub>153</sub>H<sub>237</sub>N<sub>24</sub>O<sub>59</sub>PS<sub>2</sub><sup>2-</sup>, [M – 2H]<sup>2-</sup> 1725.2738; найдено *m/z* 1149.8477, рассчитано для C<sub>153</sub>H<sub>236</sub>N<sub>24</sub>O<sub>59</sub>PS<sub>2</sub><sup>3-</sup>, [M – 3H]<sup>3-</sup> 1149.8492; найдено *m/z* 862.1339, рассчитано для C<sub>153</sub>H<sub>235</sub>N<sub>24</sub>O<sub>59</sub>PS<sub>2</sub><sup>4-</sup>, [M – 4H]<sup>4-</sup> 862.1357; найдено *m/z* 689.5057, рассчитано для C<sub>153</sub>H<sub>234</sub>N<sub>24</sub>O<sub>59</sub>PS<sub>2</sub><sup>5-</sup>, [M – 5H]<sup>5-</sup> 689.5077; найдено *m/z* 754.4202<sup>6-</sup>, рассчитано для C<sub>153</sub>H<sub>233</sub>N<sub>24</sub>O<sub>59</sub>PS<sub>2</sub>, [M – 6H]<sup>6-</sup> 574.4225.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы два бифункциональных липофильных конструктора, содержащих тетрасахарид А (тип 2) (гликан), CMG–DOPE (спейсер-липид) и отличающиеся флуоресцентной меткой (флуоресцеин или сульфоцианин-3). Опробованы две синтетические стратегии, отличающиеся порядком конъюгирования составных блоков; обе стратегии позволяют получать СЛК, содержащие другие гликаны и флуоресцентные метки.

Синтезированные липофильные конструкторы предназначены для прямой флуоресцентной визуализации гликанов, встроенных в клеточную мембрану в составе СЛК. Независимый характер введения гликана и флуоресцентной метки в конструктор (они не связаны ковалентно и разнесены пространственно) исключает влияние флуорофора на узнавание углеводной части СЛК гликан-специфическими белками, что позволит исследовать взаимодействие последних с гликанами непосредственно в составе гликокаликса клетки.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-23-00756 “Синтетические гликолипидные биоконъюгаты как инструменты исследования эукариотической клетки”.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rapoport E.M., Khasbiullina N.R., Komarova V.A., Ryzhov I.M., Gorbach M.M., Tuzikov A.B., Khaidukov S.V., Popova I.S., Korchagina E.Y., Henry S.M., Bovin N.V.* // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2021. V. 1863. P. 183645.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183645>
2. *Frame T., Carroll T., Korchagina E., Bovin N., Henry S.* // *Transfusion.* 2007. V. 47. P. 876–882.  
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01204.x>
3. *Korchagina E., Tuzikov A., Formanovsky A., Popova I., Henry S., Bovin N.* // *Carbohydr. Res.* 2012. V. 356. P. 238–246.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.03.044>
4. *Henry S., Williams E., Barr K., Korchagina E., Tuzikov A., Ilyushina N., Abayzeed S.A., Webb K.F., Bovin N.* // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 2845.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21186-3>
5. *Zalygin A., Solovyeva D., Vaskan I., Henry S., Schaefer M., Volynsky P., Tuzikov A., Korchagina E., Ryzhov I., Nizovtsev A., Mochalov K., Efremov R., Shtykova E., Oleinikov V., Bovin N.* // *ChemistryOpen.* 2020. V. 9. P. 641–648.  
<https://doi.org/10.1002/open.201900276>
6. *Ryzhov I.M., Tuzikov A.B., Nizovtsev A.V., Baidakova L.K., Galanina O.E., Shilova N.V., Ziganshina M.M., Dolgushina N.V., Bayramova G.R., Sukhikh G.T., Williams E.C., Nagappan R., Henry S.M., Bovin N.V.* // *Bioconjug. Chem.* 2021. V. 32. P. 1606–1616.  
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00186>
7. *Lan C.-C., Blake D., Henry S., Love D.R.* // *J. Fluoresc.* 2012. V. 22. P. 1055–1063.  
<https://doi.org/10.1007/s10895-012-1043-3>
8. *Barr K., Korchagina E., Ryzhov I., Bovin N., Henry S.* // *Transfusion.* 2014. V. 54. P. 2477–2484.  
<https://doi.org/10.1111/trf.12661>
9. *Williams E., Korchagina E., Frame T., Ryzhov I., Bovin N., Henry S.* // *Transfusion.* 2016. V. 56. P. 325–333.  
<https://doi.org/10.1111/trf.13384>
10. *Rapoport E.M., Ryzhov I.M., Slivka E.V., Korchagina E.Y., Popova I.S., Khaidukov S.V., André S., Kaltner H., Gabius H.J., Henry S., Bovin N.V.* // *Biomolecules.* 2023. V. 13. P. 1–12.  
<https://doi.org/10.3390/biom13081166>
11. *Mikhalyov I.I., Molotkovsky Jul.G.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2003. V. 29. P. 168–174.  
<https://doi.org/10.1023/A:1023264516818>
12. *Yamaguchi E., Komura N., Tanaka H.N., Imamura A., Ishida H., Groux-Degroote S., Mühlenhoff M., Suzuki K.G.N., Ando H.* // *Glycoconj. J.* 2023. V. 40. P. 247–257.  
<https://doi.org/10.1007/s10719-023-10102-1>
13. *Ryzhov I.M., Korchagina E.Y., Popova I.S., Tyrtysh T.V., Paramonov A.S., Bovin N.V.* // *Carbohydr. Res.* 2016. V. 430. P. 59–71.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.04.029>
14. *Petrakova D.O., Savchenko M.S., Popova I.S., Tuzikov A.B., Paramonov A.S., Chizhov A.O., Bovin N.V., Ryzhov I.M.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023. V. 49. P. 785–796.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162023040143>
15. *Vokhmyanina O.A., Rapoport E.M., André S., Severov V.V., Ryzhov I., Pazynina G.V., Korchagina E., Gabius H.-J., Bovin N.V.* // *Glycobiology.* 2012. V. 22. P. 1207–1217.  
<https://doi.org/10.1093/glycob/cws079>
16. *Henry S.M., Bovin N.V.* // *J. R. Soc. New Zeal.* 2019. V. 49. P. 100–113.  
<https://doi.org/10.1080/03036758.2018.1546195>
17. *Twibanire J.D.A.K., Grindley T.B.* // *Org. Lett.* 2011. V. 13. P. 2988–2991.  
<https://doi.org/10.1021/ol201005s>
18. *Ryzhov I.M., Tuzikov A.B., Perry H., Korchagina E.Y., Bovin N.V.* // *ChemBioChem.* 2019. V. 20. P. 131–133.  
<https://doi.org/10.1002/cbic.201800289>
19. *Meldal M., Tornøe C.W.* // *Chem. Rev.* 2008. P. 108. P. 2952–3015.  
<https://doi.org/10.1021/cr0783479>
20. *Baskin J.M., Prescher J.A., Laughlin S.T., Agard N.J., Chang P.V., Miller I.A., Lo A., Codelli J.A., Bertozzi C.R.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 16793–16797.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0707090104>

21. Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B. // *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* 2002. V. 41. P. 2596–2599.  
[https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4)
22. Hong V., Presolski S.I., Ma C., Finn M.G. // *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* 2009. V. 48. P. 9879–9883.  
<https://doi.org/10.1002/anie.200905087>
23. Chan T.R., Hilgraf R., Sharpless K.B., Fokin V.V. // *Org. Lett.* 2004. V. 6. P. 2853–2855.  
<https://doi.org/10.1021/ol0493094>
24. Sturabotti E., Vetica F., Toscano G., Calcaterra A., Martinelli A., Migneco L.M., Leonelli F. // *Molecules.* 2023. V. 28. P. 581.  
<https://doi.org/10.3390/molecules28020581>
25. Tyrtysheva T.V., Korchagina E.Y., Ryzhov I.M., Bovin N.V. // *Carbohydr. Res.* 2017. V. 449. P. 65–84.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.06.014>
26. Meloncelli P.J., Lowary T.L. // *Carbohydr. Res.* 2010. V. 345. P. 2305–2322.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.08.012>

## Synthesis of Bifunctional Lipophilic Constructs

D. O. Anisimova\*, M. S. Savchenko\*, A. B. Tuzikov\*, A. S. Paramonov\*, A. O. Chizhov\*\*, N. V. Bovin\*, and I. M. Ryzhov\*\*,#

# Phone: +7 (495) 330-03-00; e-mail: imryzhov@gmail.com

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

\*\* N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Leninskiy prosp. 47, Moscow, 119991 Russia

An ability of glycolipids to embed membrane of living cells opens an opportunity to modify cellular surface via insertion of synthetic lipophilic constructs carrying given glycan (or any other molecular fragment). Detection of thus inserted glycans by fluorescent microscopy requires treatment with corresponding fluorescently labeled antibodies. Di- (IgG) and decavalent (IgM) antibodies can significantly affect the distribution of glycolipids in the membrane, therefore direct visualization of embedded lipophilic constructs is required. To achieve this, fluorescent tag must be included in the composition of the lipophilic constructs and at the same time be located at a sufficient distance from glycan part. Here we propose two approaches to the synthesis of these compounds and describe obtaining of two constructs carrying A (type 2) tetrasaccharide and either fluorescein or sulfo-cyanine-3.

*Keywords:* glycolipid, fluorescein, sulfo-cyanine-3, A (type 2) tetrasaccharide, glycocluster, dioleoylphosphatidyl ethanolamine, carboxymethylglycine, click chemistry



УДК 577.112.083

## БЕЛОК ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА SLURP-2 КАК ПРОТОТИП РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ

© 2024 г. М. Л. Бычков<sup>\*, †</sup>, О. В. Шлепова<sup>\*, \*\*, †</sup>, М. А. Шулепко<sup>\*\*\*</sup>, Д.С. Кульбацкий<sup>\*</sup>,  
Д. Бертран<sup>\*\*\*\*</sup>, А. В. Кириченко<sup>\*, \*\*, †</sup>, З. О. Шенкарев<sup>\*</sup>,  
М. П. Кирпичников<sup>\*, \*\*\*\*\*, #</sup>, Е. Н. Люкманова<sup>\*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*\*, #</sup>

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

\*\* Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),  
Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

\*\*\* Shenzhen MSU-BIT University, International University Park Road 1, Dayun New Town, Longgang District,  
Shenzhen, Guangdong Province, 518172 PRC

\*\*\*\* HiQScreen Sàrl, 6 rte de Compois, 1222, Vérenaz, Geneva, Switzerland

\*\*\*\*\* Междисциплинарная научно-образовательная школа “Молекулярные технологии живых систем и  
синтетическая биология”, биологический факультет Московского государственного университета  
им. М.В. Ломоносова,

Россия, 119234 Москва, ул. Ленинские горы, 1/12

Поступила в редакцию 08.11.2023 г.

После доработки 17.11.2023 г.

Принята к публикации 18.11.2023 г.

Ранозаживление – сложный процесс, основанный на регуляции пролиферации и миграции клеток эпителия. Хронически незаживающие раны характеризуются повышенной пролиферацией и отсутствием миграции клеток эпидермиса. Секретируемый белок человека SLURP-2 регулирует рост и дифференцировку эпителиальных клеток. Ранее было показано, что мишенью действия SLURP-2 являются различные типы никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR), а также мускариновые ацетилхолиновые рецепторы, участвующие в регуляции гомеостаза эпителиальных клеток. В данной работе мы обнаружили, что показанное ранее ускорение миграции кератиноцитов под действием белка SLURP-2 обусловлено его взаимодействием с nAChR  $\alpha 7$ -типа. С помощью аланин-сканирующего мутагенеза мы показали, что мутация R20A молекулы SLURP-2 увеличивает ингибирующую активность SLURP-2 по отношению к  $\alpha 7$ -nAChR и приводит к еще большей стимуляции миграции кератиноцитов Het-1A и при этом, в отличие от SLURP-2, не стимулирует, а подавляет пролиферацию клеток Het-1A. В то же время другие мутации SLURP-2 приводят одновременно к ингибированию  $\alpha 7$ -nAChR, пролиферации и миграции кератиноцитов. Таким образом, была получена новая информация о локализации участков молекулы SLURP-2, замена которых может приводить к направленному изменению биологической активности SLURP-2. Дальнейшие исследования возможности регуляции активности SLURP-2 и создание на его основе препаратов направленного действия могут быть полезны для разработки новых лекарств, стимулирующих ранозаживление.

**Ключевые слова:** SLURP-2, SLURP-1, Луб/iPAR, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, кератиноциты, миграция, ранозаживление

**DOI:** 10.31857/S0132342324030059, **EDN:** NZXTGW

### ВВЕДЕНИЕ

Нарушение процесса ранозаживления приводит к появлению хронически незаживающих ран, что зачастую влечет за собой инвалидизацию и потерю

трудоспособности пациентов. Хронически незаживающие раны характеризуются гиперпролиферативным и немигрирующим эпидермисом [1]. Несмотря на наличие различных методов лечения, успешное заживление ран остается серьезной

Сокращения: nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор; mAChR – мускариновый ацетилхолиновый рецептор; ACh – ацетилхолин;  $\alpha$ -Bgtx –  $\alpha$ -бунгаротоксин.

<sup>†</sup> – Равный вклад авторов.

<sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-80-11, эл. почта: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru).

проблемой современной медицины. Одна из перспективных стратегий лечения ран – активация сигнальных путей, контролирующей миграцию клеток, играющую важную роль в реэпителизации ран [2].

Известно, что никотиновые и мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR и mAChR соответственно) вовлечены в процессы миграции и пролиферации кератиноцитов [3–5]. Активация nAChR ацетилхолином (ACh) или никотином приводит к замедлению миграции эпидермальных кератиноцитов [6], подавляет врожденный иммунитет и антимикробную активность кожи [7]. Гомопентамерный рецептор  $\alpha 7$ -типа ( $\alpha 7$ -nAChR) экспрессируется в эпителиальных, иммунных клетках и вовлечен в развитие и прогрессирование различных заболеваний кожи, таких как атопический дерматит, склеродерма, псориаз и др. [8], а также в регуляцию процесса заживления ран [9]. Активация  $\alpha 7$ -nAChR ингибирует реэпителизацию, ангиогенез и пролиферацию эпителиальных клеток в модели закрытой раны *in vivo* [10], а селективный необратимый антагонист  $\alpha 7$ -nAChR- $\alpha$ -бунгаротоксин ( $\alpha$ -Bgtx) усиливает спонтанную миграцию кератиноцитов [3].

Некоторые белки с “трехпетельной” пространственной структурой, принадлежащие семейству Lуб/uPAR [11], экспрессируются в эпителиальных клетках и могут быть вовлечены в процессы реэпителизации. Например, экспрессия белка uPAR повышается в тканях, претерпевающих активное ремоделирование, в том числе в кератиноцитах при заживлении ран [12]. Секретируемые белки человека SLURP-1 и SLURP-2 рассматриваются как ауто/паракринные регуляторы эпителиального гомеостаза, поскольку предотвращают онкотрансформацию кератиноцитов, вызванную нитрозаминами [13], и регулируют дифференцировку кератиноцитов [14, 15]. Экспрессия гена *SLURP2* в коже людей, больных псориазом, повышена в 3 раза по сравнению с кожей здоровых людей [16]. Точечные мутации в белке SLURP-1 приводят к развитию аутосомного воспалительного заболевания кожи Mal de Meleda [17]. Кроме того, нокаут гена *slurp1* или *slurp2* у мышей также приводит к развитию этого заболевания [18, 19]. Известно, что SLURP-1 подавляет пролиферацию [20, 21] и миграцию кератиноцитов [22], а SLURP-2, наоборот, усиливает пролиферацию и миграцию кератиноцитов [22, 23]. Кроме того, SLURP-2 увеличивает экспрессию интегринов  $\alpha 5$  и  $\alpha V$  [22], участвующих в регуляции миграции клеток при ранозаживлении, и подавляет экспрессию

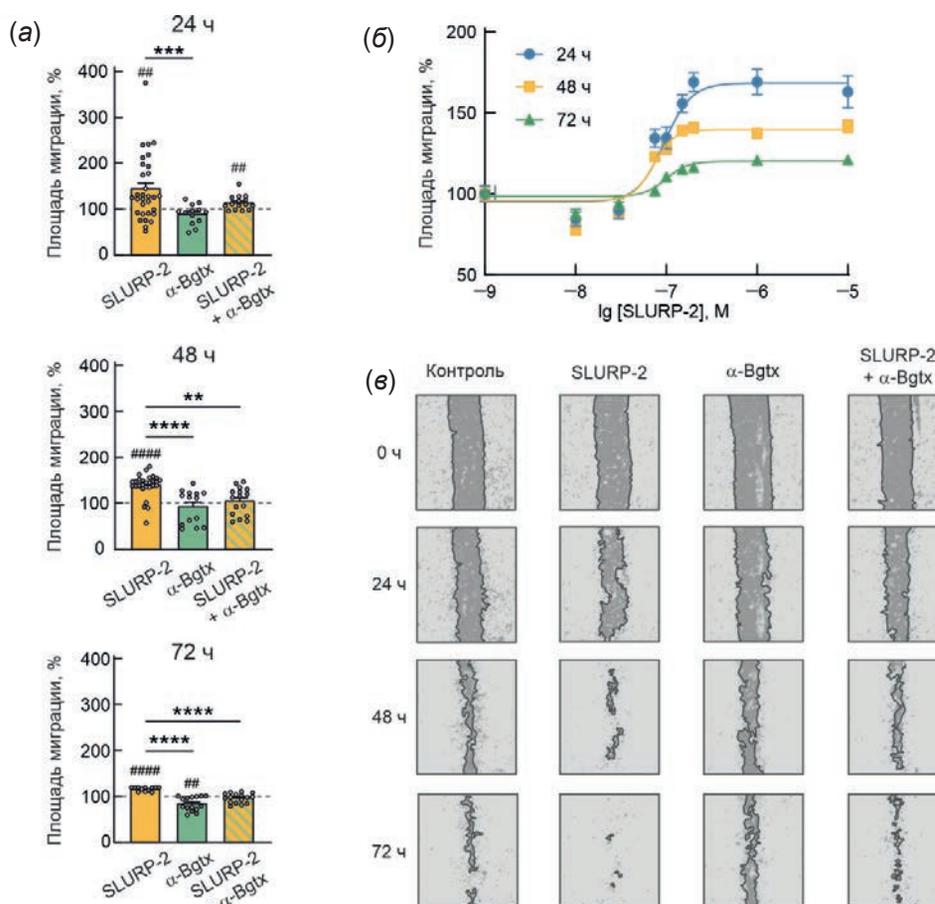
провоспалительных цитокинов в эпителиальных клетках кишечника и иммунocyтах [24]. Было показано, что SLURP-2 может взаимодействовать с субъединицами  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$ , и  $\beta 4$  nAChR, а также с mAChR M1- и M3-типов. SLURP-2 ингибирует ток через  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 2$  и  $\alpha 7$ -nAChR в микромолярных концентрациях, построены компьютерные модели его взаимодействия с nAChR [23]. Однако не было изучено, какие участки молекулы SLURP-2 важны для регуляции пролиферации и миграции кератиноцитов и взаимодействие с каким именно рецептором обуславливает активность белка SLURP-2 человека.

Цель данной работы – определение рецепторов, опосредующих влияние SLURP-2 на миграцию кератиноцитов, и поиск функционального эпитопа модулятора.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Стимулирующий миграцию кератиноцитов эффект SLURP-2 обусловлен взаимодействием с  $\alpha 7$ -nAChR.** Ранее было показано, что рекомбинантный SLURP-2 усиливает пролиферацию кератиноцитов с эффективной концентрацией ( $EC_{50}$ )  $\sim 8$  нМ при 48-часовой инкубации [23]. В данной работе, используя тест на застывание раны (scratch-test), мы показали, что SLURP-2 в концентрации 1 мкМ после 24-часовой инкубации ускоряет миграцию кератиноцитов Het-1A на  $\sim 70\%$ . Стимулирующее влияние SLURP-2 на миграцию сохранялось и при более длительной инкубации в течение 48 и 72 ч (рис. 1а). Величина воздействия SLURP-2 на миграцию зависела от концентрации, при этом значения  $EC_{50}$  составили  $95.1 \pm 21.6$ ,  $72.0 \pm 15.8$  и  $99.5 \pm 17.4$  нМ для 24-, 48-, и 72-часовой инкубации соответственно (рис. 1а). Разный диапазон  $EC_{50}$ , возможно, обусловлен взаимодействием модулятора с разными рецепторами. Ранее было выявлено, что SLURP-2 усиливает пролиферацию кератиноцитов, взаимодействуя с  $\alpha 3\beta 2$ -nAChR и M1-mAChR [23].

Мы предположили, что влияние SLURP-2 на миграцию может быть обусловлено взаимодействием с  $\alpha 7$ -nAChR. Для проверки этого предположения мы изучили влияние SLURP-2 на миграцию клеток Het-1A в присутствии селективного необратимого ингибитора  $\alpha 7$ -nAChR,  $\alpha$ -Bgtx. Одновременная инкубация кератиноцитов с 1 мкМ  $\alpha$ -Bgtx и 1 мкМ SLURP-2 отменяла стимулирующий эффект модулятора на миграцию, как и инкубация кератиноцитов только с  $\alpha$ -Bgtx (рис. 1б, 1в). Таким образом, подавление активности  $\alpha 7$ -nAChR

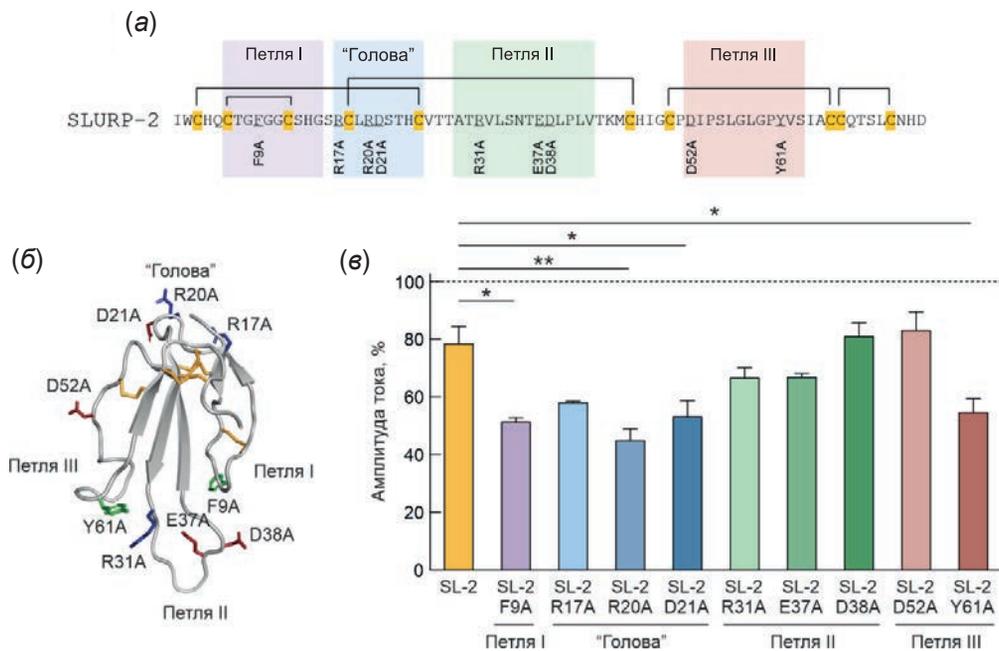


**Рис. 1.** Влияние рекомбинантного белка SLURP-2 и  $\alpha$ -Bgtx на миграцию клеток Het-1A: (а) – влияние различных концентраций SLURP-2 на площадь миграции после 24-, 48- и 72-часовой инкубации. Данные представлены в процентах от контроля  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 8-30$ ), 100% соответствует площади миграции необработанных клеток. Данные аппроксимированы уравнением Хилла ( $y = A1 + (100\% - A1)/(1 + ([SLURP-2]/EC_{50})^n$ ). Рассчитанные параметры  $EC_{50}$ , nH и A1 составили  $95.1 \pm 21.6$  nM,  $2.9 \pm 1.2$  и  $168 \pm 11\%$  для 24 ч,  $72.0 \pm 15.8$  nM,  $3.9 \pm 1.7$  и  $140 \pm 6\%$  для 48 ч и  $99.5 \pm 17.4$  nM,  $3.6 \pm 2.1$  и  $120 \pm 4\%$  для 72 ч; (б) – площадь, занимаемая мигрирующими клетками Het-1A после 24-, 48- и 72-часовой инкубации. Данные представлены в процентах от контроля  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 13-30$ ), 100% соответствует площади миграции необработанных клеток.  $\# p < 0.01$  и  $\#\#\# p < 0.0001$  указывают на достоверное отличие от контроля (100%) по одностороннему критерию Стьюдента с последующим Holm-Sidak/хос-тестом;  $* p < 0.01$  и  $*** p < 0.001$  означают достоверное отличие от группы “SLURP-2” по одностороннему тесту ANOVA с последующим Dunnet’s/хос-тестом; (в) – репрезентативные изображения теста “заживление раны” для клеток Het-1A, инкубированных с 100 нМ SLURP-2, 1 мкМ  $\alpha$ -Bgtx и 100 нМ SLURP-2 совместно с 1 мкМ  $\alpha$ -Bgtx в течение 0, 24, 48 и 72 ч.

с помощью ингибитора  $\alpha$ -Bgtx отменяет эффект SLURP-2, указывая на  $\alpha 7$ -nAChR как на рецептор, обуславливающий влияние SLURP-2 на миграцию кератиноцитов.

**Точечные мутации в I и III петлях, а также в “голове” молекулы SLURP-2 усиливают ингибирование тока через  $\alpha 7$ -nAChR.** Для определения функционально значимых участков молекулы SLURP-2 был проведен аланин-сканирующий мутагенез заряженных и ароматических остатков (F9A, R17A, R20A, D21A, R31A, E37A, D38A, D52A, Y61A) с одиночными аминокислотными заме-

нами в петлях I–III и “голове” белка (рис. 2а, 2б). Для полученных девяти мутантных вариантов SLURP-2 были выполнены электрофизиологические записи с использованием ооцитов *Xenopus laevis*, экспрессирующих  $\alpha 7$ -nAChR человека. Амплитуду ACh-вызванных токов, зарегистрированных в отсутствие SLURP-2 или его мутантов сравнивали с токами, наблюдаемыми в присутствии 0.3 мкМ модулятора или его мутантов. Ингибирование тока через  $\alpha 7$ -nAChR вариантами SLURP-2 с заменами R31A, D38A во II (центральной) петле и D52A в III петле не отличалось от



**Рис. 2.** Влияние SLURP-2 и его мутантов на ацетилхолин-индуцированные токи через каналы  $\alpha 7$ -nAChR, экспрессированные в ооцитах *Xenopus laevis*: (а) – аминокислотная последовательность SLURP-2. Остатки цистеина выделены желтым, дисульфидные связи показаны скобками. Мутированные аминокислотные остатки подписаны снизу; (б) – пространственная структура SLURP-2 (PDB: 2n99) с обозначенными на ней остатками, замененными на аланин; (в) – амплитуда токов, вызванных 40 мкМ АСh, в ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих  $\alpha 7$ -nAChR, в присутствии 1 мкМ SLURP-2 (SL-2) или его мутантов. Данные представлены в процентах от контроля  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 3$ ), 100% соответствуют амплитуде тока, вызванного 40 мкМ АСh, в необработанных ооцитах. \*  $p < 0.05$  и \*\*  $p < 0.01$  означают достоверное отличие от группы “SLURP-2” по одностороннему тесту ANOVA с последующим Dunnet’s/hoc-тестом.

действия белка SLURP-2 дикого типа. Напротив, мутации F9A, R20A, D21A и Y61A в первой и третьей петлях, а также в “голове” молекулы SLURP-2 привели к усилению ингибирования тока через  $\alpha 7$ -nAChR (рис. 2в).

Примечательно, что ни одна из выбранных мутаций не приводила к отмене ингибирующего эффекта SLURP-2 по отношению к  $\alpha 7$ -nAChR, что свидетельствует о том, что данные аминокислотные остатки не являются ключевыми во взаимодействии SLURP-2 именно с этим рецептором, но, возможно, они важны для взаимодействия с другим белком-партнером  $\alpha 7$ -nAChR, участвующим в регуляции гомеостаза эпителия. Наличие у  $\alpha 7$ -nAChR такого белка-партнера было предсказано ранее [25–27]. Так, для другого трехпетельного белка из эпителия SLURP-1 было показано, что некоторые точечные мутации его молекулы приводят к появлению проапоптотической активности модулятора, возможно, обусловленной уменьшением взаимодействия модулятора с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и усилением

взаимодействия с  $\alpha 7$ -nAChR [21]. Стоит отдельно отметить, что возможность образования комплекса  $\alpha 7$ -nAChR/EGFR была подтверждена в клетках рака легочного эпителия [28]. Похожая ситуация может наблюдаться и для эпидермального модулятора SLURP-2. Аминокислотные остатки, замена которых приводят к усилению ингибирования тока через  $\alpha 7$ -nAChR, могут быть ответственны за взаимодействие с другими клеточными рецепторами, участвующими в регуляции миграции и/или пролиферации. Как и в случае SLURP-1, ослабление взаимодействия с другой мишенью может приводить к усилению взаимодействия с  $\alpha 7$ -nAChR, изменяя активность SLURP-2. Для проверки этой гипотезы мы исследовали влияние мутантов SLURP-2 на пролиферацию и миграцию кератиноцитов.

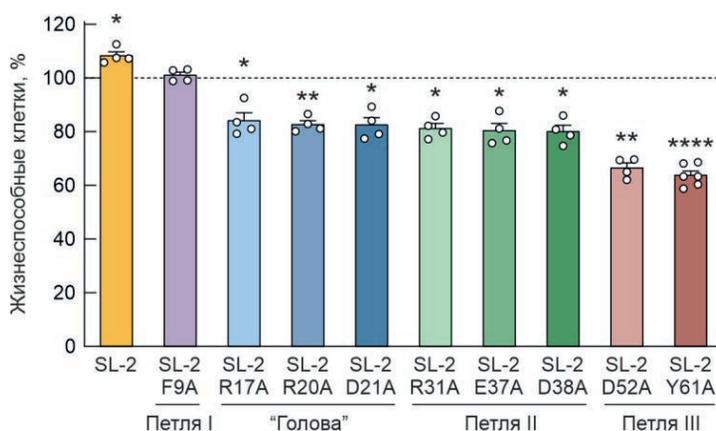
**Точечные мутации во второй и третьей петлях, а также в “голове” молекулы SLURP-2 приводят к появлению антипролиферативной активности модулятора.** Мы изучили влияние полученных мутантных вариантов белка

SLURP-2 на пролиферацию кератиноцитов Het-1A. Ранее было показано, что инкубация клеток Het-1A с 1 мкМ SLURP-2 оказывает небольшой, но достоверный стимулирующий эффект на пролиферацию (~16% [23]). В данном исследовании мы также наблюдали достоверное умеренное увеличение числа жизнеспособных клеток под действием SLURP-2, однако ни один из исследуемых мутантных вариантов белка не оказывал такого же воздействия на пролиферацию кератиноцитов (рис. 3). Мутант с заменой F9A не оказывал влияния на рост клеток, а все остальные мутанты SLURP-2 заметно снижали пролиферацию кератиноцитов на ~20–30% относительно контроля (рис. 3).

Отсутствие закономерности и связи эффектов мутантов SLURP-2, наблюдаемых для проводимости канала  $\alpha 7$ -nAChR и пролиферации кератиноцитов, позволяет предположить, что влияние модулятора на пролиферацию обусловлено взаимодействием с другими рецепторами. Это согласуется с выдвинутой выше гипотезой и ранее полученными данными, показавшими, что применение ингибиторов  $\alpha 3\beta 2$ -nAChR или mAChR приводит к отмене усиления пролиферации белком SLURP-2 [23]. Интересно, что SLURP-2 дикого типа ингибирует рост некоторых типов раковых клеток, карциномы толстой кишки, молочной железы и кожи, но не карциномы легкого [29, 30]. Избирательное действие SLURP-2, вероятно, определяется различным репертуаром ацетилхолиновых рецепторов, экспрессирующихся на поверхности клеток разного типа. Аминокислотные

остатки, мутации в которых приводят к появлению антипролиферативной активности в отношении кератиноцитов Het-1A, вероятно, являются ключевыми для взаимодействия с рецепторами, экспрессия которых выше в кератиноцитах, чем в раковых клетках. Таким образом, репертуар рецепторов, с которыми взаимодействует мутантный вариант SLURP-2 с заменой R20A в клетках Het-1A, по-видимому, такой же, как репертуар рецепторов, с которыми взаимодействует белок SLURP-2 дикого типа в раковых клетках.

**Введение мутации R20A в молекулу SLURP-2 приводит к усилению стимуляции миграции кератиноцитов.**  $\alpha 7$ -nAChR – один из рецепторов, контролирующих миграцию клеток, и его ингибирование ускоряет спонтанную миграцию кератиноцитов [3]. SLURP-2 также ускоряет миграцию кератиноцитов, и этот эффект обусловлен участием  $\alpha 7$ -nAChR (рис. 1a). Мы предположили, что мутации в белке SLURP-2, приводящие к усилению ингибирования тока через  $\alpha 7$ -nAChR, могут усиливать стимулирующее действие модулятора на миграцию кератиноцитов. При этом для поиска варианта SLURP-2, который мог бы выступить в качестве прототипа ранозаживляющего препарата, мы исключили из последующего анализа мутант SLURP-2 с заменой F9A в первой петле, не оказывающий какого-либо влияния на пролиферацию (рис. 3). Также круг исследуемых мутантов с заменами во второй, третьей петлях и в “голове” был сужен до мутантов с заменами R20A и Y61A, продемонстрировавших наибольшее ингибирующее влияние на  $\alpha 7$ -nAChR (рис. 2).

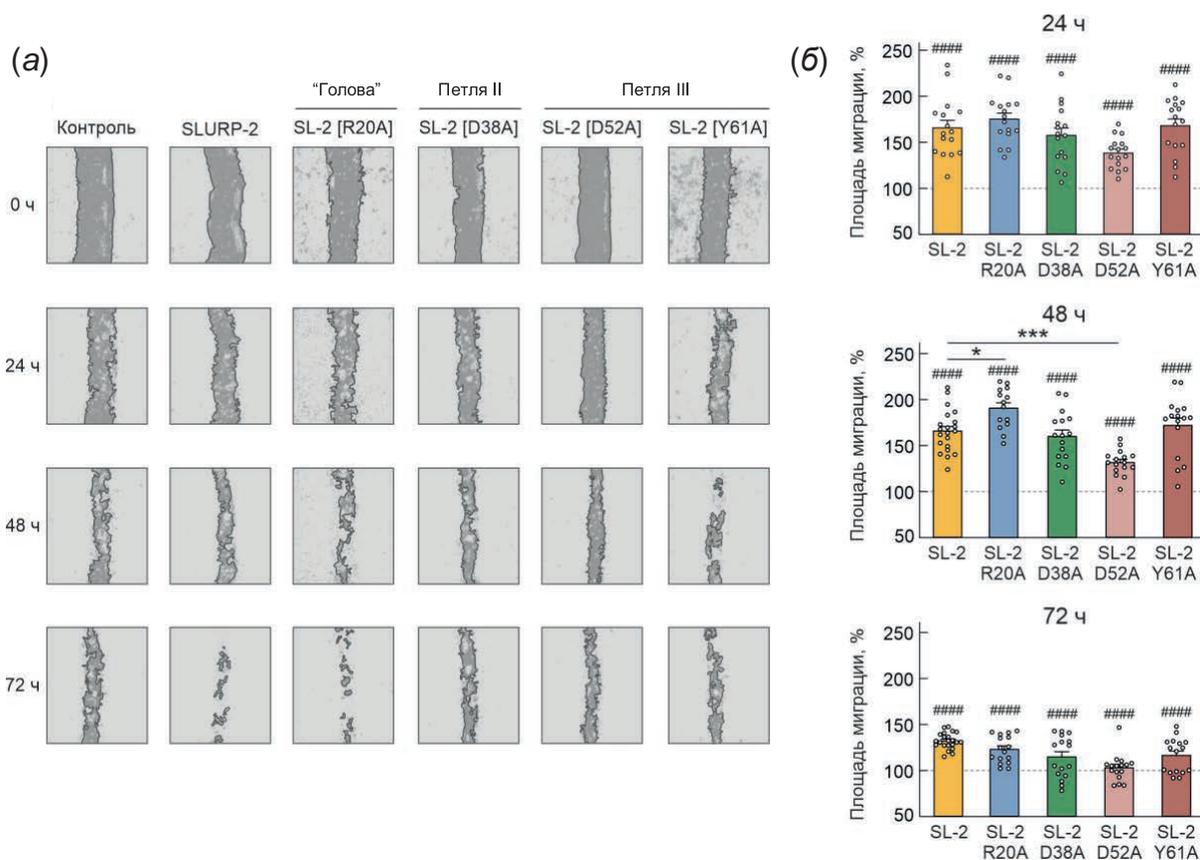


**Рис. 3.** Влияние SLURP-2 и его мутантов на пролиферацию клеток Het-1A. Клетки инкубировали в течение 48 ч с 1 мкМ SLURP-2 (SL-2) или его мутантов. Число жизнеспособных клеток определяли с помощью WST1-теста. Данные приведены в процентах от контроля  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 4-6$ ), 100% жизнеспособных клеток соответствует необработанным клеткам. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  и \*\*\*\*  $p < 0.0001$  указывают на достоверное отличие от контроля (100%) по одностороннему критерию Стьюдента с последующим Holm-Sidak/хос-тестом.

В качестве контроля для подтверждения связи между ингибирующим действием на  $\alpha 7$ -nAChR и влиянием на миграцию кератиноцитов были выбраны мутанты с заменами D38A (вторая петля) и D52A (третья петля), ингибирующие  $\alpha 7$ -рецептор с той же эффективностью, что и SLURP-2 дикого типа (рис. 2).

С помощью теста на миграцию (scratch assay) мы показали, что инкубация кератиноцитов с 1 мкМ мутантов SLURP-2 в течение 24, 48 и 72 ч во всех случаях приводила к значительному повышению площади, занятой мигрирующими клетками, по сравнению с необработанными клетками. При этом влияние мутанта SLURP-2 с заменой R20A на количество мигрировавших клеток после 48-часовой инкубации оказалось значительно сильнее эффекта SLURP-2 дикого типа (рис. 4а, 4б), что согласуется с предположением,

что более сильный ингибирующий эффект на  $\alpha 7$ -nAChR соответствует большему стимулирующему влиянию на миграцию. В то же время замена Y61A, приводящая к увеличению ингибирующего эффекта по отношению к  $\alpha 7$ -nAChR (рис. 2в) и ингибированию пролиферации (рис. 3), не оказывала заметного влияния на миграционную активность SLURP-2 (рис. 4а, 4б). При этом, как и ожидалось, мутант с заменой D38A, не влияющий на активность SLURP-2 по отношению к  $\alpha 7$ -nAChR, продемонстрировал влияние на миграцию кератиноцитов, схожее с эффектом SLURP-2, а мутант с заменой D52A, не оказывающий влияния на активность SLURP-2 по отношению к  $\alpha 7$ -nAChR, наоборот, показал снижение стимулирующего воздействия на миграцию (рис. 4а, 4б). Возможно, существуют дополнительные факторы, обуслов-



**Рис. 4.** Влияние SLURP-2 и его мутантов на миграцию клеток Het-1A: (а) – репрезентативные изображения теста “заживление раны” для клеток Het-1A, инкубированных с 1 мкМ SLURP-2 (SL-2) или его мутантов в течение 0, 24, 48 и 72 ч; (б) – площадь, занимаемая мигрирующими клетками Het-1A после 24-, 48- и 72-часовой инкубации. Данные представлены в процентах от контроля  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 16$ ), 100% соответствует площади миграции необработанных клеток. ####  $p < 0.0001$  указывает на достоверное отличие от контроля (100%) по одностороннему критерию Стьюдента с последующим Holm-Sidak/hoc-тестом; \*  $p < 0.05$  и \*\*\*  $p < 0.001$  означают достоверное отличие от группы “SLURP-2” по одностороннему тесту ANOVA с последующим Dunnet’s/hoc-тестом.

ливающие роль  $\alpha 7$ -nAChR в регуляции гомеостаза кератиноцитов и активность SLURP-2.

Таким образом, наиболее удачным вариантом SLURP-2, способным одновременно ингибировать пролиферацию и стимулировать миграцию кератиноцитов, оказался мутант с заменой R20A в “голове” молекулы модулятора – он продемонстрировал наибольший ингибирующий эффект по отношению к  $\alpha 7$ -nAChR. Важно отметить, что в последнее время появляется все больше подтверждений, что петлевой участок, расположенный в “голове” трехпетельных белков, может играть важную роль в их активности, стабилизируя взаимодействие как с мембранным окружением рецепторов-мишеней, так и обуславливая селективность по отношению к различным мишеням [31–33].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Культивирование клеток.** Клетки Het-1A человека (иммортилизованная линия кератиноцитов полости рта человека) были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, CRL-2692, США). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в среде BEBM (Lonza/Clonetics Corporation, Швейцария) с добавлением факторов роста BEGM (Lonza) в соответствии с рекомендациями ATCC. Культуральные планшеты предварительно покрывали раствором 0.01 мг/мл фибронектина (Sigma-Aldrich, США), 0.03 мг/мл бычьего коллагена I типа (Sigma-Aldrich, США) и 0.01 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma-Aldrich, США). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, пересевали минимум 2 раза в неделю.

**Получение SLURP-2 и его мутантов.** Мутантные гены *SLURP2*, кодирующие мутанты с заменами F9A, R17A, R20A, D21A, R31A, E37A, D38A, D52A и Y61A, были получены методом сайт-направленного мутагенеза и клонированы в плазмидный вектор *pET22b(+)* (Merck KGaA, Германия) по сайтам NdeI и HindIII. Рекомбинантный препарат SLURP-2 и его мутанты получали в клетках *E. coli*, как описано ранее [29]; чистоту и корректную пространственную структуру препаратов подтверждали с помощью масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии.

**Электрофизиологические эксперименты.** Эксперименты с двухэлектродной фиксацией потенциала проводили с использованием ооцитов *Xenopus laevis*. Ооциты были подготовлены, как описано ранее [34]. В ооциты вводили 2 нг кДНК,

кодирующей  $\alpha 7$ -nAChR человека, и проводили электрофизиологический анализ проводимости канала рецептора через 2–5 суток. Все записи выполняли с помощью автоматизированной двухэлектродной системы фиксации напряжения (HiClamp, MultiChannel System, Германия). Ооциты фиксировали при –100 мВ и перфузировали в растворе, содержащем 82.5 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, 2.5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ HEPES и 20 мкг/мл BSA. Раствор доводили до pH 7.4. Данные оцифровывали и анализировали с использованием MATLAB (Mathworks, США).

**Влияние SLURP-2 и его мутантов на жизнеспособность клеток Het-1A.** Клетки высевали в 96-луночные планшеты (5 × 10<sup>3</sup> клеток на лунку), через 24 ч к клеткам добавляли 1 мкМ SLURP-2 или его мутантов, разведенных в культуральной среде из 250 мкМ стокового раствора в 100%-ном DMSO. Затем клетки инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 ч, жизнеспособность клеток оценивали с использованием реагента WST-1 (водорастворимая соль тетразолия 1; Santa Cruz, США). WST-1 растворяли в 20 мМ HEPES (pH 7.4), а реагент переноса электронов, 1-м-PMS (1-метокси-5-метилфеназиний метилсульфат, Santa Cruz), растворяли в деионизированной воде. Затем растворы смешивали и добавляли в лунки (0.5 мМ WST-1 и 20 мкМ 1-м-PMS на лунку). После 3-часовой инкубации при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> с WST-1 жизнеспособность клеток оценивали путем измерения оптической плотности при 450 нм с выравниванием на фон при 655 нм на планшетном ридере Bio-Rad 680 (Bio-Rad, США). Полученные результаты анализировали с помощью программы Graphpad Prism 8.0 (GraphPad Software, США).

**Влияние SLURP-2 и его мутантов на миграцию клеток Het-1A.** Анализ влияния SLURP-2, его мутантов и  $\alpha$ -бунгаротоксина на миграцию клеток Het-1A в модели “заживление раны” *in vitro* (scratch assay) проводили согласно методике, описанной ранее [25]. Клетки Het-1A высевали в 96-луночные планшеты (3 × 10<sup>4</sup> клеток/лунку) и выращивали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. Затем стерильным наконечником пипетки объемом 10 мкл процарапывали вертикальную полосу (насадка GenFollower, E-FTB10S, Китай), после чего клетки промывали PBS и добавляли 1 мкМ SLURP-2 или его мутантов, или 1 мкМ  $\alpha$ -Bgtx, или 1 мкМ SLURP-2 совместно с 1 мкМ  $\alpha$ -Bgtx, разведенных в среде из 250 мкМ стокового раствора в 100%-ном DMSO. Снимки лунок

с процарапанными полосами анализировали через 0, 24, 48 и 72 ч при увеличении 20 $\times$ , используя систему анализа клеток CloneSelect Imager (Molecular Devices, США). Центр лунки планшета отмечали как центральную точку отсчета, чтобы обеспечить фотографирование лунки без сдвига. Получали цифровые изображения, площадь царапин оценивали с помощью программ ImageJ (НИН, США) и MS Excel (Microsoft, США), вычисляя процент поверхности царапин, занятой мигрирующими клетками. Полученные результаты анализировали с помощью программы Graphpad Prism 8.0 (GraphPad Software).

**Статистическая обработка данных.** Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Количество образцов ( $n$ ) указано в подписях к рисункам. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0. Данные были проанализированы на предмет нормального распределения с помощью теста Шапиро–Уилка. Анализ проводили с использованием одностороннего критерия Стьюдента с последующим Holm-Sidak/нос-тестом и одностороннего теста ANOVA с последующим Dunnett's/нос-тестом. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые показано, что белок эпителия человека SLURP-2 ускоряет миграцию кератиноцитов за счет взаимодействия с  $\alpha 7$ -nAChR. Мутация в “голове” модулятора R20A приводит к усилению ингибирования тока через  $\alpha 7$ -nAChR, благодаря этому мутант SLURP-2 с заменой R20A ускоряет миграцию кератиноцитов эффективнее, чем SLURP-2 дикого типа, при этом, в отличие от SLURP-2, мутация приводит не к стимуляции, а к ингибированию пролиферации.

Таким образом, ингибирование  $\alpha 7$ -nAChR с помощью эндогенных белков или их мутантов может являться перспективной стратегией для разработки новых ранозаживляющих препаратов.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00636).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Eming S.A., Martin P., Tomic-Canic M.* // *Sci. Transl. Med.* 2014. V. 6. P. 265sr6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>
2. *Seeger M.A., Paller A.S.* // *Adv. Wound Care.* 2015. V. 4. P. 213–224. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0540>
3. *Chernyavsky A.I.* // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117. P. 5665–5679. <https://doi.org/10.1242/jcs.01492>
4. *Nguyen V.T., Chernyavsky A.I., Arredondo J., Berco- vich D., Orr-Urtreger A., Vetter D.E., Wess J., Beaudet A.L., Kitajima Y., Grando S.A.* // *Exp. Cell Res.* 2004. V. 294. P. 534–549. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.12.010>
5. *Curtis B.J., Radek K.A.* // *J. Invest. Dermatol.* 2012. V. 132. P. 28–42. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.264>
6. *Kishibe M., Griffin T.M., Radek K.A.* // *Int. Immunopharm.* 2015. V. 29. P. 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.05.047>
7. *Radek K.A., Elias P.M., Taupenot L., Mahata S.K., O'Connor D.T., Gallo R.L.* // *Cell Host Microbe.* 2010. V. 7. P. 277–289. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.03.009>
8. *Stegemann A., Böhm M.* // *Exp. Dermatol.* 2020. V. 29. P. 924–931. <https://doi.org/10.1111/exd.14173>
9. *Werner S., Grose R.* // *Physiol. Rev.* 2003. V. 83. P. 835–870. <https://doi.org/10.1152/physrev.2003.83.3.835>
10. *Li J.-Y., Jiang S.-K., Wang L.-L., Zhang M.-Z., Wang S., Jiang Z.-F., Liu Y.-L., Cheng H., Zhang M., Zhao R., Guan D.-W.* // *Inflammation.* 2018. V. 41. P. 474–484. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0703-5>
11. *Vasilyeva N.A., Loktyushov E.V., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N.* // *Biochem. Mosc.* 2017. V. 82. P. 1702–1715. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0703-5>
12. *Rømer J., Lund L.R., Eriksen J., Pyke C., Kristensen P., Danø K.* // *J. Invest. Dermatol.* 1994. V. 102. P. 519–522. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0703-5>
13. *Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A.* // *Biochem. Pharmacol.* 2007. V. 74. P. 1315–1319. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.026>

14. *Arredondo J., Chernyavsky A.I., Jolkovsky D.L., Webber R.J., Grando S.A.* // *J. Cell. Physiol.* 2006. V. 208. P. 238–245.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.20661>
15. *Arredondo J., Chernyavsky A.I., Webber R.J., Grando S.A.* // *J. Invest. Dermatol.* 2005. V. 125. P. 1236–1241.  
<https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23973.x>
16. *Tsuji H., Okamoto K., Matsuzaka Y., Iizuka H., Tamiya G., Inoko H.* // *Genomics.* 2003. V. 81. P. 26–33.  
[https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(02\)00025-3](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(02)00025-3)
17. *Perez C., Khachemoune A.* // *Am. J. Clin. Dermatol.* 2016. V. 17. P. 63–70.  
<https://doi.org/10.1007/s40257-015-0157-1>
18. *Adeyo O., Allan B.B., Barnes R.H., Goulbourne C.N., Tatar A., Tu Y., Young L.C., Weinstein M.M., Tontonoz P., Fong L.G., Beigneux A.P., Young S.G.* // *J. Invest. Dermatol.* 2014. V. 134. P. 1589–1598.  
<https://doi.org/10.1038/jid.2014.19>
19. *Allan C.M., Procaccia S., Tran D., Tu Y., Barnes R.H., Larsson M., Allan B.B., Young L.C., Hong C., Tontonoz P., Fong L.G., Young S.G., Beigneux A.P.* // *J. Invest. Dermatol.* 2016. V. 136. P. 436–443.  
<https://doi.org/10.1016/j.jid.2015.11.003>
20. *Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Kudryavtsev D., Bychkov M.L., Kulbatskii D.S., Kasheverov I.E., Astapova M.V., Feofanov A.V., Thomsen M.S., Mikkelsen J.D., Shenkarev Z.O., Tsetlin V.I., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.* // *PLoS One.* 2016. V. 11. P. e0149733.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149733>
21. *Shulepko M.A., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Kulbatskii D.S., Makhonin A.M., Paramonov A.S., Chugunov A.O., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N.* // *J. Invest. Dermatol.* 2021. V. 141. P. 2229–2237.  
<https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.01.035>
22. *Chernyavsky A.I., Kalantari-Dehaghi M., Phillips C., Marchenko S., Grando S.A.* // *Wound Repair Regen.* 2012. V. 20. P. 103–113.  
<https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00753.x>
23. *Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Shenkarev Z.O., Bychkov M.L., Paramonov A.S., Chugunov A.O., Kulbatskii D.S., Arvaniti M., Dolejsi E., Schaer T., Arseniev A.S., Efremov R. G., Thomsen M., Dolezal V., Bertrand D., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.* // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 30698.  
<https://doi.org/10.1038/srep30698>
24. *Chernyavsky A.I., Galitovskiy V., Shchepotin I.B., Grando S.A.* // *BioMed Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 609086.  
<https://doi.org/10.1155/2014/609086>
25. *Bychkov M.L., Shulepko M.A., Shlepova O.V., Kulbatskii D.S., Chulina I.A., Paramonov A.S., Baidakova L.K., Azev V.N., Koshelev S.G., Kirpichnikov M.P., Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N.* // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 739391.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.739391>
26. *Shlepova O.V., Shulepko M.A., Shipunova V.O., Bychkov M.L., Kukushkin I.D., Chulina I.A., Azev V.N., Shramova E.I., Kazakov V.A., Ismailova A.M., Palikova Y.A., Palikov V.A., Kalabina E.A., Shaykhutdinova E.A., Slashcheva G.A., Tukhovskaya E.A., Dyachenko I.A., Murashev A.N., Deyev S.M., Kirpichnikov M.P., Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N.* // *Front. Cell Dev. Biol.* 2023. V. 11. P. 1256716.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1256716>
27. *Chernyavsky A.I., Arredondo J., Qian J., Galitovskiy V., Grando S.A.* // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 22140–22148.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.011395>
28. *Chernyavsky A.I., Shchepotin I.B., Grando S.A.* // *Int. Immunopharm.* 2015. V. 29. P. 36–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.05.033>
29. *Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Chugunov A.O., Arseniev A.S., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.* // *Acta Nat.* 2014. V. 6. P. 60–66.  
<https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-4-60-66>
30. *Lyukmanova E., Bychkov M., Sharonov G., Efremenko A., Shulepko M., Kulbatskii D., Shenkarev Z., Feofanov A., Dolgikh D., Kirpichnikov M.* // *Br. J. Pharmacol.* 2018. V. 175. P. 1973–1986.  
<https://doi.org/10.1111/bph.14194>
31. *Lesovoy D.M., Bocharov E.V., Lyukmanova E.N., Kosinsky Y.A., Shulepko M.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Efremov R.G., Arseniev A.S.* // *Biophys. J.* 2009. V. 97. P. 2089–2097.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.07.037>
32. *Shenkarev Z.O., Chesnokov Y.M., Zaigraev M.M., Chugunov A.O., Kulbatskii D.S., Kocharovskaya M.V., Paramonov A.S., Bychkov M.L., Shulepko M.A., Nolde D.E., Kamyshinsky R.A., Yablokov E.O., Ivanov A.S., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N.* // *Commun. Biol.* 2022. V. 5. P. 1344.  
<https://doi.org/10.1038/s42003-022-04308-6>
33. *Lyukmanova E.N., Mironov P.A., Kulbatskii D.S., Shulepko M.A., Paramonov A.S., Chernaya E.M., Logashina Y.A., Andreev Y.A., Kirpichnikov M.P., Shenkarev Z.O.* // *Toxins.* 2023. V. 15. P. 378.  
<https://doi.org/10.3390/toxins15060378>
34. *Hogg R.C., Bandelier F., Benoit A., Dosch R., Bertrand D.* // *J. Neurosci. Methods.* 2008. V. 169. P. 65–75.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.11.028>

# Human Epithelial Protein SLURP-2 as a Prototype of Drugs for Wound Healing

M. L. Bychkov<sup>\*, †</sup>, O. V. Shlepova<sup>\*, \*\*, †</sup>, M. A. Shulepko<sup>\*\*\*</sup>, D. S. Kulbatskii<sup>\*</sup>, D. Bertrand<sup>\*\*\*\*</sup>,

A. V. Kirichenko<sup>\*, \*\*</sup>, Z. O. Shenkarev<sup>\*</sup>,

M. P. Kirpichnikov<sup>\*, \*\*\*\*\*, #</sup>, and E. N. Lyukmanova<sup>\*, \*\*, \*\*\*\*, \*\*\*\*\*, #</sup>

<sup>#</sup> Phone: +7 (495) 336-80-11, e-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

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

<sup>\*\*</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),  
Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

<sup>\*\*\*</sup> Shenzhen MSU-BIT University, International University Park Road 1,  
Dayun New Town, Longgang District, Shenzhen, Guangdong Province, 518172 PRC

<sup>\*\*\*\*</sup> HiQScreen Sàrl, 6 rte de Compois, 1222, Vérenaz, Geneva, Switzerland

<sup>\*\*\*\*\*</sup> Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University  
“Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology”, Faculty of Biology,  
Lomonosov Moscow State University,  
Leninskiye Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

Wound healing is a complex process based on the regulation of proliferation and migration of epithelial cells. Chronic wounds are characterized by increased proliferation and lack of migration of epidermal cells. The secreted human protein SLURP-2 regulates the growth and differentiation of epithelial cells. It has previously been shown that the targets of SLURP-2 are various types of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), as well as muscarinic acetylcholine receptors involved in the regulation of epithelial cell homeostasis. In this work, we found that the previously demonstrated acceleration of keratinocyte migration under the incubation with SLURP-2 is due to its interaction with  $\alpha 7$  type nAChR. Using alanine scanning mutagenesis, we showed that the R20A mutation of the SLURP-2 molecule increases the inhibitory activity of SLURP-2 towards  $\alpha 7$ -nAChR and leads to an even greater stimulation of Het-1A keratinocyte migration, while, in contrast to SLURP-2, does not stimulate, but suppresses the proliferation of Het-1A cells. At the same time, other SLURP-2 mutations simultaneously lead to inhibition of  $\alpha 7$ -nAChR, proliferation and migration of keratinocytes. Thus, new information was obtained about the localization of regions of the SLURP-2 molecule, the replacement of which can lead to a targeted change in the biological activity of SLURP-2. Further research into the possibility of regulating the activity of SLURP-2 and the creation of targeted drugs based on it may be useful for the development of new drugs that stimulate wound healing.

*Keywords:* SLURP-2, SLURP-1, Ly6/uPAR, nicotinic acetylcholine receptor, keratinocytes, migration, wound healing

—  
<sup>†</sup>, these authors contributed equally.



УДК 577.112.083+577.25

# НОВЫЙ БЕЛОК ГЛОСАКСИН, СОСТОЯЩИЙ ИЗ НЕКАТАЛИТИЧЕСКИХ ДОМЕНОВ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ ТИПА РIII, ИЗ ЯДА ЩИТОМОРДНИКА *Gloydius saxatilis* ИНГИБИРУЕТ НИКОТИНОВЫЙ ХОЛИНОРЕЦЕПТОР

© 2024 г. А. В. Осипов\*, Е. В. Крюкова\*, Л. О. Оджомоко\*, И. В. Шелухина\*, Р. Х. Зиганшин\*, В. Г. Старков\*, Т. В. Андреева\*, В. И. Цетлин\*, Ю. Н. Уткин\*,#

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

Поступила в редакцию 10.10.2023 г.

После доработки 21.10.2023 г.

Принята к публикации 22.10.2023 г.

Ранее нами было обнаружено, что яд каменистого щитомордника *Gloydius saxatilis* ингибирует никотиновый холинорецептор (нХР) мышечного типа. В данной работе с применением жидкостной хроматографии из яда выделен белок глосаксин, ингибирующий связывание  $\alpha$ -бунгаротоксина с нХР мышечного типа *Torpedo californica*. Аминокислотную последовательность выделенного белка анализировали методом масс-спектрометрии высокого разрешения. Последующий биоинформационный анализ показал, что она гомологична аминокислотным последовательностям дизинтегрин-подобных белков, включающих некаталитические домены металлопротеиназ типа РIII яда щитомордников (род *Gloydius*). Исследование биологической активности выделенного белка показало, что он ингибирует связывание  $\alpha$ -бунгаротоксина с нХР *Torpedo californica* ( $IC_{50} = 51$  мкМ). Белок также ингибирал функциональные ответы нейронного нХР  $\alpha 3\beta 2$ -подтипа человека, вызванные ацетилхолином. Это первые данные о способности белков, состоящих из некаталитических доменов металлопротеиназы типа РIII яда змей, ингибировать нХР.

*Ключевые слова:* каменистый щитомордник, яд, никотиновый холинорецептор, ингибитор, металлопротеиназа РIII, домен

DOI: 10.31857/S0132342324030067, EDN: NZXBSU

## ВВЕДЕНИЕ

Яды змей, используемые как орудия охоты или средства защиты, наиболее эффективно нарушают функционирование нервной или сердечно-сосудистой системы. Яды одних видов змей, относящихся в основном к семейству Elapidae, поражают прежде всего нервную систему и считаются нейротоксическими; яды других видов, относящихся главным образом к семейству Viperidae, нарушают деятельность сердечно-сосудистой системы и оказывают гемотоксическое действие. Однако это разделение достаточно условное, например, гемотоксические яды содержат нейротоксические соединения [1]. Тем не менее основные компоненты гемотоксических ядов – белки и пептиды, воздействующие на сердечно-сосудистую

систему. Это могут быть ферменты, такие как сериновые протеиназы и металлопротеиназы, или белки, не обладающие ферментативной активностью, например, дизинтегрины. Как правило, ферменты являются преобладающими компонентами гемотоксических ядов и определяют их коагулопатические свойства. Наиболее представленные токсины в ядах змей семейства Viperidae – металлопротеиназы, содержание которых в ядах гадюковых в среднем составляет 27% [2], достигая почти 43% в яде *Vipera anatolica senliki* [3].

Металлопротеиназы змеиного яда представляют собой обширную группу многодоменных белков, проявляющих различные виды биологической активности [4]. В частности, они обладают способностью к протеолитическому расщепле-

Сокращения:  $\alpha$ -Bgt –  $\alpha$ -бунгаротоксин; нХР – никотиновый холинорецептор.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-65-22; эл. почта: yutkin@yandex.ru; utkin@ibch.ru).

нию фибриногена, фибрина и ингибированию агрегации тромбоцитов, что проявляется в нарушениях свертываемости крови при укусах змеями семейства Viperidae. В зависимости от состава доменов, образующих эти ферменты, существует три класса металлопротеиназ: PI, PII и PIII. В состав белков класса PI входит только каталитический металлопротеиназный домен. В ферментах класса PII в дополнение к домену металлопротеиназы содержится домен дизинтегрин. Члены класса PIII включают металлопротеиназный, дизинтегриноподобный и богатый цистеином домены. Следует отметить, что белки классов PII и PIII подвергаются посттрансляционному протеолизу, и в ядах присутствуют как дизинтегрины, так и белки, включающие оба некаталитических домена. Последние называют еще дизинтегриноподобными белками. Нельзя также исключить возможность посттрансляционного расщепления белков PI. Дизинтегрины избирательно связываются с интегринами – гетеродимерными рецепторами, участвующими в межклеточном и клеточно-матриксном взаимодействии, которые рассматриваются в качестве терапевтических мишеней [5]. Функции дизинтегриноподобных белков, включающих два некаталитических домена, не столь хорошо исследованы, к тому же и число таких белков, идентифицированных в ядах змей, существенно меньше, чем число дизинтегринов. Тем не менее такие белки обладают способностью ингибировать агрегацию тромбоцитов [6, 7] и адгезию раковых клеток [7].

Весьма интересным эффектом обладает дизинтегриноподобный белок альтернагин-С (alternagin-C), выделенный из яда ботропса *Rhinocerosophis alternatus* [8]. Этот белок способен индуцировать экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, усиливать ангиогенез и увеличивать жизнеспособность миобластов. Исследование влияния альтернагина-С на сердечную функцию *ex vivo* пресноводных рыб показало, что белок усиливал сердечную деятельность, способствуя значительному увеличению силы сокращения (положительный инотропизм) и скорости сокращения и расслабления (положительный хронотропизм) с одновременным уменьшением значений времени до пикового напряжения мышцы, а также улучшению насосной способности [9]. Это исследование показало, что альтернагин-С улучшает сердечную функцию, увеличивая эффективность механизмов кальциевого ионообмена. Также было изучено влияние альтернагина-С на гипоксию/реоксигенацию в изолированных полосках желудочка сердца рыбы, на морфологию и плотность кровеносных со-

судов [10]. Обработка альтернагином-С обеспечивала защиту кардиомиоцитов от отрицательного инотропизма, вызванного гипоксией/реоксигенацией. Этот белок также стимулировал ангиогенез и улучшал связь между возбуждением и сокращением в условиях гипоксии. Эти результаты указывают на новую терапевтическую стратегию для лечения заболеваний, связанных с ишемией.

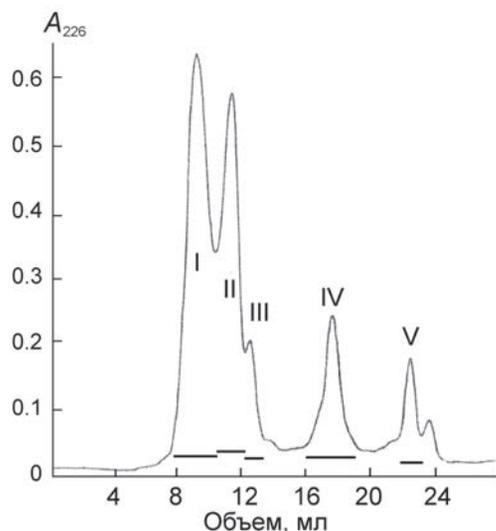
Наиболее ярко нейротоксичность ядов змей проявляется при блокировании нервно-мышечной передачи, основной элемент которой – никотиновые холинорецепторы (нХР) мышечного типа. Ранее с целью поиска новых соединений, обладающих способностью блокировать подобные нХР, нами были исследованы яды змей различных видов из семейства Viperidae [11]. Наибольшую ингибиторную активность проявил яд каменистого щитомордника *Gloydius saxatilis*. Следует отметить, что название этого вида змей не устоявшееся, и ряд авторов называет его *Gloydius intermedius* [12].

Цель настоящей работы – выделение из яда *G. saxatilis* токсина, проявляющего нейротоксичность, и его структурная характеристика. В качестве теста было использовано ингибирование функции нХР, являющегося главным элементом нервно-мышечной передачи.

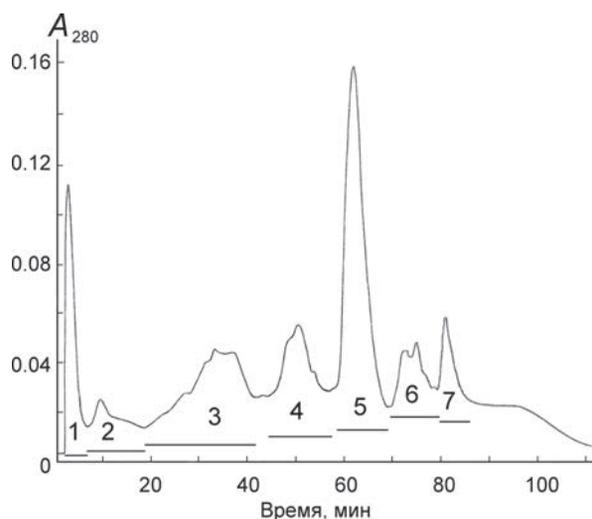
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Выделение из яда *G. saxatilis* ингибитора нХР и анализ его аминокислотной последовательности.** Для выделения активного соединения из яда щитомордника *G. saxatilis* использовали несколько стадий жидкостной хроматографии. На первой стадии проводили разделение методом гель-фильтрации на колонке Superdex 75 (рис. 1). Полученные фракции здесь и далее анализировали методом радиолигандного конкурентного анализа с использованием нХР электрического органа ската *Torpedo californica* и радиоактивного  $\alpha$ -бунгаротоксина ( $\alpha$ -Bgt) в качестве лиганда. Самую большую способность ингибировать связывание  $\alpha$ -Bgt проявила наиболее высокомолекулярная фракция I, которую далее разделяли методом ионообменной хроматографии (рис. 2). Наиболее представленная фракция 5 обладала способностью ингибировать связывание  $\alpha$ -Bgt с нХР *T. californica* и была подвергнута дальнейшему анализу.

Определение молекулярной массы методом масс-спектрометрии высокого разрешения показало, что эта величина для белка из фракции 5 (рис. 2) равна 23 307.64 Да (рис. 3). На рис. 3 представлены три набора сигналов, соответствующих



**Рис. 1.** Разделение яда *G. saxatilis* гель-фильтрацией на колонке Superdex 75 (10 × 300 мм), уравновешенной 0.1 М ацетатом аммония (pH 6.2), при скорости потока 1 мл/мин. Горизонтальные линии показывают собранные фракции.



**Рис. 2.** Разделение фракции I (см. рис. 1) методом анионообменной хроматографии на колонке Mono Q (4.6 × 100 мм) с использованием градиента концентрации хлорида натрия 0.05–0.55 М за 100 мин в 20 мМ буфере этаноламин-НСl (pH 9.5) при скорости потока 0.5 мл/мин. Горизонтальные линии показывают собранные фракции.

изотопмерам белка. Разница между левым и средним, а также между средним и третьим наборами сигналов равняется 15.99 Да и соответствует в пределах ошибки измерения массе атома кислорода, т.е. центральный и правый наборы сигналов соответствуют окисленному белку. Наиболее легко окислению в белках подвергается остаток метионина, и эта посттрансляционная модификация встречается весьма часто [13]. К примеру, ранее подобная модификация была обнаружена у фосфо-

липазы A2 из яда *Crotalus horridus* [14]. Мы также наблюдали окисление метионина в необычном токсине WTX кобры *Naja kaouthia* [15] и  $\beta$ -бунгаротоксине крайта *Bungarus multicinctus* [16].

Для характеристики аминокислотной последовательности белок восстанавливали с помощью трис(2-карбокسيэтил)фосфина, карбамидометилировали 2-хлорацетамидом, гидролизовали трипсином и анализировали полученные пептиды методом жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (рис. 4). Проведенный анализ показал, что выделенный нами белок гомологичен белкам, включающим дизинтегриноподобный и богатый остатками цистеина домены металлопротеиназ типа III из ядов змей. В частности, он имеет 68% идентичных аминокислотных остатков с белком халисетин (halysetin, VM3H\_GLOHA) [17] из яда *Agkistrodon (Gloydius) halys* (рис. 4). Выделенный нами белок назван глосаксин (от англ. glosaxin – GLOydiys SAXatilis disintegrIN-like protein).

Что касается гомологичных белков, идентифицированных у каменистого щитомордника *G. (intermedius) saxatilis*, то известны аминокислотные последовательности металлопротеиназ PII (UniProt KB: VM2SA\_GLOSA) и PIII (UniProt KB: A0A0C4ZNF1\_GLOIT), выведенные из нуклеотидных последовательностей (рис. 5). Также известна аминокислотная последовательность дизинтегрина саксатилина (saxatilin, VM2\_GLOHA), выделенного из яда *G. saxatilis* [18]. Сравнение аминокислотных последовательностей халисетина и этих белков приведено на рис. 5. Это гомологичные белки, и наибольшая степень подобия наблюдается в N-концевой части до остатков активного центра. Остатки активного центра существенно различаются. Это RGD в VM2SA\_GLOSA, VM2\_GLOHA и ECD в A0A0C4ZNF1\_GLOIT и VM3H\_GLOHA. Далее в направлении C-концевого остатка наблюдается существенное различие в аминокислотных последовательностях между этими парами белков (рис. 5).

Интересно, что ранее были идентифицированы пептидные фрагменты в металлопротеиназах, ингибирующие nXP [11, 19]. Так, пептиды Pm1 и Pm2, способные ингибировать nXP подтипа  $\alpha 7$  человека, показывая величины  $IC_{50} \sim 12$  мкМ, были идентифицированы в пропептидном домене металлопротеиназы оливковой песчаной змеи *Psammophis mossambicus* [19]. Из яда кошачьеглазой змеи *Madagascarophis colubrinus* выделен пептид маколуксин, обладающий способностью обратимо ингибировать nXP мышечного типа [11]. Для мембран *Torpedo* при конкуренции с  $^{125}I$ - $\alpha$ Bgt  $IC_{50}$  составила  $46.8 \pm 3.9$  мкМ. Маколуксин имеет высокую степень подобия с фрагментом каталитичес-

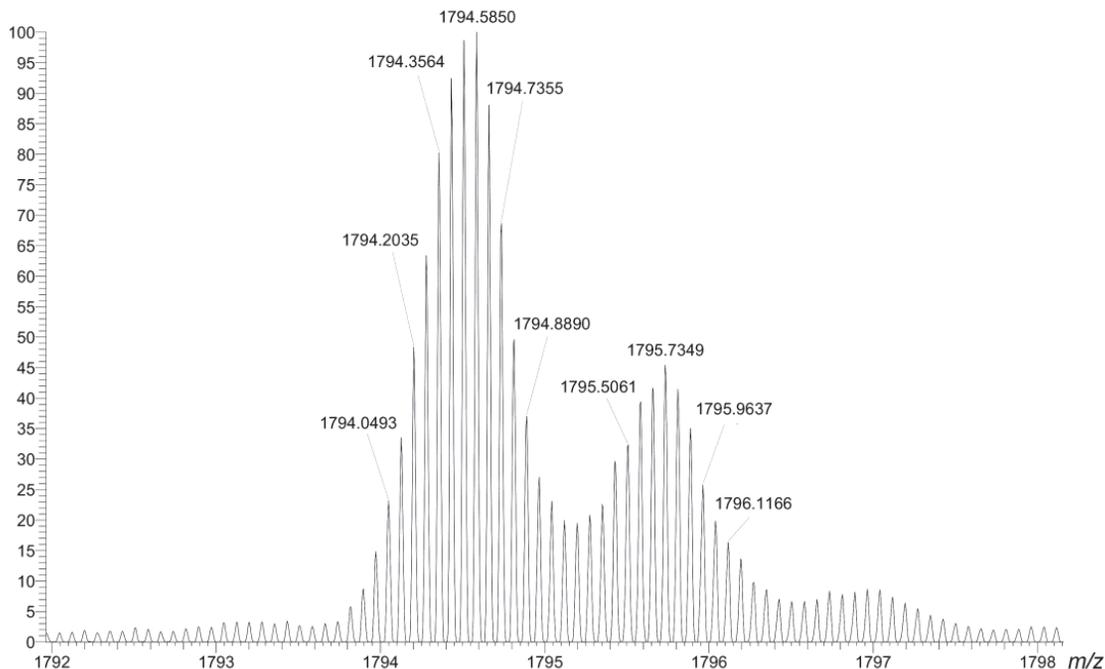


Рис. 3. Фрагмент масс-спектра высокого разрешения белка из фракции 5 (рис. 2). Показаны сигналы, соответствующие ионам  $[M + 13H]^{+13}$ ,  $z = 13$ .

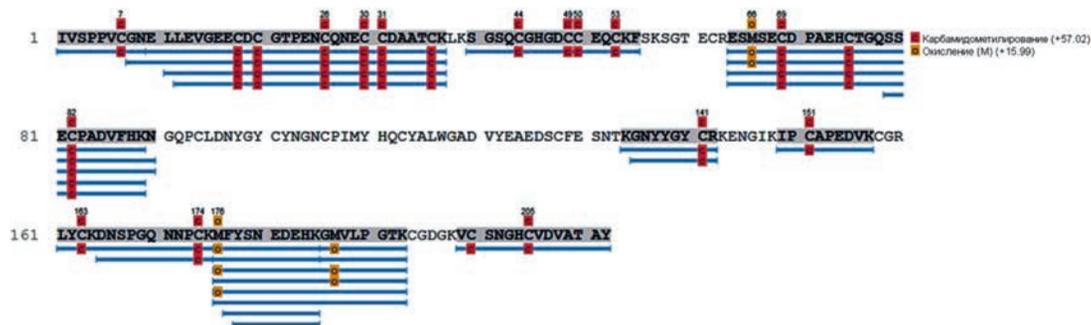


Рис. 4. Аминокислотная последовательность белка халисетина (halysetin, UniProtKB: VM3H\_GLOHA) и соответствующие ей пептиды, обнаруженные в гидролизате выделенного нами белка (показаны голубыми линиями).

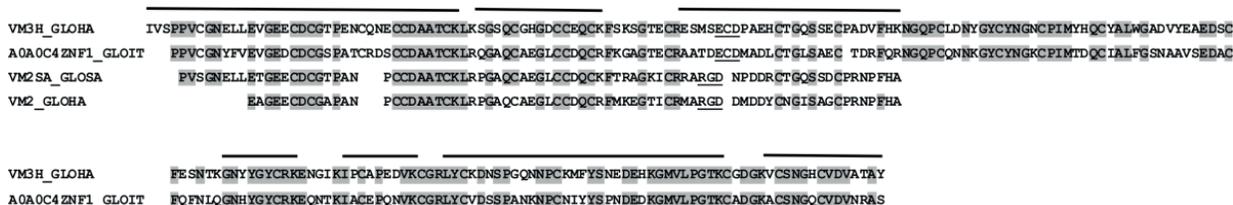


Рис. 5. Сравнение аминокислотных последовательностей некаталитических доменов металлопротеиназ некоторых видов щитомордников (род *Gloydus*). VM3H\_GLOHA – халисетин (halysetin) из яда *Agkistrodon (Gloydus) halys*, A0A0C4ZNF1\_GLOIT – фрагмент металлопротеиназы PIII *Gloydus intermedius*, VM2SA\_GLOSA – фрагмент металлопротеиназы PII *Gloydus saxatilis*, VM2\_GLOHA – дизинтегрин саксатилин (saxatilin) *Gloydus saxatilis*. Линии над последовательностями указывают пептиды халисетина, обнаруженные методом масс-спектрометрии в гидролизате нашего белка. Подчеркнуты остатки активных центров, идентичные остатки выделены серым цветом.

кого домена металлопротеиназ змеиного яда и, по-видимому, образуется в результате протеолиза этого фермента. Рассматривая проблему функционального разнообразия змеиных токсинов при ограниченном числе их структурных типов, можно предположить следующее: поскольку металлопротеиназы представляют собой преобладающие компоненты в ядах змей семейства Viperidae, их дальнейший процессинг может приводить к возникновению соединений с другими типами биологической активности, в частности с нейротоксическим действием.

#### Взаимодействие выделенного белка с нХР.

Эффективность взаимодействия глосаксина с нХР оценивали по его конкуренции с радиоактивным  $\alpha$ -Bgt ( $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ Bgt) за связывание с мембранами электрического органа ската *T. californica*, содержащими рецепторы мышечного типа ( $\alpha_1\beta_1\gamma\delta$ ), и с клетками линии  $\text{GH}_4\text{C}_1$ , экспрессирующими нейронные нХР подтипа  $\alpha 7$  человека. При этом установлено, что глосаксин ингибирует связывание  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ Bgt с мембранами *T. californica* с величиной  $\text{IC}_{50} = 50.9 \pm 1.83$  мкМ (рис. 6). В концентрации 50 мкМ он ингибировал связывание  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ Bgt с  $\alpha 7$  нХР лишь на 20%.

Чтобы проверить, является ли глосаксин функциональным ингибитором нХР, были проведены электрофизиологические эксперименты с использованием нейронного нХР подтипа  $\alpha 3\beta 2$ , гетерологически экспрессированного в ооцитах шпорцевой лягушки. Глосаксин сам по себе ионных токов не индуцировал, однако он ингибировал ток, вызванный ацетилхолином (рис. 7), хотя и при довольно высокой концентрации. Ингибирование составляло ~20% при концентрации белка 100 мкМ. Следовательно, глосаксин – слабый анатагонист нХР подтипа  $\alpha 3\beta 2$ .

Таким образом, из яда каменистого щитомордника *G. (intermedius) saxatilis* выделен белок глосаксин с молекулярной массой 23.3 кДа, обладающий способностью взаимодействовать с нХР разных типов, проявляя более высокое сродство к рецептору мышечного типа. Анализ его аминокислотной последовательности методом масс-спектрометрии показал, что данный белок гомологичен дизинтегрин-подобным белкам из ядов змей, состоит из дизинтегринового и богатого остатками цистеина доменов и представляет собой фрагмент металлопротеиназы РIII типа, включающий некаталитические домены этого фермента. Данная работа представляет собой первое указание на взаимодействие таких белков с нХР.

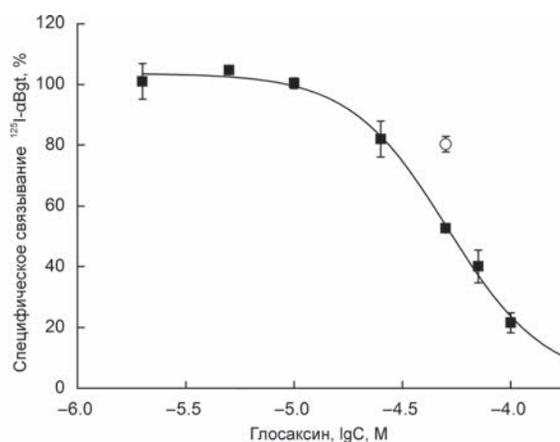


Рис. 6. Ингибирование связывания радиоактивного  $\alpha$ -Bgt с нХР *T. californica* (квадраты) и  $\alpha 7$ -подтипа (кружок) глосаксином. Для нХР *T. californica*  $\text{IC}_{50} = 50.9 \pm 1.83$  мкМ. М – молярная концентрация белка.

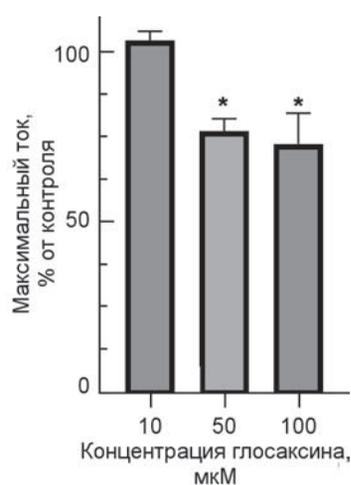


Рис. 7. Ингибирование глосаксином токов, индуцируемых ацетилхолином в нХР  $\alpha 3\beta 2$ -типа. Регистрировали ответ ооцита шпорцевой лягушки *X. laevis* на внесение 50 мкМ ацетилхолина без добавления белка (100%) и после 1 мин инкубации с различными концентрациями белка ( $n = 3$ ). \*  $p < 0.05$  ( $t$ -критерий Стьюдента).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** Мембраны *T. californica* любезно предоставлены проф. Ф. Хухо (Свободный университет Берлина, Германия). Клетки  $\text{GH}_4\text{C}_1$ , трансфицированные кДНК  $\alpha 7$  нХР человека, предоставлены компанией Eli-Lilly Co. (Великобритания). Все использованные в работе реактивы имели чистоту ч.д.а. или выше.

**Получение яда.** Яд получали от экземпляров *G. saxatilis*, содержащихся в серпентарии ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН.

После отбора яд высушивали над безводным  $\text{CaCl}_2$  и хранили при  $-20^\circ\text{C}$ .

**Выделение белка.** Яд растворяли в 0.1 М ацетате аммония (pH 6.2) и наносили на колонку с Superdex 75 ( $10 \times 300$  мм; Cytiva, США), уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили при скорости потока 1.0 мл/мин. Оптическую плотность элюента регистрировали при 226 нм. Фракцию I (рис. 1) лиофилизировали и далее разделяли методом анионообменной хроматографии на колонке MonoQ 4.6/100 PE ( $4.6 \times 100$  мм; Cytiva, США). Буфер А – 50 мМ этаноламина гидрохлорид (pH 9.5), буфер Б – он же с 1 М NaCl. Градиент 5–55% буфера Б за 100 мин, скорость потока 0.5 мл/мин, детекция выхода фракций при длине волны 280 нм (рис. 2).

**Масс-спектрометрия высокого разрешения.** Масс-спектрометрический анализ проводили, как описано ранее [20].

**Восстановление, алкилирование и гидролиз белков трипсином.** Навеску яда растворяли в восстанавливающем и алкилирующем буфере (pH 8.5) так, чтобы финальная концентрация белка, Трис, дезоксихолата натрия, трис(2-карбоксиил)фосфина и 2-хлороацетамида была 1 мг/мл, 100 мМ, 1%, 10 и 20 мМ соответственно. Раствор белков прогревали при  $95^\circ\text{C}$  в течение 10 мин, охлаждали до комнатной температуры и добавляли равный объем трипсина (Promega, США) в 100 мМ Трис (pH 8.5) в весовом соотношении 1 : 100. После инкубации в течение ночи при  $37^\circ\text{C}$  раствор триптических пептидов подкисляли ТФУ до конечной концентрации 1%, экстрагировали образовавшийся осадок дезоксихолевой кислоты в равный объем этилацетата при бурном перемешивании, разделяли этилацетат и водную фазу центрифугированием (15 000 g, 2 мин), этилацетат отбирали и отбрасывали. Процедуру экстракции повторяли трижды. Пептиды обессоливали на микроколонках StageTips, как было описано ранее [21, 22], с небольшими модификациями. Микроколонки для обессоливания пептидов изготавливали из наконечников для автоматических пипеток (200 мкл) и мембраны Empore SDB-RPS (3M). Для обессоливания 20 мкг триптического гидролизата использовали одну микроколонку с двумя кусочками мембраны, вырезанными иглой диаметром 14 G. Пептиды наносили на микроколонку центрифугированием при 200 g в течение ~6 мин, промывали смесью, состоящей из 100 мкл 1%-ной ТФУ и 100 мкл этилацетата, 100 мкл 1%-ной ТФУ, 100 мкл 0.2%-ной ТФУ и элюировали 60 мкл раствора, содержащего 5% гидроксида аммония и 40% ацетонитрила. Элюат высушивали на центрифужном вакуумном испа-

рителе досуха и хранили до хромато-масс-спектрометрического анализа при  $-85^\circ\text{C}$ .

**Хромато-масс-спектрометрический анализ пептидов.** Высушенный элюат растворяли в 20 мкл водного раствора, содержащего 2% ацетонитрила и 0.1% ТФУ, и 3 мкл наносили на колонку (диаметр 75 мкм, длина 25 см) с сорбентом Aeris Peptide XB-C18 2.6 мкм (Phenomenex, США). Разделение пептидов проводили на хроматографической системе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, США), сопряженной с масс-спектрометром Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific) посредством наноэлектроспрейного источника (Thermo Fisher Scientific). Пептиды загружали на термостатируемую при  $40^\circ\text{C}$  колонку в буфере А (0.2%-ная муравьиная кислота (FA) в воде) и элюировали с нее в течение 120 мин линейным градиентом 4–55% буфера Б (0.1% FA, 19.9% воды, 80% ацетонитрила) при скорости потока 350 нл/мин. После каждого градиента колонку промывали 95% буфера Б в течение 5 мин и уравновешивали буфером А в течение 5 мин. Масс-спектрометрические данные сохраняли при автоматическом переключении между MS1-сканированием и вплоть до 15 MS/MS-сканирований (метод topN). Целевое значение для MS1-сканирования было выставлено  $3 \times 10^6$  в диапазоне 300–1200  $m/z$  с максимальным временем инъектирования ионов 60 мс и разрешением 60 000. Изолирование ионов-прекурсоров осуществляли при ширине окна 1.4  $m/z$  и фиксированной первой массе 100  $m/z$ . Ионы-прекурсоры фрагментировали методом высокоэнергетической диссоциации в ловушке C-trap с нормализованной энергией столкновения 28 eV. MS/MS-сканы сохраняли с разрешением 15 000 при  $m/z$  400 и при значении  $1 \times 10^5$  для целевых ионов в диапазоне 200–2000  $m/z$  с максимальным временем инъекции ионов 30 мс.

**Анализ хромато-масс-спектрометрических данных.** Каталогизацию белков яда и анализ их посттрансляционных модификаций проводили с использованием компьютерной программы PEAKS Studio 8.0 build 20160908 [23]. Первичные структуры пептидов, генерируемые этой программой, анализировали, сравнивая с массивом белковых последовательностей таксономической группы Serpentes (70 112 структур), экстрагированных из базы данных UNIPROT KB (10.2017), со следующими настройками: карбамидометилирование Cys – фиксированная модификация; N-концевое ацетилирование белков, окисление Met и дезамидирование Asn/Gln – переменные модификации; специфичность протеазы – трипсин. Допустимый уровень ложноположительных identifications (FDR) пептидов

был установлен на 0.01, его определяли путем корреляции массива MS/MS-данных с реверсной базой данных белковых последовательностей, которая генерировалась программой PEAKS Studio. Идентификацию пептидов осуществляли при допустимом начальном отклонении массы иона-прекурсора до 10 ppm и допустимом отклонении массы фрагментов 0.05 Да.

**Конкурентный радиолигандный анализ.** Для экспериментов по конкурентному связыванию суспензию мембран электрического органа *T. californica* (в конечной концентрации 1.2 нМ  $\alpha$ -Bgt-связывающих участков) или клеток  $\text{GH}_4\text{C}_1$  (0.4 нМ  $\alpha$ -Bgt-связывающих участков) в 20 мМ Tris-HCl-буфере (pH 8.0), содержащем БСА в концентрации 1 мг/мл, инкубировали 90 мин с различными концентрациями глосаксина. Затем добавляли радиоактивный [ $^{125}\text{I}$ ]-меченый  $\alpha$ -Bgt (500 Ки/ммоль) до получения конечной концентрации 0.2–0.4 нМ и инкубировали еще 5 мин. Определение неспецифического связывания, фильтрацию образцов и подсчет связавшейся радиоактивности проводили, как описано Lebedev et al. [24].

**Электрофизиологические измерения.** Электрофизиологические измерения на ооцитах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* проводили по методике Lebedev et al. [24]. Различные концентрации глосаксина предварительно инкубировали с ооцитами в течение 1 мин, затем добавляли 50 мкМ ацетилхолин и регистрировали ответ. Максимальный ток, полученный в ответ на 50 мкМ ацетилхолин без добавления белка, принимали за 100%.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии из яда каменистого щитомордника *G. saxatilis* выделен белок глосаксин, ингибирующий нХР разных типов. Анализ его аминокислотной последовательности методом масс-спектрометрии показал, что она гомологична последовательностям белков, состоящих из некаталитических доменов металлопротеиназ типа РІІІ яда щитомордников (род *Gloydus*). Исследование биологической активности глосаксина обнаружило, что он ингибирует связывание  $\alpha$ -Bgt с рецептором мышечного типа *Torpedo californica* с  $\text{IC}_{50} = 51$  мкМ и слабо ингибирует связывание  $\alpha$ -Bgt с нХР  $\alpha 7$ -подтипа. Глосаксин также ингибирует функциональные ответы нХР  $\alpha 3\beta 2$ -подтипа человека, вызванные ацетилхолином. Это первые данные о способности белков, состоящих из некаталитических доменов металлопротеиназы типа РІІІ яда змей, ингибировать нХР.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00316).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры со змеями одобрены Комиссией по содержанию и использованию лабораторных животных ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН (протокол-заявка № 324/2021 от 23 июня 2021 г.).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Osipov A., Utkin Y. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 2919. <https://doi.org/10.3390/ijms24032919>
2. Tasoulis T., Pukala T.L., Isbister G.K. // Front. Pharmacol. 2022. V. 12. P. 768015. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.768015>
3. Hempel B.F., Damm M., Mrinalini, Göçmen B., Karış M., Nalbantsoy A., Kini R.M., Süßmuth R.D. // J. Proteome Res. 2020. V. 19. P. 1731–1749. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00869>
4. Olaoba O.T., Karina Dos Santos P., Selistre-de-Araujo H.S., Ferreira de Souza D.H. // Toxicon X. 2020. V. 7. P. 100052. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2020.100052>
5. Vasconcelos A.A., Estrada J.C., David V., Wermelinger L.S., Almeida F.C.L., Zingali R.B. // Front. Mol. Biosci. 2021. V. 8. P. 783301. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.783301>
6. Liu J.W., Du X.Y., Liu P., Chen X., Xu J.M., Wu X.F., Zhou Y.C. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. V. 278. P. 112–118. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3724>
7. Limam I., Bazaа A., Srairi-Abid N., Taboubi S., Jebali J., Zouari-Kessentini R., Kallech-Ziri O., Mejdoub H., Hammami A., El Ayeb M., Luis J., Marrakchi N. // Matrix Biol. 2010. V. 29. P. 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.09.009>
8. Souza D.H., Iemma M.R., Ferreira L.L., Faria J.P., Oliva M.L., Zingali R.B., Niewiarowski S., Selistre-de-Araujo H.S. // Arch. Biochem. Biophys. 2000. V. 384. P. 341–350. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2120>
9. Monteiro D.A., Kalinin A.L., Selistre-de-Araujo H.S., Vasconcelos E.S., Rantin F.T. // Toxicon. 2016. V. 110. P. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.012>
10. Monteiro D.A., Kalinin A.L., Selistre-de-Araujo H.S., Nogueira L.A.N., Beletti M.E., Fernandes M.N.,

- Rantin F.T. // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2019. V. 215. P. 67–75.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.10.003>
11. Kryukova E.V., Ivanov D.A., Kopylova N.V., Starkov V.G., Andreeva T.V., Ivanov I.A., Tsetlin V.I., Utkin Yu.N. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023. V. 49. P. 529–537.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162023030159>
  12. *Gloydus intermedius* (STRAUCH, 1868) // The Reptile Database, 2024.  
[https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Gloydus&species=intermedius&search\\_param=%28%28taxon%3D%27Crotalinae%27%29%29](https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Gloydus&species=intermedius&search_param=%28%28taxon%3D%27Crotalinae%27%29%29)
  13. Levine R.L., Moskovitz J., Stadtman E.R. // *IUBMB Life.* 2000. V. 50. P. 301–307.  
<https://doi.org/10.1080/713803735>
  14. Wang Y.M., Parmelee J., Guo Y.W., Tsai I.H. // *Toxicol.* 2010. V. 56. P. 93–100.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2010.03.015>
  15. Starkov V.G., Polyak Ya.L., Vul'fus E.A., Kryukova E.V., Tsetlin V.I., Utkin Yu.N. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2009. V. 35. P. 10–18.]  
<https://doi.org/10.1134/S1068162009010026>
  16. Osipov A.V., Cheremnykh E.G., Ziganshin R.H., Starkov V.G., Nguyen T.T.T., Nguyen K.C., Le D.T., Hoang A.N., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // *Biomedicines.* 2023. V. 11. P. 1115.  
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11041115>
  17. Liu J.W., Du X.Y., Liu P., Chen X., Xu J.M., Wu X.F., Zhou Y.C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 278. P. 112–118.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3724>
  18. Hong S.Y., Koh Y.S., Chung K.H., Kim D.S. // *Thromb. Res.* 2002. V. 105. P. 79–86.  
[https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(01\)00416-9](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(01)00416-9)
  19. Brust A., Sunagar K., Undheim E.A., Vetter I., Yang D.C., Casewell N.R., Jackson T.N., Koludarov I., Alewood P.F., Hodgson W.C., Lewis R.J., King G.F., Antunes A., Hendrikx I., Fry B.G. // *Mol. Cell. Proteomics.* 2013. V. 12. P. 651–663.  
<https://doi.org/10.1074/mcp.M112.023135>
  20. Ryabinin V.V., Ziganshin R.H., Starkov V.G., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 107–121.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162019020109>
  21. Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. P. 1896–1906.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.261>
  22. Geyer P.E., Kulak N.A., Pichler G., Holdt L.M., Teupser D., Mann M. // *Cell Syst.* 2016. V. 2. P. 185–195.  
<https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.02.015>
  23. Ma B., Zhang K., Hendrie C., Liang C., Li M., Doherty-Kirby A., Lajoie G. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003. V. 17. P. 2337–2342.  
<https://doi.org/10.1002/rcm.1196>
  24. Lebedev D.S., Kryukova E.V., Ivanov I.A., Egorova N.S., Timofeev N.D., Spirova E.N., Tufanova E.Y., Siniavin A.E., Kudryavtsev D.S., Kasheverov I.E., Zouridakis M., Katsarava R., Zavrashvili N., Iagorshvili I., Tzartos S.J., Tsetlin V.I. // *Mol. Pharmacol.* 2019. V. 96. P. 664–673.  
<https://doi.org/10.1124/mol.119.117713>

## A New Protein Glosaxin Consisting of Non-Catalytic Domains of Type PIII Metalloproteinase from the Venom of Pit Viper *Gloydus Saxatilis* Inhibits Nicotinic Acetylcholine Receptor

A. V. Osipov\*, E. V. Kryukova\*, L. O. Ojomoko\*, I. V. Shelukhina\*,  
 R. H. Ziganshin\*, V. G. Starkov\*, T. V. Andreeva\*, V. I. Tsetlin\*, and Yu. N. Utkin\*,#

# Phone: +7 (495) 336-65-22; e-mail: [utkin@ibch.ru](mailto:utkin@ibch.ru); [yutkin@yandex.ru](mailto:yutkin@yandex.ru)

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

Previously, we found that the venom of the pit viper *Gloydus saxatilis* inhibited the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). Using liquid chromatography, a protein glosaxin was isolated from the venom that inhibited the binding of the  $\alpha$ -bungarotoxin to the nAChR of muscle type from *Torpedo californica*. The amino acid sequence of the isolated protein was analyzed by high resolution mass spectrometry. Subsequent bioinformatic analysis showed that it is homologous to the amino acid sequences of disintegrin-like proteins, consisting of non-catalytic domains of type PIII metalloproteinases from the venom of pit vipers of genus *Gloydus*. A study of the biological activity of the isolated protein showed that it inhibits the binding of  $\alpha$ -bungarotoxin to *Torpedo californica* nAChR with  $IC_{50} = 51 \mu\text{M}$ . The protein also inhibited acetylcholine-induced functional responses of the human neuronal nAChR of  $\alpha 3\beta 2$  subtype. This is the first evidence of the ability of proteins consisting of non-catalytic domains of snake venom type PIII metalloproteinase to inhibit the nAChR.

**Keywords:** pit viper, venom, nicotinic acetylcholine receptor, inhibitor, metalloproteinase PIII, domain



УДК 577.218

# ИЗОФОРМЫ ЦИТОСКЕЛЕТНОГО БЕЛКА ЗИКСИНА В РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ *Xenopus laevis*

© 2024 г. Э. Д. Иванова\*, Е. А. Паршина\*\*, А. Г. Зарайский\*\*, Н. Ю. Мартынова\*\*,#

\* Российский национальный исследовательский медицинский университет  
им. Н.И. Пирогова Минздрава России,

Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

\*\* ФГБУН “Институт биорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,  
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 10.09.2023 г.

После доработки 22.09.2023 г.

Принята к публикации 23.09.2023 г.

Зиксин – консервативный механочувствительный LIM-доменный белок, регулирующий сборку F-актиновых филаментов в клеточных контактах. В то же время при механических воздействиях на клетки он может перемещаться из фокальных адгезий к стресс-фибриллам и в ядро, где оказывает влияние на генную экспрессию. С использованием метода вестерн-блоттинга и антител к N-концевой и C-концевой областям зиксина мы обнаружили, что в клетках эмбриона шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* этот белок представлен двумя полноразмерными и двумя короткими изоформами. Определена внутриклеточная локализация этих изоформ и их количество в зависимости от стадии развития эмбрионов. Показано, что полноразмерные формы с различной электрофоретической подвижностью отличаются по локализации в клетке, а самая короткая изоформа, содержащая LIM-домены, стабильна в ходе развития, преимущественно находится в ядре и может участвовать в регуляции экспрессии генов. Впервые полученные данные об изоформах зиксина, их стабильности и распределении между ядром и цитоплазмой представляют большой интерес для изучения функций LIM-доменных белков-механотрансдукторов в процессах взаимного влияния морфогенеза и дифференцировки на ранних этапах развития позвоночных.

*Ключевые слова:* изоформы белка, развитие, внутриклеточная локализация, зиксин, модификации, протеолиз

DOI: 10.31857/S0132342324030077, EDN: NZUWKW

## ВВЕДЕНИЕ

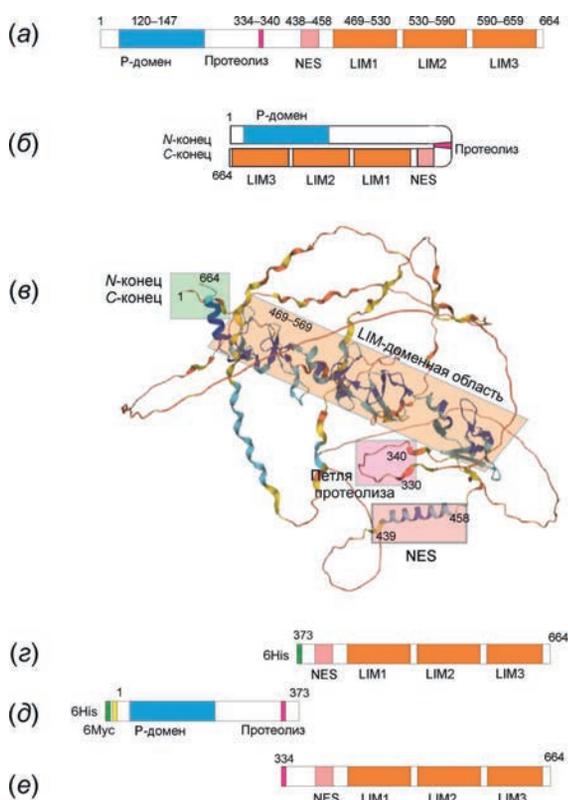
Изучение функционирования высококонсервативных механочувствительных белков, к которым относится зиксин, представляет большой интерес, потому что форма эмбрионов всех животных в период развития создается организованной работой морфогенетических процессов, таких как растяжение, изгибание или сворачивание эмбриональных клеточных пластов, и строго контролируемым переходом клеток к дифференцированному статусу. Консерватизм ранних этапов эмбриогенеза у позвоночных позволяет использовать животных, развитие

которых протекает во внешней среде (эмбрионы *Xenopus laevis*, рыбки *Danio rerio*), в качестве модельных организмов, поэтому исследования с использованием этих моделей имеют не только фундаментальную ценность, но и могут быть полезны в медицинских исследованиях.

Молекула белка зиксина *X. laevis* состоит из 664 а.о. и содержит три консервативных для всех позвоночных региона: пролин-богатую N-концевую область, лейцин-богатый сигнал экспорта из ядра (NES – nuclear export signal) и C-концевой фрагмент с тремя LIM-доменами (рис. 1a) [1].

Сокращения: LIM – от первых букв названий трех белков, у которых был впервые описан данный домен: LIN-11, Isl-1 и MEC-3; NES – сигнал ядерного транспорта (nuclear export signal).

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



**Рис. 1.** Схемы доменной и пространственной организации молекулы зиксина и делеционных конструкций, использованных в работе: (а) – схема доменной структуры полноразмерной молекулы зиксина, сверху обозначены номера аминокислотных остатков для всех представленных на рисунке доменов зиксина: Р-домен 120–147 а.о. (пролин-богатый домен), протеолиз 334–340 а.о. (сайт возможного протеолитического расщепления), NES 438–458 а.о. (сигнал экспорта из ядра) и LIM-доменная область 469–659 а.о.; (б) – схема “закрытой” конформации молекулы зиксина; (в) – пространственная трехмерная структура зиксина, полученная по данным базы PhosphoSitePlus® (<https://www.phosphosite.org>); (г) – схема С-концевого делеционного мутанта, использованного для получения антител к С-зиксину; (д) – схема N-концевого делеционного мутанта, использованного для получения антител к N-зиксину; (е) – схема укороченного по сайту протеолиза делеционного мутанта зиксина ( $\Delta$ зиксина).

N-конец зиксина необходим для взаимодействия с белками цитоскелета, прежде всего с белком, сшивающим актиновые филаменты  $\alpha$ -актинина [2, 3], модулятором сборки актина Epa/VASP [4], цитоскелетными белками LASP-1 и LASP-2 [2]. Пролин-богатые повторы в зиксине похожи на пролин-богатые последовательности в белке ActA внутриклеточной бактерии *Listeria monocytogenes* [5], патогенность которой обусловлена способностью собирать актиновые филаменты на поверхности клетки. Белок ActA

притягивает белки клеточных контактов Epa/VASP на место сборки актина [6]. Благодаря наличию пролин-богатых повторов зиксин, так же как и ActA, является посредником в соединении членов семейства Epa/VASP с актином и участвует в изменениях актинового цитоскелета в эукариотических клетках [7].

NES – лейцин-богатые области, которые участвуют в связывании зиксина с белком CRM1 для выхода из клеточного ядра в цитоплазму [5, 8].

С-концевой участок зиксина содержит три LIM-домена. LIM-домен – это Cys- и His-богатая последовательность длиной 60 а.о. Каждый LIM-домен имеет структуру двух цинковых пальцев. LIM-домены опосредуют специфические взаимодействия белок–белок и белок–ДНК [9]. В работе по участию LIM-доменных белков в механотрансдукции показано, что зиксин связывается своей LIM-доменной областью с F-актином в условиях напряжения и распределяется вдоль стресс-фибрилл [10]. Интересно, что свободная молекула зиксина в цитоплазме имеет “закрытую” конформацию “голова к хвосту”, которая должна быть фосфорилирована по Ser142 с помощью Act2-киназы [11, 12], ацетилована [13, 14] или пальмитилирована [15], чтобы позволить зиксину образовывать комплексы с другими белками (рис. 1б). LIM-домены “открытого” зиксина представляют собой платформу для сборки различных белковых комплексов, прежде всего, ансамбля регуляторов транскрипции [16].

Недавно была опубликована работа по изучению пептидного репертуара в экссудатах ран у млекопитающих [17]. Среди идентифицированных белковых последовательностей были обнаружены два укороченных фрагмента зиксина. Показано, что этот белок подвержен протеолизу по сайту серинпептидазы 1 HtrA с образованием легкой формы 254–572 а.о., которая способна перемещаться в ядро и принимает участие в активации ряда транскрипционных регуляторов, участвующих в повышении адапционных свойств в раневой поверхности. Имеются данные о том, что этот укороченный зиксин продуцируется при высокой плотности клеток и может регулировать количество связанных с раной белков во время заживления кожных ран [17]. Известно также, что синтезированный в условиях бесклеточного синтеза зиксин может быть субстратом для расщепления каспазами *in vitro* при инкубации в бесклеточном апоптотическом лизате S100 и *in vitro* в лизате клеточной линии HEK293 с активированной апоптотической активностью [18].

Примечательно, что на фоне довольно интенсивного изучения функций зиксина в культуре клеток работ, в которых бы исследовались аналогичные функции зиксина в эмбриогенезе, немного. Наиболее интересная работа посвящена изучению роли зиксина в стабилизации синаптических контактов во время развития синапсов в механосенсорных нейронах у круглого червя *Caenorhaditis elegans*. Зиксин из *C. elegans*, как и гомолог позвоночных, содержит *N*-концевую область, богатую пролином, и три тандемно расположенных *C*-концевых LIM-домена. В этой работе неожиданно было показано, что нейронная функция зиксина опосредуется короткой *C*-концевой изоформой, содержащей только LIM-домены, т.е. эта изоформа работает как полнофункциональный белок, способный к трансдукции механических реакций совершенно независимо от *N*-концевого домена [19].

Основной задачей данного исследования было выявление эндогенных изоформ зиксина из *X. laevis* и получение информации об изменениях в их количестве и внутриклеточной локализации, которые могут происходить с этими изоформами в ходе эмбрионального развития.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

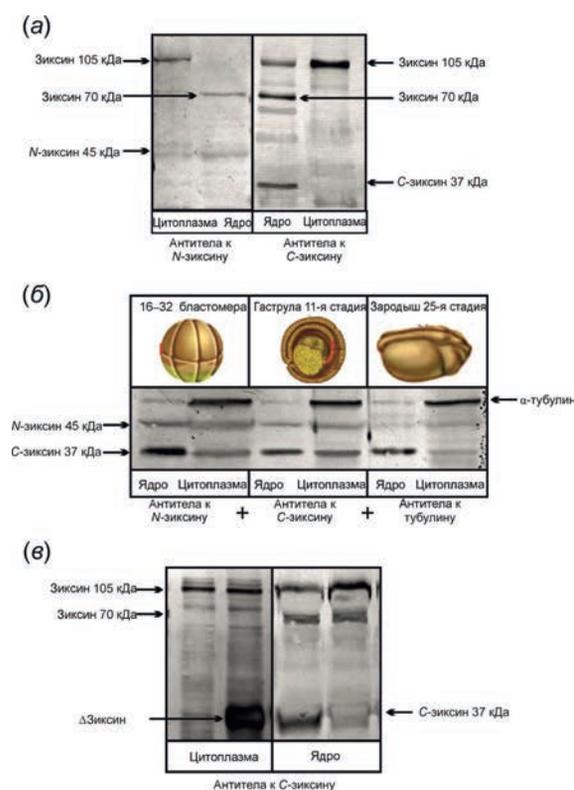
Основной инструмент для детекции эндогенных белков – специфические антитела. Для проведения исследования нами были использованы поликлональные антитела, специфичные к *C*-концевой области зиксина, содержащей последовательность ядерного экспорта NES и три LIM-домена (438–663 а.о.), полученные нами ранее [1] (рис. 1а). Эти антитела имеют недостаток – они детектируют только LIM-доменную область зиксина и, соответственно, не могут детектировать его *N*-концевые укороченные изоформы. Поэтому мы получили поликлональные антитела к *N*-концевой пролин-богатой области зиксина (1–373 а.о.), которая участвует во взаимодействии с актинином и другими цитоскелетными белками (рис. 1а, схема полноразмерного белка зиксина).

Таким образом, в нашем распоряжении были антитела, которые специфично детектировали *C*-концевой и *N*-концевой фрагменты зиксина.

Зародыши *X. laevis* получали по стандартной отработанной схеме [20]. Зародыши собирали на стадиях от начала дробления (32 бластомера), стадии гаструлы (11-я стадия) до стадии подвижного головастика (26-я стадия) по 20 эмбрионов на стадию и проводили разделение на ядерную и цитоплазматическую фракции для каждой стадии по методике, опубликованной ранее [21]. Из полученных ядерных и цитоплаз-

матических фракций готовили образцы для анализа методом вестерн-блоттинга после разделения в 10%-ном ПААГ по Лэммли. Изоформы зиксина детектировали с использованием поликлональных антител к *N*- и *C*-зиксину, в качестве вторичных антител использовали антикроличьи антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой.

В результате применения антител, специфичных к различным доменам белка зиксина, нам удалось детектировать его изоформы, укороченные с *N*- и *C*-концов, проследить их распределение между ядром и цитоплазмой, а также выявить изменения, происходящие с этими изоформами в ходе развития эмбриона. Прежде всего с использованием имеющихся антител были выявлены полноразмерные формы зиксина с молекулярной массой 105 и 70 кДа, которые детектировались антителами как к *N*-, так и к *C*-доменам (рис. 2а). Поскольку расчетная молекулярная



**Рис. 2.** Изоформы зиксина, их стабильность и распределение между ядром и цитоплазмой: (а) – изоформы зиксина, детектируемые антителами к *C*-зиксину и антителами к *N*-зиксину в ядерной и цитоплазматической фракциях клеток эмбрионов на 11-й стадии; (б) – изменения количества укороченных форм зиксина в ходе развития, детекция антителами к *C*-зиксину и антителами к *N*-зиксину, в качестве референсной полосы использовали  $\alpha$ -тубулин; (в) – электрофоретическая подвижность укороченного мутанта  $\Delta$ зиксина (334–664 а.о.) совпадает с эндогенной изоформой *C*-зиксина 37 кДа, детекция антителами к *C*-зиксину.

масса немодифицированного белка без пост-трансляционных модификаций составляет ~70 кДа, то полноразмерный зиксин с массой 105 кДа представляет собой модифицированную изоформу.

Наиболее изученная модификация зиксина млекопитающих – фосфорилирование по аминокислотному остатку Ser 142 [11, 12], кроме этого остатка в молекуле зиксина имеется еще 35 потенциальных участков фосфорилирования (по данным базы PhosphoSitePlus®, <https://www.phosphosite.org>). Поскольку известно, что фосфорилирование сильно замедляет электрофоретическую подвижность белков [22], наиболее вероятная модификация полноразмерной формы – именно фосфорилирование. Есть также работы, в которых показана возможность обратимых модификаций полноразмерного зиксина, таких как пальмитилирование и ацетилирование [13–15]. Возможно, сразу несколько модификаций приводит к замедлению электрофоретической подвижности полноразмерного зиксина.

В результате разделения лизатов из клеток зародышей на ядерную и цитоплазматическую фракции нам удалось показать, что у *X. laevis* модифицированная и немодифицированная формы полноразмерного зиксина имеют различия во внутриклеточной локализации: в цитоплазматической фракции преобладает форма 105 кДа, а в ядерной – 70 кДа (рис. 2а); в ходе развития уровень этих форм существенно не изменяется. При понижении уровня экспрессии зиксина за счет подавления трансляции его мРНК морфолиновыми олигонуклеотидами мы наблюдали уменьшение интенсивности обеих полос в вестерн-блот-анализе лизатов из зародышей на 13-й стадии с использованием антител к С-зиксину (данные не приведены).

При вестерн-блот-анализе лизатов из зародышей на ранних стадиях развития (начиная с 32-клеточного зародыша) мы заметили, что антитела к разным доменам зиксина детектируют более легкие полосы с разной электрофоретической подвижностью. Так, при использовании антител к С-зиксину детектируется полоса с подвижностью в области 37 кДа, а при использовании антител к N-зиксину – полоса в области 45 кДа (рис. 2б).

При этом следует отметить, что перекрестное окрашивание полностью отсутствует, антитела к разным доменам детектируют строго определенные полосы, т.е. можно сказать, что нам удалось “увидеть” две половины молекулы зиксина, которые, вероятнее всего, появились в результате протеолитического расщепления. Наиболее интенсивной полосой, соответствующей укороченному зиксину, была полоса 37 кДа,

которая детектировалась антителами к С-зиксину как в ядерной, так и в цитоплазматической фракции на ранних стадиях, но уже начиная со стадии гаструлы ее интенсивность в цитоплазме резко падала и в ходе дальнейшего развития исчезала, тогда как в ядре она оставалась хорошо детектируемой до стадии подвижного головастика (26-я стадия) (рис. 2б). Поскольку эта полоса окрашивается только антителами к С-зиксину, можно предположить, что это С-концевая, LIM-доменная часть молекулы зиксина, укороченная с N-конца (С-зиксин).

При использовании антител к N-зиксину для детекции в образцах из лизата зародышей на ранних стадиях (32 бластомера) мы наблюдали полосу 45 кДа в ядерной и цитоплазматической фракциях. Эта полоса имеет значительно меньшую интенсивность по сравнению с полосой 37 кДа; в ходе развития полоса сильно ослабевает и к 26-й стадии детектируется очень слабо, особенно в ядре (рис. 2б). При этом полосы 105 и 70 кДа не меняют своей интенсивности в зависимости от стадии. Полоса 45 кДа окрашивается только при использовании антител к N-зиксину и совсем не детектируется антителами к С-зиксину, поэтому можно предположить, что это укороченная с С-конца изоформа (N-зиксин). Во всех экспериментах нормирование количества нанесенного образца проводили по полосе тубулина с использованием моноклональных антител к тубулину (Sigma, США).

Таким образом, нам удалось детектировать две стабильные ядерные изоформы зиксина: полноразмерную немодифицированную (70 кДа) и LIM-доменную С-концевую укороченную изоформу (37 кДа). В небольшом количестве в ядре наблюдается и изоформа 105 кДа, которая слабо детектируется антителами к N-зиксину, что может быть связано с модификациями N-области этой изоформы. Изоформа 105 кДа – мажорная и самая стабильная в цитоплазматической фракции, детектируется двумя типами антител. Изоформа с электрофоретической подвижностью ~45 кДа, которая детектируется антителами к N-зиксину, показала низкую стабильность и хорошо заметна только до стадии гаструлы.

Полученные в работе данные о наличии укороченных форм зиксина в зародышах *X. laevis* коррелируют с данными работы Sabino et al. [17] об обнаружении укороченных С-концевых форм зиксина при исследовании пептидного репертуара в экссудатах ран млекопитающих. Указанный в этой работе сайт протеолитического расщепления серинпептидазой 1 HtrA совпадает с участком 332–338 а.о. для *X. laevis*, имеет высококонсервативную последовательность аминокислот

кислот APGF/GSF/G в районе 332–338 а.о. При анализе пространственной структуры зиксина из *X. laevis* видна структурная петля, которая находится в наружной части молекулы и доступна для протеолиза, а LIM-доменная область расположена в центре молекулы и имеет компактную третичную структуру из чередующихся спиралей и структур типа цинковые пальцы (рис. 1в).

Для того чтобы подтвердить, что протеолиз проходит именно по этому участку, мы создали делеционный мутант Дзиксин (334–664 а.о.) (рис. 1е) и показали, что его электрофоретическая подвижность полностью совпадает с подвижностью эндогенного фрагмента 37 кДа, но экзогенный фрагмент локализуется преимущественно в цитоплазме (рис. 2в), тогда как по результатам многих экспериментов большая часть эндогенного зиксина 37 кДа детектируется в ядерной фракции.

Кроме этого, с использованием специфических антител мы показали, что N-концевой фрагмент зиксина также присутствует в ядре. Это интересный и новый результат, поскольку известно, что N-концевая область взаимодействует с белками цитоскелета – последовательность 16–36 а.о. является сайтом для связывания  $\alpha$ -актина. Поэтому можно было бы предложить гипотезу, что биологическая функция протеолиза молекулы зиксина заключается в диссоциации его LIM-домени от области, связанной с белками цитоскелета, и ее транслокации в ядро, где появляется возможность для взаимодействия с регуляторными факторами транскрипции.

Но по результатам наших исследований N-концевой фрагмент зиксина с массой 45 кДа присутствует в ядре на ранних стадиях развития. Данных о функции N-концевого фрагмента в ядре пока нет в мировой литературе. Считается, что эта область отвечает за взаимодействие с белками цитоскелета, поэтому феномен появления N-концевого фрагмента в ядре на стадиях начала дробления заслуживает дальнейшего изучения.

Не менее интересным и важным для дальнейших исследований представляется обнаружение эндогенного C-концевого, содержащего LIM-домен фрагмента зиксина с массой 37 кДа и его ядерной локализации. Ранее с использованием модели эмбрионов *X. laevis* мы показали, что в эмбриогенезе именно за счет своей LIM-домени области зиксин выполняет важные для развития функции: 1) модулирует активность регулятора передних отделов мозга, транскрипционного фактора *Xanf1* [23, 24]; 2) регулирует активность сигнальных путей SHH (sonic hedgehog) [25]; 3) оказывает влияние на стабильность мРНК маркеров плюрипотентности семей-

ства *Pou 5F3*, гомологов известного фактора стволовых клеток *Ost 4* и рецептора ретиноидов *Rxrg* [26, 27]. Во всех работах с использованием методов двугибридной дрожжевой системы и коиммунопреципитации мы доказали, что транскрипционные факторы, такие как *Xanf1*, *Gli1*, *Zic1* и *Ybx1*, взаимодействуют именно с LIM-домениной областью, причем для всех приведенных белков было показано, что взаимодействие с полноразмерным зиксином значительно слабее, чем взаимодействие с его LIM-домениным фрагментом. Для коиммунопреципитации мы использовали экзогенный C-концевой фрагмент, несущий пептидные метки для возможности соосаждения белковых комплексов с применением смол с иммобилизованными коммерческими антителами. Экспрессия меченых пептидами белков в клетках эмбрионов достигается за счет микроинъекций синтетических мРНК в зародыши на стадии первого деления, и количество таких экзогенных белков превышает уровень эндогенных. Поэтому ослабление связывания исследуемых факторов с эндогенным полноразмерным зиксином не вызывало у нас сомнений. Идентификация укороченного эндогенного C-концевого фрагмента, содержащего LIM-домены, ставит вопрос о том, какая (полноразмерная или укороченная) изоформа зиксина участвует во взаимодействии с найденными ранее партнерами – транскрипционными факторами, и может ли укороченная изоформа модулировать активность соответствующих сигнальных каскадов.

Поскольку в настоящей работе мы получили уникальные данные о внутриклеточном распределении модифицированной и немодифицированной полноразмерной форм зиксина, а также об укороченных изоформах зиксина *X. laevis*, необходимо дальнейшее изучение возникновения и возможного влияния этих изоформ на генную экспрессию в процессе эмбриогенеза.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Получение моноспецифичных антител к N- и C-фрагментам зиксина.** Антитела к C-концевому фрагменту зиксина были получены нами ранее по методике, представленной в работе Martynova et al. [1].

Антисыворотка против N-концевого фрагмента зиксина (UniProt: A5H447) наработана в результате иммунизации кролика укороченным белком, содержащим 1–373 а.о. Соответствующую вставку кДНК клонировали в вектор pQE80 (Qiagen, США) и экспрессировали гибридный белок, несущий шесть остатков His и Мус-пептид

на *N*-конце, в *Escherichia coli* DH-5 $\alpha$ . Для иммунизации экспрессированный в бактериальной системе белок очищали с помощью Ni-NTA-хроматографии и детектировали количество и степень очистки при помощи иммуноблоттинга с антителами к 6His и Мус-пептиду, конъюгированными с щелочной фосфатазой.

Иммунизацию кролика (здоровая самка, 1 год, вес 1.8 кг, Питомник лабораторных животных – Филиал “Столбовая”, Россия) проводили по методике Martynova et al. [1] с использованием полного и неполного адъюванта Фрейнда (Sigma, США).

Для получения моноспецифических антител была создана аффинная колонка на основе BrCN-сефарозы (Sigma, США) с иммобилизованным гибридным с GST (глутатион-S-трансфераза, глутатион-связывающий белок) *N*-фрагментом зиксина.

Для приготовления такой аффинной колонки последовательность, кодирующую *N*-домен зиксина (1–373 а.о.), клонировали в вектор pGEX-4T-1 (Pharmacia, Швеция). Экспрессию белка GST-*N*-зиксина осуществляли в *E. coli* BL21. Выделение гибридного с GST белка из бактериального лизата проводили при помощи аффинной хроматографии на глутатион-агарозе, очищенный белок использовали для ковалентного сшивания с BrCN-сефарозой (Sigma, США). Очистку моноспецифических антител на аффинной колонке проводили по стандартной методике Martynova et al. [1].

**Получение зародышей, разделение лизата на ядерную и цитоплазматическую фракции и подготовка образцов для вестерн-блот-анализа.** Зародышей *X. laevis* получали в результате оплодотворения *in vitro* по методике, разработанной ранее [1]. Зародышей инкубировали в растворе 0.1 MMR (модифицированный раствор Рингера для культивирования зародышей амфибий (0.1 MMR): 0.1 M NaCl, 2.0 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 2 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 5 mM HEPES, pH 7.4) до стадии 32 бластомера, стадии гаструлы (12 стадия), стадии подвижного головастика (26-я стадия). На каждой стадии отбирали по 20 зародышей, половину зародышей использовали для приготовления лизата в буфере для коиммунопреципитации (1× буфер (pH 7.2–7.4): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% Triton-X100). Зародыши гомогенизировали пипетированием, полученный грубый лизат центрифугировали 30 мин при 15 000 g, отбирали супернатант и готовили образцы для электрофореза по стандартной методике. Другую половину зародышей исполь-

зовали для разделения лизата на ядерную и цитоплазматическую фракции по ранее опубликованной методике [21] с небольшой модификацией – ядра после очистки в 0.8 M сахарозе растворяли в буфере для коиммунопреципитации и центрифугировали 30 мин при 16 000 g и 4°C. Супернатант использовали для приготовления образцов для электрофореза.

**SDS-PAGE.** Образцы анализировали с помощью SDS-PAGE в 10%-ных гелях по методу Лэммли и подвергали электроблоттингу на PVDF-мембране (Millipore Corp. Inc. Франция). В качестве первичных антител использовали моноспецифичные поликлональные антитела кролика к *C*- или *N*-зиксину и моноклональные антитела к  $\alpha$ -тубулину (Sigma, США) в качестве референсных антител. В качестве вторичных антител использовали козий антикроличий Fab-фрагмент антитела, конъюгированный с щелочной фосфатазой (Sigma, США), и антимиошинный Fab-фрагмент антитела, конъюгированный с щелочной фосфатазой (Sigma, США). Для детекции использовали стабилизированный субстрат для щелочной фосфатазы Western Blue (Promega, США). Результаты электрофореза и блоттинга оценивали визуально по окраске колометрического субстрата. Эксперименты по анализу изменений в экспрессии и локализации изоформ зиксина на проявленных специфическими антителами PVDF-мембранах проводили в более чем трехкратной повторности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе мы обнаружили, что зиксин из *X. laevis* имеет несколько изоформ: помимо полноразмерного модифицированного белка с молекулярной массой ~105 кДа мы детектировали немодифицированную форму зиксина с приблизительной молекулярной массой 70 кДа и две укороченные формы 45 и 37 кДа. Мы установили, что количество и внутриклеточное распределение коротких форм зависит от стадии развития эмбриона. Показано, что на начальных стадиях развития количество укороченных ядерных форм 45 и 37 кДа увеличено, но в процессе гаструляции и нейруляции, когда начинается движение клеточных слоев и возникают поля механических напряжений, преобладает цитоплазматическая форма зиксина 105 кДа и ядерные формы 70 и 37 кДа. В результате проведенной работы впервые получен важный блок данных об изменении уровня и локализации изоформ механочувствительного белка зиксина в эмбриональном развитии, что может быть связующим звеном в передаче генному аппарату механических напряжений, которые

возникают в эктодерме и мезодерме эмбриона в ходе формирования его осевых структур.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00227 (<https://rscf.ru/project/23-25-00227/>).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Эксперименты на животных одобрены комиссией Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по контролю и использованию лабораторных животных (протокол-заявка, рег. № 249).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Martynova N.Y., Eroshkin F.M., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Korotaeva A.L., Smurova K.M., Gyoeva F.K., Zاراisky A.G.* // *Dev. Dyn.* 2008. V. 237. P. 736–749.  
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21471>
2. *Li B., Zhuang L., Trueb B.* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 20401–20410.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M310304200>
3. *Reinhard M., Zumburn J., Jaquemar D., Kuhn M., Walter U., Trueb B.* // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 13410–13418.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13410>
4. *Steele A.N., Sumida G.M., Yamada S.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. V. 422. P. 653–657.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.046>
5. *Beckerle M.C.* // *Bioessays.* 1997. V. 19. P. 949–957.  
<https://doi.org/10.1002/bies.950191104>
6. *Fradelizi J., Noireaux V., Plastino J., Menichi B., Louvard D., Sykes C., Golsteyn R.M., Friederich E.* // *Nat. Cell Biol.* 2001. V. 3. P. 699–707.  
<https://doi.org/10.1038/35087009>
7. *Oldenburg J., van der Krogt G., Twiss F., Bongaarts A., Habani Y., Slotman J.A., Houtsmuller A., Huveneers S., de Rooij J.* // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 17225.  
<https://doi.org/10.1038/srep17225>
8. *Dong X., Biswas A., Süel K.E., Jackson L.K., Martinez R., Gu H., Chook Y.M.* // *Nature.* 2009. V. 458. P. 1136–1141.  
<https://doi.org/10.1038/nature07975>
9. *Kadmas J.L., Beckerle M.C.* // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004. V. 5. P. 920–931.  
<https://doi.org/10.1038/nrm1499>
10. *Sun X.M., Bowman A., Priestman M., Bertaux F., Martinez-Segura A., Tang W., Whilding C., Dormann D., Shahrezaei V., Marguerat S.* // *Curr. Biol.* 2020. V. 30. P. 1217–1230.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.01.053>
11. *Moody J.D., Grange J., Ascione M.P., Boothe D., Bushnell E., Hansen M.D.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 378. P. 625–628.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.100>
12. *Call G.S., Chung J.Y., Davis J.A., Price B.D., Primavera T.S., Thomson N.C., Wagner M.V., Hansen M.D.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 404. P. 780–784.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.058>
13. *Fujita Y., Yamaguchi A., Hata K., Endo M., Yamaguchi N., Yamashita T.* // *BMC Cell Biol.* 2009. V. 10. P. 6.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-6>
14. *Zhao Y., Yue S., Zhou X., Guo J., Ma S., Chen Q.* // *J. Biol. Chem.* 2022. V. 298. P. 101776.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101776>
15. *Oku S., Takahashi N., Fukata Y., Fukata M.* // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 19816–19829.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.431676>
16. *Wang Y.X., Wang D.Y., Guo Y.C., Guo J.* // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2019. V. 23. P. 413–425.  
[https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201901\\_16790](https://doi.org/10.26355/eurrev_201901_16790)
17. *Sabino F., Madzharova E., Auf dem Keller U.* // *Cell Death Dis.* 2020. V. 11. P. 674.  
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-02883-2>
18. *Chan C.B., Liu X., Tang X., Fu H., Ye K.* // *Cell Death Different.* 2007. V. 14. P. 1688–1699.  
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402179>
19. *Lecroisey C., Brouilly N., Qadota H., Mariol M.C., Rochette N.C., Martin E., Benian G.M., Ségalat L., Mounier N., Gieseler K.* // *Mol. Biol. Cell.* 2013. V. 24. P. 1232–1249.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.e12-09-0679>
20. *Martynova N.Y., Parshina E.A., Ermolina L.V., Zاراisky A.G.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. V. 504. P. 251–256.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.164>
21. *Martynova N.Y., Parshina E.A., Zاراisky A.G.* // *STAR Protoc.* 2021. V. 2. P. 100449.  
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100449>
22. *Lee C.R., Park Y.H., Min H., Kim Y.R., Seok Y.J.* // *J. Microbiol.* 2019. V. 57. P. 93–100.  
<https://doi.org/10.1007/s12275-019-9021-y>

23. Martynova N.Y., Parshina E.A., Zاراisky A.G. // FEBS J. 2023. V. 290. P. 66–72. <https://doi.org/10.1111/febs.16308>
24. Martynova N.Y., Ermolina L.V., Eroshkin F.M., Gioeva F.K., Zاراisky A.G. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2008. V. 34. P. 513–516.
25. Martynova N.Y., Parshina E.A., Eroshkin F.M., Zاراisky A.G. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 530–536. <https://doi.org/10.31857/S013234232004020X>
26. Parshina E.A., Eroshkin F.M., Orlov E.E., Gyoeva F.K., Shokhina A.G., Staroverov D.B., Belousov V.V., Zhigalova N.A., Prokhortchouk E.B., Zاراisky A.G., Martynova N.Y. // Cell Rep. 2020. V. 33. P. 108396. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108396>
27. Parshina E.A., Orlov E.E., Zاراisky A.G., Martynova N.Y. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 5627. <https://doi.org/10.3390/ijms23105627>

## Isoforms of the Cytoskeletal LIM-Domain Protein Zyxin in the Early Embryogenesis of *Xenopus laevis*

E. D. Ivanova\*, E. A. Parshina\*\*, A. G. Zاراisky\*\*, and N. Y. Martynova\*\*,#

# Phone: +7 (916) 181-16-32; e-mail: martnat61@gmail.com

\* Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

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

Zyxin is a conserved mechanosensitive LIM-domain protein that regulates the assembly of F-actin filaments at cell junctions. At the same time, under mechanical stress, it can move from focal adhesions to stress fibrils and into the nucleus and affect gene expression. In *Xenopus laevis* embryonic cells, western blots with antibodies against Zyxin's N-terminal and C-terminal LIM-domain regions revealed two full-length and two short isoforms. The intracellular localization of these isoforms and the number depending on the stage of embryo development were determined. According to our study, full forms with different electrophoretic mobility are localized differently in the cell, and the shortest isoform containing LIM-domains is stable during development, mainly located in the nucleus, and participates in gene expression regulation. This study may be of great value to understanding how the LIM-domain mechanotransducer proteins jointly influence morphogenesis and differentiation in vertebrates at early stages of development.

**Keywords:** *embryogenesis, protein isoforms, development, intracellular localization, Zyxin, modifications, proteolysis*



УДК 577.112.343

# ЗАЩИТНАЯ ГРУППА $\alpha$ -КАРБОКСИЛА АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ВИДЕ ПРОИЗВОДНЫХ (5-ОКСООКСАЗОЛИДИН-4-ИЛ)УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ ТРЕБУЕТ ОСОБОГО ВНИМАНИЯ ПРИ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИИ

© 2024 г. В. Н. Азев<sup>\*,#</sup>, А. Н. Чулин<sup>\*</sup>, М. В. Молчанов<sup>\*\*</sup>, А. И. Мирошников<sup>\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup> Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 142290, Пуцино, просп. Науки, 6

<sup>\*\*</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Россия, 142290, Пуцино, ул. Институтская, 3

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

Поступила в редакцию 28.11.2023 г.

После доработки 10.12.2023 г.

Принята к публикации 11.12.2023 г.

При взаимодействии пентафторфенилового эфира (*S*)-2-(3-((бензилокси)карбонил)-5-оксооксазолидин-4-ил)уксусной кислоты с эфирами  $\alpha$ -аминокислот могут образовываться как ожидаемые продукты реакции, так и их изомеры – продукты раскрытия метиленового мостика в 5-оксо-4-оксазолидине за счет внутримолекулярной циклизации. Селективность реакции непредсказуема, хотя ожидаемые дипептиды иногда могут быть выделены из реакций третичных бутиловых эфиров. Характеризация продуктов реакции может потребовать проведения ЯМР-исследования при повышенной температуре.

*Ключевые слова:* аминосукцинимид,  $\beta$ -разветвленный дипептид аспарагиновой кислоты, *N*-оксиметил-аминосукцинимид

DOI: 10.31857/S0132342324030084, EDN: NZIGZT

## ВВЕДЕНИЕ

В результате реакции *N* $\alpha$ -Cbz-аспарагиновой кислоты с формальдегидом с высоким выходом образуется (*S*)-2-(3-((бензилокси)карбонил)-5-оксооксазолидин-4-ил)уксусная кислота [1, 2]. В этом производном  $\alpha$ -карбоксильная группа заблокирована от взаимодействия с различными электрофильными реагентами, а вторая остается свободной, ее можно превратить в активированные эфиры или смешанные ангидриды с целью синтеза  $\beta$ -разветвленных производных аспарагиновой кислоты [1, 3, 4].

Ранее мы описали, что при взаимодействии пентафторфенилового эфира (*S*)-2-(3-((бензилокси)карбонил)-5-оксооксазолидин-4-ил)уксусной кислоты (**I**) с диметиласпартатом (**II**) образуется соединение, которому на основании анализа спектральных данных было приписано строение в виде

дипептида (**III**), представляющего собой смесь *E*- и *Z*-ротамеров (см. далее), что осложняло интерпретацию спектров. В условиях реакции щелочного гидролиза этот полупродукт был превращен в целевую трикислоту (**IV**) и, вероятно, ее изомер (**V**) (схема 1) [5]. Мы предположили, что изомеризация протекает в условиях щелочного гидролиза через промежуточное образование продукта внутримолекулярной циклизации – аминосукцинимиды (**VI**), который в условиях реакции гидролиза подвержен раскрытию гидроксид-анионом по любой из двух карбонильных групп. Такая циклизация с последующим раскрытием – фундаментальное химическое свойство производных аспарагина [6]. Эта побочная реакция описана на многих примерах, и степень ее протекания зависит от конкретной пептидной последовательности.

В то же время в литературе описан прецедент, когда из продуктов взаимодействия оксибензо-

Сокращения: АРСИ – химическая ионизация при атмосферном давлении; Cbz – бензилоксикарбонильная группа; Нер – гептан.  
<sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (4967) 73-54-42; эл. почта: viatcheslav.azev@bibch.ru).

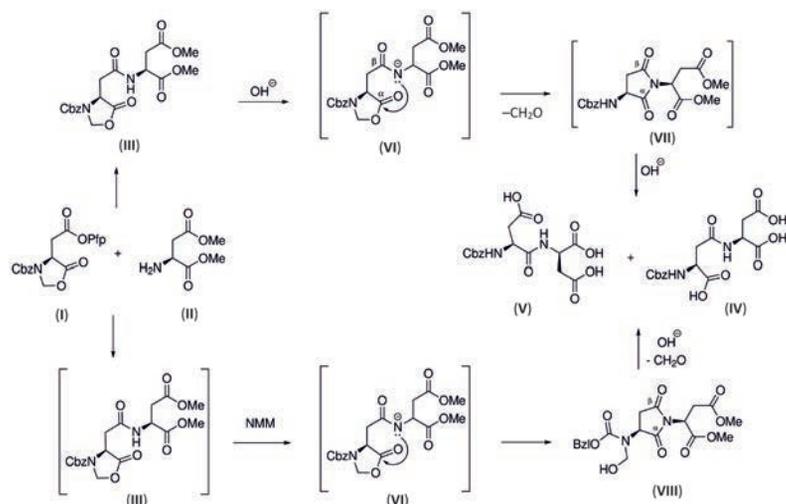


Схема 1. Образование смеси изомерных продуктов в двухстадийном синтезе соединения (IV).

триазилового эфира (*S*)-2-(3-((бензилокси)карбонил)-5-оксооксазолидин-4-ил)уксусной кислоты с этиловым эфиром фенилаланина было выделено производное *N*-оксиметиламинсукцинимид (также представляющего собой смесь *E*- и *Z*-ротамеров) [4]. Таким образом, существовала вероятность того, что в результате реакции соединений (I) с (II) нами был выделен аналогичный *N*-оксиметиламинсукцинимид (VIII), а соединение (III) было интермедиатом на пути к нему. Гидролиз соединения (VIII) также приводит к получению смеси изомеров (IV) и (V). Ввиду этого обстоятельства целью данной работы было более детальное исследование селективности реакции соединения (I) с диметиласпаратом (II) и другими эфирами аминокислот и строения продуктов этих реакций.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

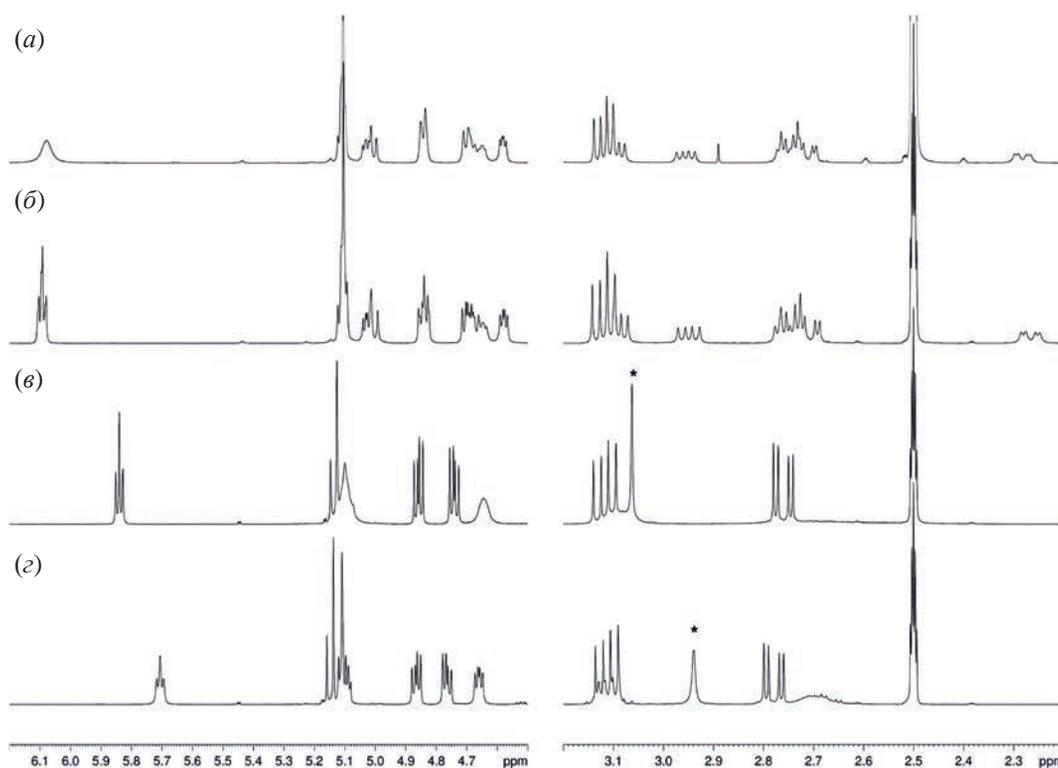
Необычный сигнал в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре продукта взаимодействия соединений (I) и (II) – уширенный синглет амидного (или гидроксильного) протона (рис. 1а): часто амидные протоны наблюдаются в области ~8 м.д., в то время как в спектре исследуемого продукта он более сильнополюсный (~6 м.д). Однако такой химический сдвиг мог быть вызван магнитной анизотропией бензольного кольца Cbz-группы. Определение мультиплетности этого сигнала стало возможным при использовании тщательного высушенного  $\text{DMSO}-d_6$  (рис. 1б), однако при 298 К мы не могли однозначно отнести этот сигнал либо к перекрывающимся дублетам смеси *E*- и *Z*-изомеров соединения (III), либо к триплетам гидроксигруппы в соединении (VIII).

Как и многие *N*-ацилированные гетероциклические соединения [7], производные (*S*)-2-(3-((бензилокси)карбонил)-5-оксооксазолидин-4-

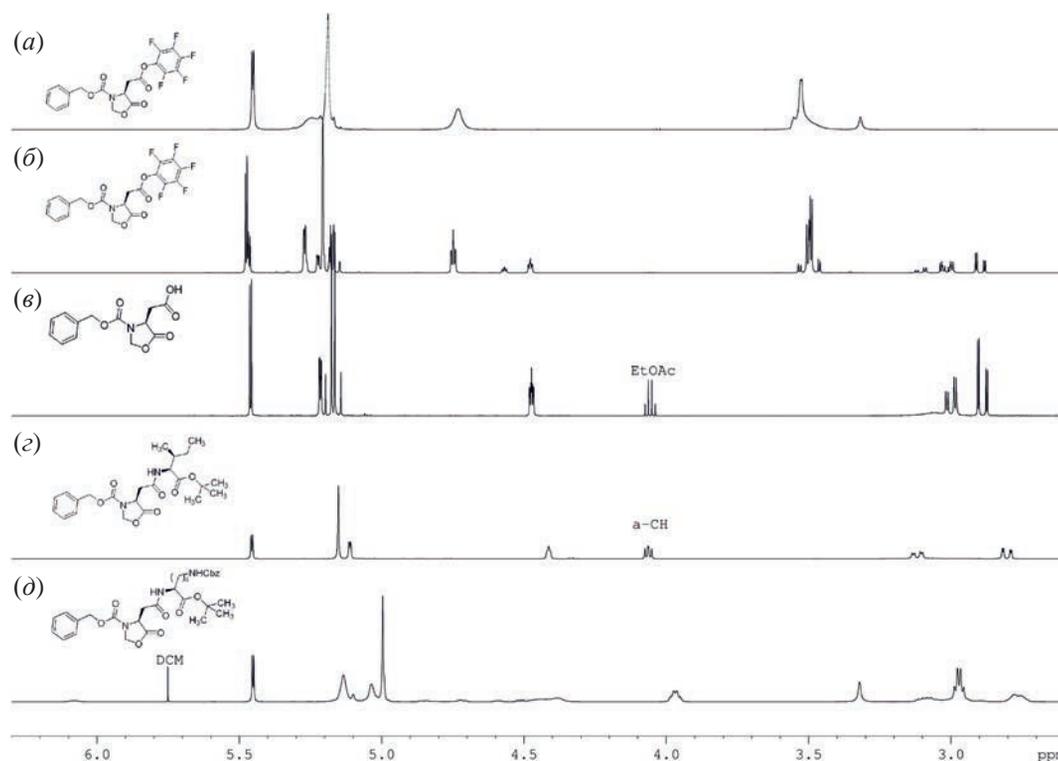
ил)уксусной кислоты присутствуют в растворе в виде смеси *E*- и *Z*-изомеров, что усложняет интерпретацию ЯМР-спектров. Однозначная интерпретация таких спектральных данных требует проведения регистрации спектров при повышенной температуре, когда ускоряется взаимное превращение *E*- и *Z*-изомеров друг в друга. Насколько нам известно, такие ЯМР-эксперименты в отношении к обсуждаемым объектам были описаны в литературе лишь однажды [4].

При нагреве до 353 К сигнал ~6 м.д. уже однозначно стал проявляться как триплет (рис. 1в), а в COSY-спектре наблюдали его корреляции с AM-системой протонов при 4.76 и 4.87 м.д. Интересно отметить, что при этой температуре сигналы  $\alpha$ -протонов и некоторые сигналы  $\beta$ -протонов остатков аспарагиновой кислоты еще сильно уширены, и при нагреве до 383 К (рис. 1з) лишь некоторые из них однозначно проявляют свою мультиплетность. Также следует подчеркнуть, что спектры образца до и после нагрева были идентичными (данные не приведены). Таким образом, из продуктов взаимодействия соединений (I) и (II) в присутствии слабого амина (NMM использовали для раскисления соли (II)) нами было выделено производное *N*-оксиметиламинсукцинимид (VIII), но не  $\beta$ -разветвленного пептида (III).

Отдельно было продемонстрировано, что раскрытие метиленового мостика не протекает на стадии образования активированного эфира (I) из соответствующей кислоты. При температуре 298 К соединение (I) также существует в виде смеси *E*- и *Z*-изомеров (рис. 2а). При температуре 353 К в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре эфира (I) отсутствуют сигналы группы  $\text{CH}_2\text{OH}$ , а диастереотопные метиленовые протоны взаимодействуют между



**Рис. 1.** Сравнение двух областей спектров продукта реакции соединений (I) и (II): (a) – при 298 К в обычном DMSO- $d_6$ ; (б) – при 298 К в осушенном DMSO- $d_6$ ; (в) – при 353 К; (г) – при 383 К. Звездочкой отмечен сигнал остаточной воды.



**Рис. 2.** Сравнение областей 6.2–2.6 м.д.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектра продуктов, содержащих оксазолидиновые циклы: (a) – соединение (I) при 298 К; (б) – соединение (I) при 353 К; (в) – исходная кислота для синтеза соединения (I) при 353 К; (г) – продукт (IX) при 353 К; (д) – продукт (X) при 298 К.

собой с КССВ 3.68 Гц (рис. 2б). Следует отметить, что в ходе нагрева происходит частичный гидролиз соединения (I) остаточной водой из дейтерорастворителя: в спектре (рис. 2б) наблюдаются мультиплеты 4.4, 2.95 и 2.85 м.д., характерные для исходной кислоты (рис. 2в) и, кроме того, в результате реакции с соединением (I) сигнал протонов самой воды исчезает. Также при нагреве наблюдается образование иного побочного продукта (мультиплеты 4.55, 3.1 и ~3.0 м.д.); возможно, он образуется в результате реакции соединения (I) и DMSO-*d*<sub>6</sub>: известно, что сульфоксиды вступают во взаимодействие с различными электрофилами [8].

На селективность образования соединения (VIII) не влияли ни природа основания (NMM, TEA, пиридин), ни природа растворителя (DCM, MeCN, THF). Ввиду того, что в литературе описаны успешные прецеденты синтеза β-разветвленных пептидов из активированных производных (S)-2-(3-((бензилокси)карбонил)-5-оксооксазолидин-4-ил)уксусной кислоты, соединение (I) вводили во взаимодействие с рядом эфиров аминокислот. В большинстве случаев наблюдали образование смесей продуктов и лишь при использовании стерически затрудненных третичных бутиловых эфиров наблюдали высокоселективное образование соединений с нераскрытым метиленовым мостиком. Так, на рис. 2г представлена область спектра продукта реакции (I) с третичным бутиловым эфиром изолейцина – дипептида (IX). В спектре отсутствуют сигналы АМХ-системы группы СН<sub>2</sub>ОН, а диастереотопные метиленовые протоны проявляются как дублет дублетов при 5.05 (*J* 0.76, 3.34 Гц) и дублет 5.45 м.д. (*J* 3.34 Гц). Кроме того, амидный протон был обнаружен в обычной области спектра (~8 м.д.) (на рис. 2 данные не приведены). Abell et al. описали <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр дипептида с метиленовым мостиком (зарегистрированный также при нагреве в DMSO-*d*<sub>6</sub>), в котором наблюдали аналогичные сигналы [4].

Дальнейшее изучение селективности взаимодействия соединения (I) с рядом третичных бутиловых эфиров аминокислот показало, что оксооксазолидин – не единственный продукт реакции. Так, например, в результате взаимодействия соединения (I) с производным лизина H-Lys(Cbz)-OtBu была получена смесь, в которой, судя по данным <sup>1</sup>H-ЯМР, присутствовали оба изомера в соотношении 9 : 1 в пользу оксооксазолидина (X). На рис. 2д представлена область спектра образца, содержащего оксооксазолидин (X). Последний может быть идентифицирован по дублету 5.45 м.д., а примесь *N*-оксиметиламинсукцинимиды по мультиплету гидроксигруппы – в районе 6.1 м.д. Попытки разделения этой смеси методами флэш-хроматографии либо методом препаративной ТСХ оказывались безуспешными ввиду лабильности исследуемых соединений на силикагеле. Вероятно,

поэтому Abell et al. применяли для указанных целей экзотический, но быстрый вариант радиальной хроматографии [4].

Проведение ЯМР-экспериментов при повышенной температуре требует значительных временных затрат на термическое уравнивание образца в датчике. Поэтому важно отметить, что в результате описанных выше ЯМР-исследований мы пришли к предварительному заключению, что уже при стандартной температуре регистрации (298 К) в <sup>1</sup>H-ЯМР-спектрах имеются сигналы, которые могут позволить отнести структуры изучаемого образца к тому или иному изомеру. В первую очередь это мультиплет протона гидроксигруппы в области 6.1 м.д. для *N*-оксиметиламинсукцинимиды либо дублет в районе 5.5 м.д. для его изомера, содержащего метиленовый мостик. В области спектра от 5.2 до 7 м.д. сигналы протонов аминокислот и их производных проявляются очень редко, в отличие от обсуждаемых. Эти признаки использовали для идентификации продуктов реакции соединения (I) с производным лизина H-Lys(Cbz)-OtBu (см. выше, рис. 2д). Возможно также привлечь к отнесению положение амидного протона, если он не перекрывается с другими сигналами. Описанное заключение невозможно сравнить с литературными данными ввиду различий в условиях регистрации ЯМР-спектров (в первую очередь, природы растворителя и температуры).

В отношении механизма протекания побочной реакции раскрытия цикла следует отметить, что, вероятно, помимо близкого расположения в пространстве нуклеофильного (амид) и электрофильного (сложный эфир) центров, которое приводит к кинетически выгодному образованию пятичленного цикла [6], дополнительным фактором является фундаментальное свойство оксооксазолидинового цикла быть как защитной группой, так и активированным эфиром (возможно, ввиду индуктивного эффекта *N*α-карбамоильной группы), что было экспериментально показано [1].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все растворители, гидрокарбонат натрия, карбонат калия, безводный сульфат магния, хлористоводородная кислота – коммерчески доступные продукты (Реахим и Химмед, Россия). При необходимости их подвергали очистке по описанным методикам [9]. Все стандартные производные аминокислот – продукция компаний Reanal (Венгрия) и IRIS Biotech GmbH (Германия). Спектры ЯМР регистрировали на приборе Avance III (BioSpin, Bruker, Германия) (<sup>1</sup>H при 600 МГц, <sup>13</sup>C при 125 МГц) и калибровали по сигналам остаточных протонов дейтерированного растворителя DMSO-*d*<sub>6</sub>. Химические сдвиги приведены в миллионных долях, а КССВ – в герцах. Масс-спектры

высокого разрешения регистрировали на приборе Orbitrap Elite Hybrid Ion Trap-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Германия). Аналитическую ТСХ проводили на пластинах F254 Silica gel G Plates (Part 1.05554.0001; Merck, Германия). Препаративную ТСХ проводили на стеклянных пластинах TLC Silica gel 60 F254 (Part 1057150001; Merck, Германия). Детекцию соединений на пластинах осуществляли с использованием: 1) раствора нингидрина (0.5 г нингидрина, 250 мл бутанола-1, 50 мл уксусной кислоты, 10 мл сим-коллиндына) с последующим нагревом; 2) паров иода; 3) УФ-облучения; 4) насыщенного раствора фосфорномолибденовой кислоты в этаноле (12 масс. %) с последующим нагревом.

**Пентафторфенил((4S)-3-бензилоксикарбонил-5-оксооксазолидин-4-ил)ацетат (I).** К раствору (4S)-3-бензилоксикарбонил-5-оксооксазолидин-4-уксусной кислоты (2.5 г, 9 ммоль) в 15 мл DCM последовательно добавляли пентафторфенилтрифторацетат (2 мл, 10 ммоль) и пиридин (1 мл, 12 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 4 ч и разбавляли DCM до объема 40 мл. Полученный раствор промывали 0.1 М водной HCl (20 мл), 5%-ным NaHCO<sub>3</sub> (20 мл) и водой (20 мл). Полученный раствор сушили над MgSO<sub>4</sub>, отфильтровывали, промывали осадок DCM (20 мл), объединенные органические фазы упаривали до небольшого объема и добавляли порциями гептан до помутнения. Полученную смесь выдерживали в течение ночи при 4°C, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали гептаном и сушили в вакууме над КОН и парафином. Выход соединения (I) составил 3.13 г (79%),  $R_f = 0.52$  (1 : 1 v/v EtOAc/Нер); т. пл. 120–122. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (353 К): 3.48 (дд,  $J$  3.80, 17.41, 1H, H $\beta$ Asp), 3.52 (дд,  $J$  5.17, 17.41, 1H, H $\beta$ Asp), 4.75 (дд,  $J$  1.09, 3.80, 5.23, 1H, H $\alpha$ Asp), 5.21 (уш.с., 2H, PhCH<sub>2</sub>), 5.11 (дд,  $J$  1.12, 3.68, 1H, NCH<sub>2</sub>O), 5.48 (д,  $J$  3.66, 1H, NCH<sub>2</sub>O), 7.31–7.41 (м, 5H, PhCH<sub>2</sub>). Спектр <sup>13</sup>C-ЯМР (333 К): 170.83, 166.09, 152.26, 140.22 (дм,  $J$  248.00), 138.96 (дм,  $J$  252.00), 137.26 (дм,  $J$  251.00), 135.67, 128.07, 127.74, 127.33, 123.83 (м), 77.86, 66.73, 51.17, 33.76. HRMS (+APCI)  $m/z$ : найдено  $M$  446.0666; вычислено для C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>F<sub>5</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup> [ $M + H$ ]<sup>+</sup> 446.0658.

**Общая методика осуществления взаимодействия соединения (I) с солями эфиров аминокислот.** Раствор соединения (I) (0.2 ммоль), гидрохлорида эфира аминокислоты (0.22 ммоль) и NMM (0.2 ммоль) в THF (1–1.5 мл) перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (10–15 мл), органическую фазу промывали 5%-ным NaHCO<sub>3</sub> (20 мл), 0.1 М водной HCl (2 × 10 мл) и водой. Полученный раствор сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, отфильтровывали, промывали осадок EtOAc (10 мл), объединенные органические фазы упари-

вали на ротационном испарителе и сушили в вакууме. Полученную смесь разделяли хроматографически с помощью препаративной ТСХ или колоночной хроматографией на силикагеле.

**(S)-Диметил 2-((S)-3-(бензилоксикарбонил-гидроксиметил)аминосукцинимидо)сукцинат (VIII).** Выход 50 мг, 60%.  $R_f = 0.46$  (2 : 1 v/v PhMe/АсОН). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (383 К): 2.7 (уш.с., 1H, H $\beta$ ), 2.78 (дд,  $J$  5.61, 17.92, 1H, H $\beta$ ), 3.07–3.15 (м, 2H, 2H $\beta$ ), 3.64 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.65 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.66 (дд,  $J$  5.53, 9.12, 1H, H $\alpha$ ), 5.49 (дд,  $J$  6.66, 10.35, 1H, CH<sub>2</sub>OH), 5.59 (дд,  $J$  6.56, 10.35, 1H, CH<sub>2</sub>OH), 5.08–5.13 (м, 2H, H $\alpha$ , PhCH<sub>2</sub>), 5.15 (д,  $J$  12.62, 1H, PhCH<sub>2</sub>), 5.71 (т,  $J$  6.74, 1H, OH), 7.29–7.39 (м, 5H, PhCH<sub>2</sub>). Спектр <sup>13</sup>C-ЯМР (383 К): 173.57, 172.64, 169.21, 167.47, 153.77, 135.81, 127.72, 127.28, 126.98, 71.17, 66.40, 54.17, 51.98, 50.97, 47.75, 34.18, 32.38. HRMS (+ESI)  $m/z$ : найдено  $M$  445.1201; вычислено для C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>9</sub><sup>+</sup> [ $M + Na$ ]<sup>+</sup> 445.1218.

**Третичный бутиловый эфир N $\alpha$ -((4S)-3-бензилоксикарбонил-5-оксооксазолидин-4-ил)-ацетил-изолейцина (IX).** По общей методике получали 115 мг смеси целевого продукта и пентафторфенола. Аликвоту (10.3 мг) смеси разделяли препаративной ТСХ (2 : 1 v/v PhMe/АсОН), получали 4.68 мг дипептида (экстраполированный выход 58%).  $R_f = 0.57$  (1 : 1 v/v EtOAc/Нер). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (353 К): 0.84–0.89 (м, 6H, CH<sub>3</sub> $\gamma$ lle, CH<sub>3</sub> $\delta$ lle), 1.16–1.24 (м, 1H, H $\gamma$ lle), 1.36–1.47 (м, 10H, OBU<sup>t</sup>, H $\gamma$ lle), 1.70–1.78 (м, 1H, H $\beta$ lle), 2.80 (дд,  $J$  2.90, 16.65, 1H, H $\beta$ Asp), 3.12 (дд,  $J$  4.49, 16.80, 1H, H $\beta$ Asp), 4.06 (дд,  $J$  6.27, 7.84, 1H, H $\alpha$ lle), 4.66 (уш.с., 1H, H $\alpha$ Asp), 5.11 (дд,  $J$  0.76, 3.34, 1H, NCH<sub>2</sub>O), 5.15 (уш.с., 2H, PhCH<sub>2</sub>), 5.46 (д,  $J$  3.43, 1H, NCH<sub>2</sub>O), 7.31–7.41 (м, 5H, PhCH<sub>2</sub>), 8.03 (д,  $J$  7.84, 1H, NH). Спектр <sup>13</sup>C-ЯМР (383 К): 171.83, 169.77, 168.46, 151.95, 135.76, 127.94, 127.47, 127.04, 80.07, 77.40, 66.30, 56.93, 51.27, 35.96, 34.70, 27.27, 24.64, 14.90, 10.63. HRMS (+ESI)  $m/z$ : найдено  $M$  471.2121; вычислено для C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub><sup>+</sup> [ $M + Na$ ]<sup>+</sup> 471.2102.

**Третичный бутиловый эфир N $\alpha$ -((4S)-3-бензилоксикарбонил-5-оксооксазолидин-4-ил)ацетил-N $\epsilon$ -карбонилбензилоксиллизина (X).** Выход образца с примесью ~10% изомера 80 мг, 67%.  $R_f = 0.21$  (1 : 1 v/v EtOAc/Нер). Для основного компонента спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (298 К, E- и Z-ротамеры наблюдаются при 298 К, как это известно для ацилированных гетероциклических соединений [7]): 1.23–1.31 (м, 2H, H $\gamma$ Lys), 1.32–1.41 (м, 11H, OBU<sup>t</sup>, H $\delta$ Lys), 1.49–1.57 (м, 1H, H $\beta$ Lys), 1.58–1.65 (м, 1H, H $\beta$ Lys), 2.72–2.83 (м, 1H, H $\beta$ Asp), 2.98 (дд,  $J$  6.45, 13.05, 1H, H $\epsilon$ Lys), 3.05–3.15 (м, 1H, H $\beta$ Asp), 3.97 (дд,  $J$  7.94, 13.70, 1H, H $\alpha$ Lys), 4.33–4.50 (м, 1H, H $\alpha$ Asp), 5.00 (с, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 5.04 (уш.с., 1H, NCH<sub>2</sub>O), 5.14 (уш.с., 2H, PhCH<sub>2</sub>), 5.46 (д,  $J$  3.27, 1H, NCH<sub>2</sub>O), 7.27 (т,  $J$  5.76, 1H, NH $\epsilon$ Lys), 7.28–7.42 (м, 10H, PhCH<sub>2</sub>), 8.39

(д,  $J$  7.11, 1H, NH $\alpha$ ). HRMS (+ESI)  $m/z$ : найдено  $M$  620.2598; вычислено для  $C_{31}H_{39}N_3NaO_9^+ [M+Na]^+$  620.2579.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на свою привлекательность в виде высокой селективности введения, защитная группа  $\alpha$ -карбоксила аспарагиновой кислоты в виде производных (5-оксооксазолидин-4-ил)уксусной кислоты имеет ряд ограничений в использовании, которые необходимо учитывать при планировании синтезов с ней с целью получения  $\beta$ -разветвленных пептидов. В первую очередь, необходим тщательный контроль продуктов реакции с использованием высокотемпературного ЯМР с использованием осушенных растворителей. Кроме того, в каждом конкретном случае невозможно предсказать количество образовавшегося изомера ( $N$ -окси-метиламиносукцинимид). Тем не менее значительная селективность может быть получена в реакциях третичных бутиловых эфиров, что согласуется с литературными данными.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.ф.-м.н. А.К. Сурину (Институт белка РАН) за помощь в регистрации масс-спектров высокого разрешения.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ FFEU-2024-0056).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Itoh M.I.* // Chem. Pharm. Bull. 1969. V. 17. P. 1679–1686.  
<https://doi.org/10.1248/cpb.17.1679s>
2. *Scholtz J.M., Bartlett P.A.* // Synthesis. 1989. P. 542–544.  
<https://doi.org/10.1055/s-1989-27311>
3. *Mehrotra A.P., Webster K.L., Gani D.* // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1997. P. 2495–2512.  
<https://doi.org/10.1039/A702407J>
4. *Abell A.D., Edwards R.A., Oldham M.D.* // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1997. P. 1655–1662.  
<https://doi.org/10.1039/A608165G>
5. *Azev V.N., Baidakova L.K., Chulin A.N., Tuzikov A.B., Kisilitsyn P.G., Molchanov M.V., Miroshnikov A.I.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2023. V. 49. P. 775–784.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162023040052>
6. *Subirós-Funosas R., El-Faham A., Albericio F.* // Tetrahedron. 2011. V. 45. P. 8595–8606.  
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.08.046>
7. *Benassi R., Folli U., Schenetti L., Taddei F.* // Adv. Het. Chem. 1987. V. 41. P. 75–186.  
[https://doi.org/10.1016/S0065-2725\(08\)60161-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2725(08)60161-0)
8. *Tillett J.G.* // Chem. Rev. 1976. V. 76. P. 747–772.  
<https://doi.org/10.1021/cr60304a004>
9. *Armarego W.L.F., Chai C.* // Purification of Laboratory Chemicals, 6th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2012.

## Derivatives of (5-Oxooxazolidin-4-yl)acetic Acids in Aspartic Acid $\alpha$ -Carboxyl Protection: a Word of Caution

V. N. Azev\*, #, A. N. Chulin\*, M. V. Molchanov\*\*, and A. I. Miroshnikov\*\*\*

# Phone: +7 (4967) 73-54-42; e-mail: [viatcheslav.azev@bibch.ru](mailto:viatcheslav.azev@bibch.ru)

\* Branch of Shemyakin–Ovchinnikov Bioorganic Chemistry Institute RAS, prosp. Nauki 6, Puschino, 142290 Russia

\*\* Institute for Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Institutskaya ul. 3, Puschino, 142290 Russia

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

Isomeric products could be isolated in a reaction of pentafluorophenyl ester of (*S*)-2-(3-((benzyloxy)-carbonyl)-5-oxooxazolidin-4-yl)acetic acid with amino acid esters. One product is an expected dipeptide, the isomeric one is an *N*-hydroxymethylamino succinimide – a product of methylene bridge cleavage. Steric bulkness of amino acid esters favors the formation of a peptide, however the reaction selectivity is quite unpredictable. Moreover, the precise structure assignment requires high-temperature NMR experiments.

**Keywords:** aminosuccinimide,  $\beta$ -branched aspartic acid dipeptide, *N*-oxymethylaminosuccinimide



УДК 577.34+579.258

## ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ ПРОТЕОРОДОПСИН *Exiguobacterium sibiricum*

© 2024 г. Л. Е. Петровская\*, \*\*, #, Е. А. Крюкова\*, \*\*\*, В. А. Большаков\*\*\*\*,  
Е. П. Лукашев\*\*\*\*, С. А. Силецкий\*\*\*\*, М. Д. Мамедов\*\*\*\*, Р. В. Судаков\*\*\*\*,  
Д. А. Долгих\*, \*\*\*, \*\*\*\*, М. П. Кирпичников\*, \*\*\*\*

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

\*\* Московский физико-технический институт, Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

\*\*\* Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4

\*\*\*\* Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/11

\*\*\*\*\* Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

Россия, 119992 Москва, Ленинские горы, 1/40

Поступила в редакцию 28.11.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

Сконструированы гены гибридных белков, включающих протеородопсин *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) и различные *N*-концевые растворимые домены. Эффективный синтез в клетках *Escherichia coli* наблюдался только в случае гибридов с шапероном Caf1M и мальтозосвязывающим белком MBP, экспрессируемых в виде предшественников с собственными сигнальными последовательностями. Изучение выделенного белка MBP-ESR в составе мицелл и протеолипосом продемонстрировало формирование и распад основных интермедиатов фотоцикла при pH > 8. Фотоэлектрический ответ гибридных белков Caf-ESR и MBP-ESR сопоставим по амплитуде с ответом ESR дикого типа, что указывает на их гомогенную ориентацию в мембране протеолипосом. Полученные конструкции могут быть использованы для создания систем бактериальной экспрессии различных ретинальных белков, обеспечивающих их единообразное встраивание в протеолипосомы.

*Ключевые слова:* протеородопсин, гибридный белок, экспрессия в *Escherichia coli*, фотоцикл, прямой электрометрический метод

DOI: 10.31857/S0132342324030099, EDN: NZАНХН

### ВВЕДЕНИЕ

Микробные родопсины – мембранные светочувствительные белки, содержащие хромофор ретиналя, который связан через основание Шиффа с остатком лизина [1–3]. В результате поглощения кванта света в их молекулах происходит ряд молекулярных событий, включающих изомеризацию ретиналя и его возвращение в исходное состояние, изменение степени протонирования основания Шиффа и ключевых аминокислотных остатков, трансмембранный перенос протонов или других

ионов в случае ион-транспортных родопсинов [4, 5]. Наиболее известный и хорошо изученный представитель семейства – бактериородопсин (BR), обнаруженный в пурпурных мембранах *Halobacterium salinarum* [6, 7]. Значительный вклад в исследование этого белка внесли Ю.А. Овчинников и его сотрудники [8, 9].

Родопсины выполняют в клетках микроорганизмов разнообразные функции, однако можно утверждать, что наиболее распространенная функция этих белков – энергетическая. В результате трансмембранного переноса протонов BR соз-

Сокращения: ESR – ретинальный белок *Exiguobacterium sibiricum*; BR – бактериородопсин; Caf1M – шаперон капсульного антигена F1; DDM – *n*-додецил- $\beta$ -D-мальтопиранозид; MBP – мальтозосвязывающий белок; PR – протеородопсин; wt ESR – ESR дикого типа.

# Автор для связи: (эл. почта: lpetr65@yahoo.com).

дает электрохимический градиент (протон-движущую силу), которая используется клетками для синтеза АТФ при участии АТФ-синтазы. Такой способ генерации энергии, основанный на протон-транспортной активности BR, позволяет галобактериям выживать при понижении концентрации кислорода в среде [10]. Позднее у различных морских зубактерий были открыты протеородопсины (PR), которые вносят значительный вклад в утилизацию солнечной энергии и адаптацию микроорганизмов к существованию в олиготрофных условиях [11, 12].

Исследование транспортной активности микробных родопсинов предполагает их встраивание в замкнутый липидный бислой, например, в составе протеолипосом. Эти сферические частицы размером от 100 нм до 1 мкм, образованные липидами различного состава, являются удобной моделью природных мембран и позволяют подобрать подходящие условия для правильного фолдинга и эффективного функционирования мембранных белков [13, 14]. Уже на ранних этапах изучения BR было успешно продемонстрировано его встраивание в протеолипосомы, содержащие АТФ-синтазу различного происхождения, которое сопровождалось светозависимым синтезом АТФ [15–17]. Впоследствии были получены искусственные органеллы большего размера, содержащие PR и использующие накопленную энергию для белкового синтеза или полимеризации актина [18, 19].

Для достижения максимальной эффективности подобных систем большинство молекул светочувствительного белка должно быть ориентировано в одном направлении [20, 21]. Ориентация белков в мембране определяется различными факторами, прежде всего конфигурацией молекулы, размером частиц и свойствами входящих в ее состав липидов [20, 22, 23]. Например, BR преимущественно встраивается С-концом наружу, вследствие чего транспорт протонов осуществляется внутрь протеолипосом [24]. Для PR характерна обратная ориентация, поэтому в ответ на вспышку света происходит закисление среды [25]. В ряде случаев отдельные молекулы белка встраиваются в искусственный бислой в противоположных направлениях, в результате чего снижается эффективность транспорта и усложняется интерпретация полученных данных [21, 26].

Известно несколько подходов, обеспечивающих получение протеолипосом с одинаковой ориентацией молекул ретинального белка. Одним из первых было предложено разделение BR-содержащих протеолипосом с помощью гель-фильтрации [27]. Использование для формирования липосом липидов, содержащих заряженные груп-

пировки, позволяет регулировать встраивание в бислой белков, которые имеют различный заряд на N- и С-концах, включая PR [28]. Более универсальным представляется способ, основанный на увеличении размера одного из концов молекулы, например, за счет присоединения частиц никельсодержащей смолы к гексагистидиновой последовательности рекомбинантных белков [29]. Такой довесок препятствует проникновению соответствующего конца белка во внутреннюю полость липосом, что способствует единообразному встраиванию в липидный бислой. Аналогичный механизм обеспечивает однородную ориентацию природных мембранных белков, содержащих крупные растворимые домены [30]. Получение гибридов PR с различными растворимыми белками-партнерами способствовало его направленному встраиванию в протеолипосомы [31].

Объект наших исследований – ESR – ретинальный белок *Exiguobacterium sibiricum*, относящийся к семейству протеородопсинов [32–34]. От других представителей семейства ESR отличается наличием остатка лизина в положении, соответствующем донору протонов для основания Шиффа [35, 36]. Для изучения его транспортной активности в составе протеолипосом нами было получено несколько вариантов гибридных белков, содержащих ESR и различные растворимые домены. Установлено, что N-концевой гибрид Caf-ESR обеспечивает эффективное встраивание молекул белка в бислой в одном направлении, в то время как С-концевые гибриды склонны к разнонаправленному встраиванию, что приводит к уменьшению наблюдаемого переноса зарядов [37]. Цель данной работы – конструирование и экспрессия генов различных N-концевых гибридов для повышения уровня синтеза ESR в *Escherichia coli* и направленного включения белка в протеолипосомы.

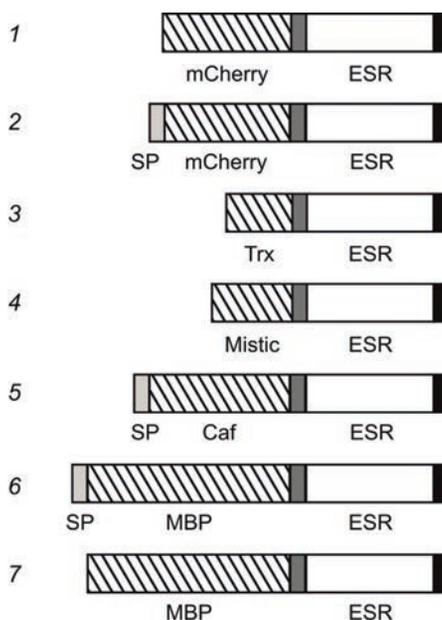
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Конструирование и экспрессия гибридных генов.** Для получения гибридных полипептидов, включающих ESR и N-концевые растворимые домены, мы провели клонирование генов нескольких белков-партнеров, ранее использованных для повышения уровня продукции и растворимости мембранных белков в клетках бактерий и бесклеточных системах экспрессии. Известно большое число работ, в которых с этой целью применяли тиоредоксин и мальтозосвязывающий белок (MBP) *E. coli*, а также белок Mystic *Bacillus subtilis* [38–41]. В частности, MBP обладает способностью не только существенно повышать выход рекомбинантных белков, но и облегчает их сворачивание [42, 43]. Описано успеш-

ное получение гибридных белков, включающих MBP и рецепторы, сопряженные с G-белком [44, 45], а также бактериородопсин [40]. В некоторых работах были использованы конструкции, кодирующие зрелый MBP [40, 46], в других – кодирующие белок-предшественник, содержащий природный сигнальный пептид [44, 45].

Флуоресцентный белок mCherry на N-конце гибридного белка обеспечивал направленное встраивание PR в протеолипосомы [31]. Ранее нами было показано, что гибридный белок, содержащий периплазматический шаперон *Yersinia pestis* Caf1M, эффективно экспрессируется в клетках бактерий и способствует единообразному встраиванию ESR в искусственный липидный бислой [37]. Таким образом, использованный нами набор включал пять белков-партнеров (рис. 1), причем три из них содержали сигнальные последовательности, обеспечивающие секрецию в периплазму. Соответствующие гены были объединены с последовательностью, кодирующей ESR, в составе единой рамки считывания. Для независимого фолдинга между доменами был размещен гибкий пептидный линкер, включающий 10 а.о. (GGGGSGGGGS). Схема клонирования обеспечивала добавление к C-концевой части гибридных белков гексагистидиновой последовательности для их очистки с помощью никель-аффинной хроматографии.

Экспрессию полученных гибридных генов проводили в одинаковых условиях, индукцию транскрипции осуществляли добавлением ИПТГ.



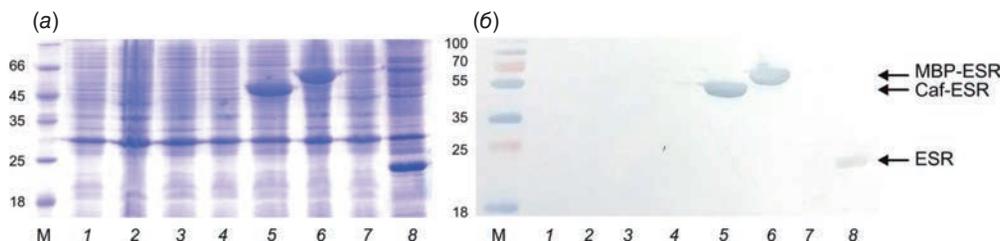
**Рис. 1.** Схемы строения гибридных белков. SP – сигнальная последовательность. Темно-серым цветом обозначен глицин-сериновый линкер, черным – гексагистидиновая последовательность.

В результате выделения и анализа мембранной фракции культур клеток, продуцирующих соответствующие полипептиды, был обнаружен эффективный синтез двух гибридных белков – Caf-ESR, который содержал Caf1M в качестве N-концевого домена, и MBP-ESR, экспрессируемых в виде предшественников с собственными сигнальными последовательностями (рис. 2, дорожки 5, 6).

Локализация в мембране, а также обнаружение единственной формы белков с помощью электрофореза и вестерн-блоттинга позволяют предположить, что в процессе секреции происходит отщепление сигнальных последовательностей у предшественников Caf-ESR и MBP-ESR, в результате чего их N-концевые растворимые домены располагаются в периплазматическом пространстве. Следует отметить, что экспрессия гибридного белка MBP-ESR, лишённого сигнальной последовательности, в данных условиях не была обнаружена. Также не удалось детектировать экспрессию N-концевых гибридов с mCherry (включая вариант с сигнальной последовательностью PelB), тиоредоксином и белком Mystic.

Ранее мы показали, что гибридные белки, содержащие mCherry или тиоредоксин на C-конце ESR, успешно экспрессируются в клетках бактерий [37]. Такое расположение растворимых белков-партнеров совместимо со свойственной ESR и другим микробным родопсинам ориентацией в мембране (N-конец в периплазматическом пространстве, C-конец в цитоплазме). Можно предположить, что N-концевые гибриды ESR с секретируемыми белками Caf1M и MBP ориентированы таким же образом. Расположение mCherry, зрелого MBP или тиоредоксина на N-конце ESR детерминирует противоположную ориентацию ретинального белка в клеточной мембране (N-конец в цитоплазме), что, вероятно, нарушает процесс его фолдинга. Известно, что накопление неправильно свернутых мембранных белков инициирует в клетках развитие стрессового ответа, который в числе прочих механизмов включает повышенный синтез протеолитических ферментов [47–49], что, вероятно, объясняет отсутствие экспрессии соответствующих гибридов.

**Свойства гибридного белка MBP-ESR в составе мицелл.** Характеристика гибридного белка Caf-ESR была проведена нами ранее [37]. Для оценки влияния N-концевого домена MBP-ESR на свойства входящего в его состав ретинального белка он был выделен из мембранной фракции клеток штамма-производителя в результате солюбилизации в *n*-додецил-β-D-мальтопиранозиде (DDM) и последующей никель-аффинной хроматографии. Необходимо отметить, что эффектив-



**Рис. 2.** Экспрессия гибридных белков, содержащих ESR, в клетках *E. coli*. Белковый электрофорез в 13%-ном SDS-ПААГ (а) и вестерн-блот-анализ (б) с анти-His-конъюгатом образцов мембранной фракции клеток *E. coli* C43(DE3), экспрессирующих гибридные белки (дорожки 1–7) и ESR дикого типа (дорожка 8). Номера дорожек 1–7 соответствуют нумерации конструкций на рис. 1. М – маркеры молекулярного веса белков (кДа).

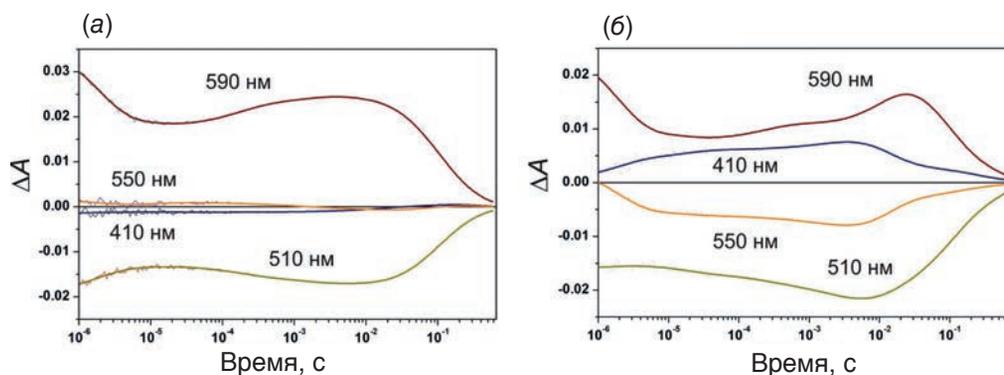
ность сольubilизации данного гибрида оказалась существенно выше, чем у Caf-ESR (~80% против 25%), что можно объяснить его более высокой растворимостью благодаря использованию MBP в качестве белка-партнера. Значения максимума поглощения для MBP-ESR составили 525 нм при pH 7 и 523 нм при pH 9, что соответствует небольшому “синему” сдвигу по сравнению с диким типом ESR (528 нм при pH 7).

Кинетику светоиндуцированных изменений поглощения MBP-ESR при четырех длинах волн измеряли при двух значениях pH, при этом, как и в случае дикого типа ESR [50], было обнаружено отсутствие интермедиата М (депротонированного основания Шиффа) при pH 7 (рис. 3а). Интермедиаты с максимумом поглощения 590 нм доминируют на протяжении всего фотоцикла. В течение первых 10 мкс после вспышки первый из них частично распадается с появлением других длинноволновых интермедиатов, распад которых с  $\tau \sim 84$  мс завершает фотоцикл (рис. 3а).

При pH 9 в результате распада интермедиатов К и L, сопровождающегося снижением поглощения при 550 и 590 нм, наблюдается рост поглощения при 410 нм (образование интермедиата М) с характерными временными константами  $\tau \sim 8$  и 220 мкс,

2.7 мс. Распад М включает два компонента (11.5 и 386 мс) и приводит к возникновению интермедиата N2/O в результате первой компоненты распада М. Распад интермедиата N2/O с  $\tau \sim 85$  и 386 мс завершает фотоцикл и возвращает белок в исходное состояние (рис. 3б). В целом константы указанных преобразований близки к константам, характерным для ESR дикого типа и гибрида Caf-ESR ([37], табл. 1), что указывает на сходные функциональные свойства белков. Небольшое замедление процессов, связанных с медленными стадиями образования и распада интермедиата М (увеличение характерных времен  $\tau_2$ ,  $\tau_6$ ) может быть обусловлено влиянием крупного растворимого белка-партнера.

**Свойства гибридного белка MBP-ESR в составе протеолипосом.** Для изучения ориентации гибридного белка MBP-ESR мы получили протеолипосомы на основе азолектина, содержащие данный гибрид, и исследовали их фотоэлектрический ответ и фотоцикл при различных значениях pH. Метод прямой электротометрии основывается на слиянии протеолипосом, содержащих транспортный белок, в данном случае ESR, с искусственной макроскопической мембраной (коллоидная пленка, пропитанная раствором фосфолипидов в *n*-декане). В результате переноса



**Рис. 3.** Фотоцикл MBP-ESR в мицеллах DDM при pH 7 (а) и pH 9 (б).

**Таблица 1.** Константы фотоцикла (мс) ESR дикого типа и гибридных белков MBP-ESR и Caf-ESR в мицеллах DDM при pH 9.0

Белок	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$\tau_4$	$\tau_5$	$\tau_6$
Wt ESR*	$0.0044 \pm 0.0002$	$0.130 \pm 0.008$	$2.24 \pm 0.13$	$12.10 \pm 0.38$	$82.6 \pm 3.6$	$310 \pm 14$
MBP-ESR	$0.0080 \pm 0.0006$	$0.220 \pm 0.018$	$2.70 \pm 0.18$	$11.50 \pm 0.52$	$85.2 \pm 4.5$	$386 \pm 22$
Caf-ESR*	$0.0040 \pm 0.0003$	$0.080 \pm 0.010$	$2.23 \pm 0.11$	$14.20 \pm 0.66$	$60.0 \pm 3.9$	$322 \pm 29$

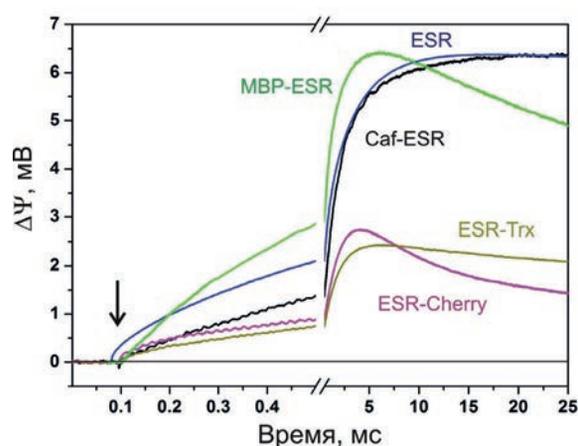
\* Используются данные из статьи Petrovskaya et al. [37].

протонов под действием света происходит генерация разности потенциалов между ячейками по обе стороны мембраны. Анализ полученных кинетических кривых наряду с результатами изучения фотоцикла позволяет сделать выводы о механизме транспорта протонов через мембрану и об ориентации белка в мембране протеолипосом [51, 52].

Ранее нами было показано, что фотоэлектрический ответ ESR включает микро- и миллисекундные фазы, в основном соответствующие депротонированию основания Шиффа, переносу протона на акцептор Asp85 и его репротонированию от донора Lys96 и высвобождению протона на внеклеточной стороне мембраны [34, 51, 53]. Фотоэлектрический ответ гибридных белков, содержащих ESR на N-конце (ESR-Cherry и ESR-Trx), сопровождается существенным уменьшением общей амплитуды ответа, в особенности, электрогенных стадий в миллисекундном временном диапазоне [37] (рис. 4). Полученные данные свидетельствуют о значительной доле неправильно ориентированных молекул ретинального белка в мембране протеолипосом. Напротив, гибридные белки Caf-ESR [37] и MBP-ESR продемонстрировали фотоэлектрический ответ, сопоставимый по амплитуде с ответом ESR дикого типа (рис. 4), что указывает на их гомогенную ориентацию в протеолипосомах. Характерная особенность гибридов Caf-ESR и MBP-ESR – более медленная кинетика микросекундных электрогенных стадий, связанных с образованием интермедиата М. Кроме того, фотоэлектрический ответ MBP-ESR обнаруживает ускоренный спад потенциала в миллисекундной области, предположительно связанный с влиянием крупного растворимого домена. Эти особенности электрогенных реакций гибридного белка требуют более детального кинетического анализа, который будет проведен в последующей работе.

В кинетике светоиндуцированных изменений поглощения гибридного белка MBP-ESR в составе протеолипосом при pH 7.5 образование интермедиата М (увеличение поглощения при

410 нм) не наблюдается (рис. 5а), что также было характерно для других гибридных белков, включающих ESR [37]. При pH 8.5 в течение первых 10 мкс обнаруживается снижение поглощения при 590 нм, что соответствует распаду интермедиатов К и L (рис. 5б). После этого детектируется накопление состояния М ( $\tau \sim 5$  и 32 мкс), которое переходит в интермедиат N2/O с характерным временем 2.6 мс. Его распад и возвращение в исходное состояние ESR происходит с константами  $\sim 12$  и 58 мс. Следует отметить, что протеолипосомы, содержащие ESR дикого типа, демонстрируют выраженное образование интермедиата М при pH 7.5 [50]. Его видимое отсутствие в фотоцикле протеолипосом, содержащих гибридные белки, может быть связано с влиянием растворимых доменов на физико-химические свойства мембранного окружения и, следовательно, на  $pK_a$  образования интермедиата М в этих белках [37].



**Рис. 4.** Кинетика образования трансмембранной разности потенциалов ( $\Delta\Psi$ ) протеолипосомами, содержащими ESR дикого типа и гибридные белки, при pH 7.5. Стрелкой отмечен момент лазерной вспышки. Данные для ESR, Caf-ESR, ESR-Cherry и ESR-Trx взяты из статьи Petrovskaya et al. [37].

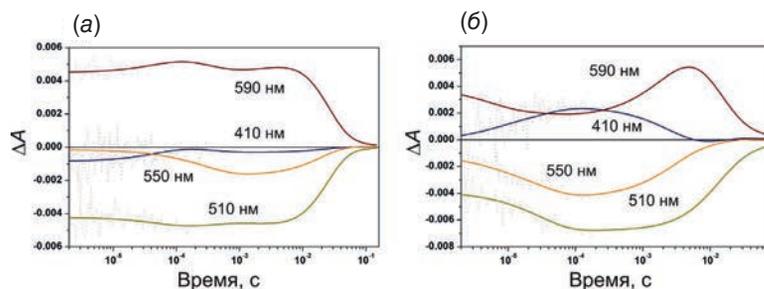


Рис. 5. Кинетика светоиндуцированных изменений поглощения при характерных длинах волн протеолипосомами, содержащими MBP-ESR, при pH 7.5 (а) и 8.5 (б).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы фирм Merck (США), Panreac (Испания), Sigma (США), нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США), компоненты сред для культивирования бактерий (Amresco, США), наборы для выделения ДНК (Thermo Fisher Scientific, США), органические растворители производства Химмед (Россия). Растворы готовили на деионизированной воде Milli-Q.

**Клонирование рекомбинантных ДНК** осуществляли стандартными методами в клетках *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, США). Использовали ферменты производства Thermo Fisher Scientific (США). Олигонуклеотиды синтезированы фирмой Евроген (Россия).

**Конструирование гибридных генов.** Конструирование генов секретируемых гибридных белков mCherry-ESR (с сигнальной последовательностью PelB) и Caf-ESR (с собственной сигнальной последовательностью) подробно описано ранее [37]. Для получения гибридного гена *mCherry-ESR*, не содержащего сигнальной последовательности, ген *ESR* амплифицировали из плазмиды pET-ESR [32] с использованием праймеров Bam\_ESR и ESR\_Xho (табл. 2) и после обработки рестриктазами BamHI и XhoI клонировали в плазмиду pChFn3 [54], обра-

ботанную этими же рестриктазами. Плазмиду, кодирующую гибридный белок Tgx-ESR, получали клонированием этого же ПЦР-фрагмента в вектор pET32 (Novagen, США). Для объединения с геном *Mistic* фрагмент плазмиды pET-ESR, полученный обработкой рестриктазами NdeI и XhoI, клонировали в плазмиду pMT32H10 [38]. Ген *MBP* (с сигнальной последовательностью и без) амплифицировали из клеток *E. coli* штамма XL1-Blue с использованием праймеров Nde\_MBП или Nde\_MBП2 соответственно и MBP\_Bam (табл. 2), обрабатывали рестриктазами NdeI и BamHI и клонировали в вектор, полученный обработкой ДНК pCaf-ESR [37] этими же рестриктазами. Последовательность вставки в полученных плаزمиде подтверждали секвенированием с использованием стандартных праймеров T7prom и T7term (Евроген, Россия).

**Выделение мембранной фракции.** Культуру штамма *E. coli* C43(DE3), трансформированную одной из полученных плазмид, выращивали в среде LB с ампициллином (100 мкг/мл) при 37°C до значения  $OD_{560}$  0.5–0.7, индуцировали добавлением 0.2 мМ изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG), после чего добавляли 7.5 мкМ all-*trans*-ретиаль (Sigma, США) и продолжали культивирование в течение 16 ч при 25°C. Клетки осаждали при 7000 g и 5°C в течение 10 мин, затем осадок ресуспендировали

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров

Название праймера	Последовательность (5'–3')
Bam_ESR	ATAAGGATCCGGTGGAGGTGGCTCTGAAGAAGTCAATTTACTCGTTC
ESR_Xho	ACATCTCGAGGGACGTCAGCGTTTTTCSTT
Nde_MBП	ATTATCATATGAAAATAAAAACAGGTGCACG
Nde_MBП2	ATTATCATATGAAAATCGAAGAAGGTAACCTGG
MBP_Bam	ATTATGGATCCGCCTCCACCCTTGGTGATACGAGTCTGCG

Примечание: подчеркнуты сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции.

в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 5 мМ EDTA, 20% сахарозы, лизоцим (0.2 мг/мл), и разрушали ультразвуком. Суспензию центрифугировали 30 мин при 6000 g. Полученный супернатант центрифугировали 1 ч при 100 000 g, осадок мембранной фракции суспендировали в 50 мМ Tris-HCl, pH 8.0.

**Вестерн-блот-анализ.** Белки, разделенные гелеэлектрофорезом в 13%-ном SDS-ПААГ по методу Лэммли, переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) с помощью прибора для полусухого переноса. После инкубации в растворе 1%-ного BSA в TBS (20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 8.0) в течение 1 ч при 37°C мембрану выдерживали 1 ч при комнатной температуре в растворе конъюгата моноклональных антител к His-тагу с пероксидазой (1 мкг/мл; Invitrogen, США) в 1%-ном BSA в TBS. После трехкратной промывки TBS с добавлением 0.1% Tween-20 проводили окрашивание мембраны с использованием преципитирующего 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Clinical Science Products, США).

**Выделение гибридного белка MBP-ESR.** Мембраны из клеток *E. coli* C43(DE3), экспрессирующих MBP-ESR, получали, как описано выше, и солубилизовали добавлением 1% DDM (Anatrace, США). Рекомбинантные белки очищали на колонке с Ni-сефарозой, как описано ранее [32], затем тщательно отмывали с помощью центрифужных фильтрующих устройств Ultracel YM-30 (Merck Millipore, США) и переводили в комплексный буфер (по 5 мМ цитрата натрия, MES, MOPS и CHES, 100 мМ NaCl, pH 7.4), содержащий 0.05% DDM.

**Исследование спектральных и фотоэлектрических характеристик MBP-ESR.** Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре UV1700 (Shimadzu, Япония). Кинетику светоиндуцированных изменений поглощения измеряли, как описано ранее [35]. При 410 нм регистрировали изменения поглощения, вызванные образованием и распадом М-интермедиата; при 590 нм – изменения поглощения вследствие образования и распада N- и О-интермедиатов; при 550 нм – вследствие возвращения в исходное состояние, а также образования и распада К-, М- и N-интермедиатов; при 510 нм – изменения, отражающие в основном превращения L-интермедиата. Для активации фотоцикла использовали вторую гармонику Nd-YAG-лазера (532 нм, 7 нс, 10 мДж).

Встраивание в протеолипосомы на основе азолектина, измерения фотоиндуцированных изменений поглощения в суспензии липосом и фотоэлектрические измерения прямым электро-

метрическим методом протеолипосом, адсорбированных на армированной коллоидной пленкой макроскопической фосфолипидной мембране, проводили, как описано ранее [36, 53, 55]. Использовали сконструированную для измерений прямым электрометрическим методом установку с временным разрешением до 100 нс в сочетании с импульсным Nd-YAG-лазером (532 нм, 12 нс, 40 мДж). Кинетику образования ΔΨ на макроскопической мембране в ответ на лазерную вспышку, пропорционального генерируемого ESR ΔΨ на мембране протеолипосом, измеряли электродами Ag/AgCl, расположенными по разные стороны макроскопической мембраны.

Данные оптических измерений с временным разрешением были сведены к сумме отдельных компонент с использованием программного обеспечения Mathematica (Wolfram, США), Origin (OriginLab Corporation, США) и MATLAB (The Mathworks, США).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структурно-функциональные исследования мембранных белков требуют разработки эффективных методов их продукции в гетерологических системах, позволяющих нарабатывать миллиграммовые количества препаратов в правильно свернутом, функционально активном состоянии. Конструирование гибридных белков способствует успешному решению этих задач, а также обеспечивает условия для гомогенного встраивания в мембрану, что может иметь решающее значение для корректной оценки функциональной активности целевых биомолекул.

В результате анализа экспрессии полученных в данной работе гибридных белковых конструкций, содержащих протеородопсин ESR и различные белки-партнеры, установлено, что высокий уровень синтеза в клетках бактерий достигается только при использовании в качестве N-концевых партнеров природных секретлируемых белков, включающих собственный сигнальный пептид (Caf-ESR и MBP-ESR). Изучение свойств выделенных гибридных белков в составе мицелл и протеолипосом показало, что они демонстрируют спектрально-временные параметры фотоцикла и кинетику генерации мембранного потенциала, характерные в общих чертах для исходного белка ESR.

Полученные конструкции могут быть использованы для создания систем бактериальной экспрессии различных мембранных белков в составе гибридов, обеспечивающих их единообразное встраивание в протеолипосомы.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-795, уникальный идентификатор проекта RF-190220X0027).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Govorunova E.G., Sineshchekov O.A., Li H., Spudich J.L.* // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. V. 86. P. 845–872.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-101910-144233>
2. *Gushchin I., Gordeliy V.* // In: *Membrane Protein Complexes: Structure and Function. Subcellular Biochemistry. V. 87* / Eds. Harris J., Boekema E. Singapore: Springer Singapore, 2018. P. 19–56.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_2)
3. *Kandori H.* // *Biophys. Rev.* 2020. V. 12. P. 355–361.  
<https://doi.org/10.1007/s12551-020-00645-0>
4. *Brown L.S.* // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2022. V. 1864. P. 183867.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.183867>
5. *Lanyi J.K.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1757. P. 1012–1018.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2005.11.003>
6. *Oesterhelt D., Stoekenius W.* // *Nature.* 1971. V. 233. P. 149–152.  
<https://doi.org/10.1038/newbio233149a0>
7. *Lanyi J.K., Luecke H.* // *Curr. Opin. Str. Biol.* 2001. V. 11. P. 415–419.  
[https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00226-8](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00226-8)
8. *Ovchinnikov Y.A., Abdulaev N.G., Feigina M.Y., Kiselev A.V., Lobanov N.A.* // *FEBS Lett.* 1979. V. 100. P. 219–224.  
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80338-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80338-5)
9. *Ovchinnikov Y.A.* // *Photochem. Photobiol.* 1987. V. 45. P. 909–914.  
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1987.tb07902.x>
10. *Oesterhelt D., Stoekenius W.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1973. V. 70. P. 2853–2857.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.70.10.2853>
11. *Gómez-Consarnau L., Raven J.A., Levine N.M., Cutter L.S., Wang D., Seegers B., Aristegui J., Fuhrman J.A., Gasol J.M., Sañudo-Wilhelmy S.A.* // *Sci. Adv.* 2019. V. 5. P. eaaw8855.  
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw8855>
12. *DeLong E.F., Beja O.* // *PLoS Biol.* 2010. V. 8. e1000359.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000359>
13. *Lyukmanova E., Shenkarev Z., Khabibullina N., Kopeina G., Shulepko M., Paramonov A., Mineev K., Tikhonov R., Shingarova L., Petrovskaya L., Dolgikh D., Arseniev A., Kirpichnikov M.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1818. P. 349–358.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.020>
14. *Amati A.M., Graf S., Deutschmann S., Dolder N., von Ballmoos C.* // *Biochem. Soc. Trans.* 2020. V. 48. P. 1473–1492.  
<https://doi.org/10.1042/bst20190966>
15. *Racker E., Stoekenius W.* // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 662–663.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43080-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43080-9)
16. *Deisinger B., Nawroth T., Zwicker K., Matuschka S., John G., Zimmer G., Freisleben H.-J.* // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 218. P. 377–383.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18387.x>
17. *Pitard B., Richard P., Duñarach M., Girault G., Rigaudi J.-L.* // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 235. P. 769–778.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00769.x>
18. *Lee K.Y., Park S.-J., Lee K.A., Kim S.-H., Kim H., Meroz Y., Mahadevan L., Jung K.-H., Ahn T.K., Parker K.K.* // *Nat. Biotechnol.* 2018. V. 36. P. 530–535.  
<https://doi.org/10.1038/nbt.4140>
19. *Choi H.-J., Montemagno C.D.* // *Nano Lett.* 2005. V. 5. P. 2538–2542.  
<https://doi.org/10.1021/nl051896e>
20. *Rigaudi J.-L., Pitard B., Levy D.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V. 1231. P. 223–246.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(95\)00091-v](https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00091-v)
21. *Shen H. H., Lithgow T., Martin L.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 1589–1607.  
<https://doi.org/10.3390/ijms14011589>
22. *Bogdanov M., Dowhan W., Vitrac H.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1843. P. 1475–1488.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.007>
23. *Cymer F., Von Heijne G., White S.H.* // *J. Mol. Biol.* 2015. V. 427. P. 999–1022.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.014>
24. *Huang K.-S., Bayley H., Khorana H.G.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1980. V. 77. P. 323–327.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.77.1.323>
25. *Dioumaev A.K., Wang J.M., Bálint Z., Váró G., Lanyi J.K.* // *Biochemistry.* 2003. V. 42. P. 6582–6587.  
<https://doi.org/10.1021/bi034253r>

26. Seigneuret M., Rigaud J.-L. // FEBS Lett. 1985. V. 188. P. 101–106. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80883-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80883-8)
27. Seigneuret M., Rigaud J.-L. // FEBS Lett. 1988. V. 228. P. 79–84. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80589-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80589-1)
28. Tunuguntla R., Bangar M., Kim K., Stroeve P., Ajo-Franklin C.M., Noy A. // Biophys. J. 2013. V. 105. P. 1388–1396. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.07.043>
29. Pflieger N., Wörner A.C., Yang J., Shastri S., Hellmich U.A., Aslimovska L., Maier M.S., Glaubitz C. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1787. P. 697–705. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.02.022>
30. Lee H., Kim H. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014. V. 453. P. 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.111>
31. Ritzmann N., Thoma J., Hirschi S., Kalbermatter D., Fotiadis D., Muller D.J. // Biophys. J. 2017. V. 113. P. 1181–1186. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.06.022>
32. Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Chupin V.V., Sychev S.V., Lyukmanova E.N., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Spirina E.V., Rivkina E.M., Khatypov R.A., Erokhina L.G., Gilichinsky D.A., Shuvalov V.A., Kirpichnikov M.P. // FEBS Lett. 2010. V. 584. P. 4193–4196. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.005>
33. Петровская Л.Е., Балашов С.П., Лукашев Е.П., Имашева Э.С., Гуцин И.Ю., Дюмаев А.К., Рубин А.Б., Долгих Д.А., Горделий В.И., Лани Я.К., Кирпичников М.П. // Биохимия. 2015. Т. 80. С. 814–828. [Petrovskaya L., Balashov S., Lukashev E., Imasheva E., Gushchin I.Y., Dioumaev A., Rubin A., Dolgikh D., Gordeliy V., Lanyi J., Kirpichnikov M. // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 688–700]. <https://doi.org/10.1134/S000629791506005X>
34. Петровская Л.Е., Силецкий С.А., Лукашев Е.П., Балашов С.П., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. // Биохимия. 2023. Т. 88. С. 1867–1879. [Petrovskaya L.E., Siletsky S.A., Mamedov M.D., Lukashev E.P., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // Biochemistry (Moscow). 2023. V. 88. P. 1544–1554]. <https://doi.org/10.1134/s0006297923100103>
35. Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Imasheva E.S., Lukashev E.P., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 21254–21265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.465138>
36. Siletsky S.A., Mamedov M.D., Lukashev E.P., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Petrovskaya L.E. // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 2019. V. 1860. P. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.09.365>
37. Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Mamedov M.D., Kryukova E.A., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Siletsky S.A. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 7369. <https://doi.org/10.3390/ijms24087369>
38. Петровская Л.Е., Шульга А.А., Бочарова О.В., Ермолюк Я.С., Крюкова Е.А., Чупин В.В., Бломмерс М.Ж.Ж., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П. // Биохимия. 2010. Т. 75. С. 1001–1013. [Petrovskaya L., Shulga A., Bocharova O., Ermolyuk Y.S., Kryukova E., Chupin V., Blommers M., Arseniev A., Kirpichnikov M. // Biochemistry (Moscow). 2010. V. 75. P. 881–891]. <https://doi.org/10.1134/S0006297910070102>
39. Ishihara G., Goto M., Saeki M., Ito K., Hori T., Kigawa T., Shirouzu M., Yokoyama S. // Prot. Expr. Purif. 2005. V. 41. P. 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.013>
40. Chen G.Q., Gouaux J.E. // Prot. Sci. 1996. V. 5. P. 456–467. <https://doi.org/10.1002/pro.5560050307>
41. Lyukmanova E., Shenkarev Z., Khabibullina N., Kulbatskiy D., Shulepko M., Petrovskaya L., Arseniev A., Dolgikh D., Kirpichnikov M. // Act. Nat. 2012. V. 4. P. 58–64. <https://doi.org/10.32607/20758251-2012-4-4-58-64>
42. Raran-Kurussi S., Waugh D.S. // PLoS One. 2012. V. 7. e49589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049589>
43. Kapust R.B., Waugh D.S. // Prot. Sci. 1999. V. 8. P. 1668–1674. <https://doi.org/10.1110/ps.8.8.1668>
44. Yeliseev A., Zoubak L., Gawrisch K. // Prot. Expr. Purif. 2007. V. 53. P. 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.12.003>
45. Weiß H.M., Grisshammer R. // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 82–92. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2002.02618.x>
46. Hu J., Qin H., Gao F.P., Cross T.A. // Prot. Expr. Purif. 2011. V. 80. P. 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.06.001>
47. Gubellini F., Verdon G., Karpowich N.K., Luff J.D., Boel G., Gauthier N., Handelman S.K., Ades S.E., Hunt J.F. // Mol. Cell. Proteom. 2011. V. 10. P. 930. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.007930>
48. Xu L.Y., Link A.J. // Biotechnol. Lett. 2009. V. 31. P. 1775–1782. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0075-5>
49. Petrovskaya L.E., Ziganshin R.H., Kryukova E.A., Zlobin A.V., Gapizov S.S., Shingarova L.N., Mironov V.A., Lomakina G.Y., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2021. V. 193. P. 3672–3703. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03634-5>

50. Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Imasheva E.S., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. // *Biochemistry*. 2012. V. 51. P. 5748–5762.  
<https://doi.org/10.1021/bi300409m>
51. Siletsky S.A., Mamedov M.D., Lukashev E.P., Balashov S.P., Petrovskaya L.E. // *Biophys. Rev.* 2022. V. 14. P. 771–778.  
<https://doi.org/10.1007/s12551-022-00986-y>
52. Drachev L.A., Jasaitis A.A., Kaulen A.D., Kondrashin A.A., Liberman E.A., Nemecek I.B., Ostroumov S.A., Semenov A.Y., Skulachev V.P. // *Nature*. 1974. V. 249. P. 321–324.  
<https://doi.org/10.1038/249321a0>
53. Siletsky S.A., Mamedov M.D., Lukashev E.P., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Petrovskaya L.E. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. V. 1857. P. 1741–1750.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.08.004>
54. Petrovskaya L., Gapizov S. S., Shingarova L., Kryukova E., Boldyreva E., Yakimov S., Svirshevskaya E., Lukashev E., Dolgikh D., Kirpichnikov M. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2014. V. 40. P. 375–382.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162014030121>
55. Siletsky S.A., Lukashev E.P., Mamedov M.D., Borisov V.B., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Petrovskaya L.E. // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2021. V. 1862. P. 148328.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148328>

## Hybrid Proteins Containing Proteorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum*

L. E. Petrovskaya\*, \*\*, #, E. A. Kryukova\*, \*\*\*, V. A. Bolshakov\*\*\*\*, E. P. Lukashev\*\*\*\*, S. A. Siletsky\*\*\*\*\*, M. D. Mamedov\*\*\*\*\*, R. V. Sudakov\*\*\*\*\*, D. A. Dolgikh\*, \*\*\*, \*\*\*\*, and M. P. Kirpichnikov\*, \*\*\*\*

# E-mail: [lpetr65@yahoo.com](mailto:lpetr65@yahoo.com)

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

\*\* Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

\*\*\* Emanuel Institute of Biochemical Physics, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

\*\*\*\* Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/11, Moscow, 119234 Russia

\*\*\*\*\* Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskiye gory 1/40, Moscow, 119992 Russia

The genes of hybrid proteins including *Exiguobacterium sibiricum* proteorhodopsin (ESR) and various N-terminal soluble domains have been constructed. Effective synthesis in *Escherichia coli* cells was observed only in the case of hybrids with chaperone Caf1M and maltose-binding protein MBP expressed as precursors with their own signal sequences. The study of the isolated MBP-ESR protein in micelles and proteoliposomes demonstrated formation and decay of the main photocycle intermediates at pH > 8. The photoelectric response of the hybrid proteins Caf-ESR and MBP-ESR is comparable in amplitude to the wild-type ESR response, indicating their homogeneous orientation in the membrane. The obtained constructions can be used to create bacterial expression systems for various retinal proteins, ensuring their uniform incorporation into proteoliposomes.

**Keywords:** proteorhodopsin, hybrid protein, expression in *Escherichia coli*, photocycle, direct electrometric method



УДК 577.22

# СТРУКТУРА ВНЕШНЕГО ГЕПТАМЕРНОГО $\alpha$ -КОЛЬЦА 26S ИММУНОПРОТЕАСОМЫ ЧЕЛОВЕКА В ПРЕДАКТИВАЦИОННОМ СОСТОЯНИИ, ВЫЯВЛЕННАЯ МЕТОДОМ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ С РАЗРЕШЕНИЕМ 3.6 Å

© 2024 г. Г. А. Саратов\*, Т. Н. Баймухаметов\*\*, А. Л. Коневега\*\*\*, \*\*\*\*, \*\*\*\*\*,  
А. А. Кудряева\*, А. А. Белогуров\*, \*\*\*\*\*, #

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

\*\* НИЦ “Курчатовский институт”, Россия, 123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 1

\*\*\* ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова  
НИЦ “Курчатовский институт”,

Россия, 188300 Гатчина, мкр. Орлова роца, 1

\*\*\*\* Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (СПбПУ),  
Россия, 195251 Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

\*\*\*\*\* Московский государственный медико-стоматологический университет  
им. А.И. Евдокимова Минздрава России,

Россия, 127473 Москва, ул. Десятская, 20/1

Поступила в редакцию 05.12.2023 г.

После доработки 13.12.2023 г.

Принята к публикации 14.12.2023 г.

26S протеасома представляет собой уникальный мультикаталитический протеиназный комплекс, совместно с системой убиквитинирования обеспечивающий контролируемую деградацию большинства внутриклеточных белков эукариот. Проблема изучения протеасомы состоит в множественности ее внутриклеточных форм, которые образуются благодаря модульности процесса сборки протеасомы. В настоящем исследовании методом криоэлектронной микроскопии нами впервые описана структура 26S иммунопротеасомы человека с разрешением 3.6 Å в сравнении с ее конститутивной формой. Детальный анализ структурных особенностей конститутивной и иммунной форм 26S протеасомы выявил раскрытие входа во внешнем гептамерном  $\alpha$ -кольце 20S субчастицы иммунопротеасомы вследствие разобщенности *N*-концевых областей субъединиц PSMA4 и PSMA5 и образования  $\pi$ - $\pi$ -укладки между остатками Tyr5 и Phe9 субъединиц PSMA5 и PSMA6 соответственно. Выявленное снятие стерического затруднения в центральном канале 20S субчастицы может свидетельствовать о предактивационном фенотипе 26S иммунопротеасомы человека даже в отсутствие связанного субстрата.

*Ключевые слова:* протеасома, иммунопротеасома, криоэлектронная микроскопия

**DOI:** 10.31857/S0132342324030101, **EDN:** NYZKEM

## ВВЕДЕНИЕ

Убиквитин-протеасомная система, представленная более чем тысячей белков в геноме млекопитающих, участвует во всех критических внутриклеточных процессах, таких как дифференцировка, репарация ДНК, апоптоз, аутофагия, регуляция клеточного цикла, контроль качества белка,

контроль транскрипции и генерация пептидов, ассоциированных с комплексом гистосовместимости I класса [1]. Прежде чем произойдет деградация, опосредованная протеасомой, большинству белков необходимо быть ковалентно помеченными цепью в среднем из шести молекул убиквитина (Ub), что происходит благодаря каскаду убиквитин-лигаз [2]. Как правило,  $\epsilon$ -аминогруппа

Сокращения: c26S – 26S конститутивная протеасома; i26S – 26S иммунопротеасома; IFN $\gamma$  – интерферон гамма; Ub – убиквитин; крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 335-22-88; эл. почта: belogurov@ibch.ru).

лизина в полипептидной последовательности субстрата образует изопептидную связь с С-концевой карбоксильной группой аминокислотного остатка Gly76 проксимального Ub. Дальнейшая элонгация полиубиквитиновой цепи системой убиквитинирования осуществляется путем конъюгации следующей молекулы Ub с аминогруппой бокового радикала аминокислотного остатка Lys48 предыдущего Ub [3]. Открытие АТФ-зависимой системы убиквитинирования [4] было в дальнейшем комплементарно дополнено обнаружением мультикаталитического протеиназного комплекса массой 2.5 МДа, названного 26S протеасомой [5]. Дальнейшие исследования показали, что 26S протеасома содержит сложно организованную 19S регуляторную субчастицу [6], накрывающую торец 20S каталитической субчастицы, которая отвечает за распознавание [7], разворачивание [8], деубиквитинирование [9] субстрата и его транслокацию в каталитическую камеру [10].

Так называемое “каталитическое ядро” или “коровая” 20S субчастица представляет собой цилиндр, состоящий из четырех гептамерных колец – двух внешних  $\alpha$ - и двух внутренних  $\beta$ -колец [11]. Из семи  $\beta$ -субъединиц только три –  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$  – обладают каталитической активностью. У челюстных позвоночных животных, включая млекопитающих, конститутивные каталитические субъединицы  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$  под действием IFN $\gamma$  заменяются на  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  и  $\beta 5i$ , что приводит к образованию так называемой иммунопротеасомы. Иммунопротеасома теряет активность по типу каспазы, при этом по сравнению со стандартной протеасомой усиливается трипсиноподобная и химотрипсиноподобная активность. Набор антигенных пептидов, образующихся при действии иммунопротеасомы, отличается от набора пептидов, формирующегося за счет конститутивной протеасомы [12, 13]. Из-за разницы в субстратной специфичности между конститутивной протеасомой и иммунопротеасомой антигенные пептиды, имеющие гидрофобный С-конец и вследствие этого больше подходящие по структуре для загрузки на молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса, производятся главным образом иммунопротеасомой [14].

19S регуляторная субчастица (RP – regulatory particle, также известная как PA700 – proteasome activator 700) состоит из 19 различающихся между собой белковых субъединиц и подразделяется на “основание” (base) и “крышку” (lid). Нижний (базовый) элемент состоит из регуляторных частиц трипл-А (regulatory particle triple-A ATPase, Rpt), обладающих АТФазной активностью, и регуляторных частиц Rpn1, Rpn2, Rpn10 и Rpn13, не

являющихся АТФазами (Regulatory Particle, Non-ATPase-like, Rpn) [11]. Субъединицы Rpn10 [7], Rpn13 [15] и, как показано недавно, Rpn1 [16] являются рецепторами полиубиквитиновой цепи. Верхний элемент состоит из девяти не-АТФазных субъединиц: Rpn3, 5–9, 11–12 и Rpn11, осуществляющей деубиквитинирование субстрата.

На настоящий момент удалось изучить и описать молекулярный механизм, который лежит в основе гидролиза полиубиквитинированных субстратов протеасомой [17]. На первом этапе субстрат связывается посредством полиубиквитиновой цепи с UIM-доменами в составе убиквитиновых рецепторов регуляторной субчастицы протеасомы. Далее неструктурированный участок субстрата взаимодействует с верхними элементами субъединиц АТФазного кольца. Каскадный гидролиз АТФ в субъединицах Rpt1–6 приводит к перестройке АТФазного кольца в новую конфигурацию, вызывая уширение и выравнивание центрального канала, ведущего в протеолитическую полость 20S субчастицы. Одновременно с этим Rpn11 смещается в центральное положение непосредственно над входом в протеолитическую полость, благодаря чему активный сайт деубиквитиназы получает возможность отделить полиубиквитиновую цепь от субстрата по мере его транслокации. Недавно опубликованные данные свидетельствуют о ключевом значении аминокислотных остатков тирозина в составе Rpt-субъединиц, которые формируют спиральную опоясывающую структуру вокруг транслоцируемой полипептидной цепи субстрата [10]. Каскадный гидролиз молекул АТФ в Rpt-субъединицах приводит к их кооперативному смещению вниз, которое, в свою очередь, поступательно проталкивает полипептидную цепь субстрата в протеолитическую субчастицу.

Цель настоящей работы – методом криоэлектронной микроскопии впервые получить структуру 26S иммунопротеасомы человека с разрешением 3.6 Å и осуществить сравнительный анализ данной структуры с 26S протеасомой конститутивного фенотипа в том же разрешении.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

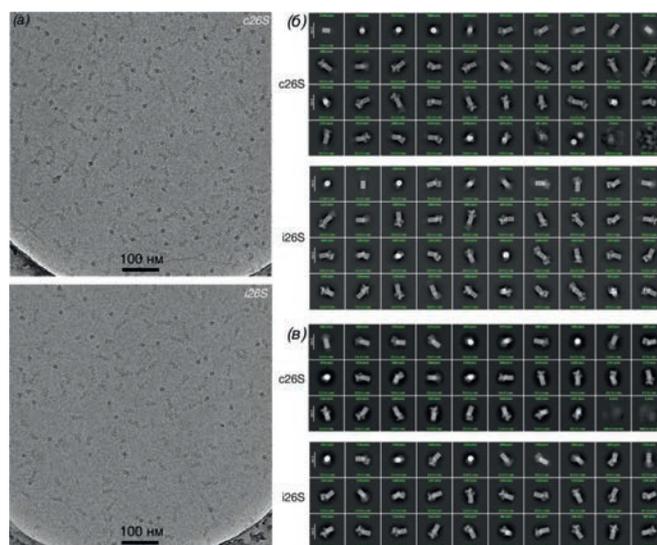
**Получение и обработка данных криоэлектронной микроскопии препаратов 26S конститутивной протеасомы и 26S иммунопротеасомы.** В результате распознавания частиц из экспериментальных данных криоэлектронной микроскопии был получен массив из 239 705 и 146 134 проекций для конститутивной и им-

мунной форм 26S протеасомных субчастиц соответственно. Полученные проекции импортировали в cryoSPARC (версия 4.2.1) [18] для дальнейшей обработки и анализа. С помощью нескольких последовательных раундов двумерной классификации (2D classification) были исключены ложноположительные проекции, а также загрязнения образца различного рода, попавшие в выборку.

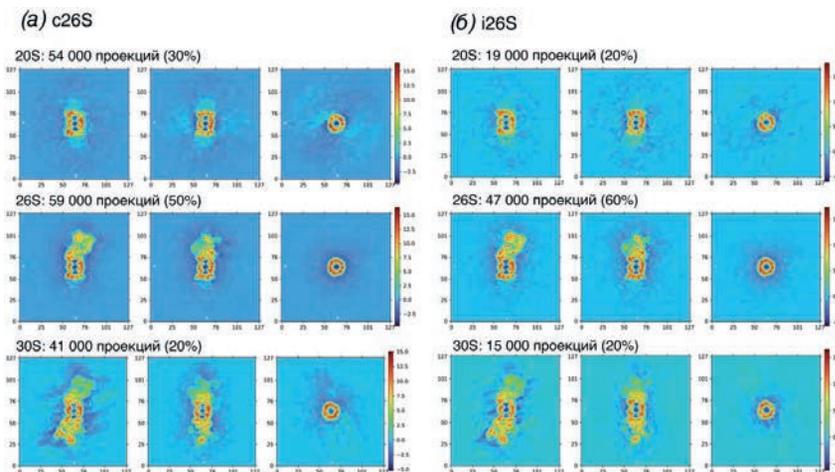
Финальный результат классификации, вместе с характерными исходными усредненными изображениями, приведен на рис. 1. Поскольку данные представляют собой смесь из 20S, 26S и 30S протеасомных субчастиц, с помощью процедуры *ab-initio* реконструкции (Ab-Initio Reconstruction) было получено предварительное разбиение выборок на три структурные группы и соответствующие начальные модели низкого разрешения (12 Å). Далее с помощью процедуры гетерогенного уточнения (Heterogeneous Refinement), используя только коровую 20S часть в качестве начальной модели, выборки были классифицированы с большей точностью, при этом выравнивание карт трех различных структурных модификаций протеасомы было выполнено по общей центральной 20S субчастице (рис. 2). Сходимость неоднородного уточнения (Non-uniform Refinement) [19] карт для 26S субчастиц вместе с локальной коррекцией дефокусировки для каждой проекции (Local CTF Refinement) и уточнением аберраций более высоких порядков (Global CTF Refinement) не было ограничено пространственной частотой Найквиста при данном физическом размере пикселя (разрешение

ограничено 3.6 Å) и достигло 3.9 Å в области 20S, оцененное в соответствии со стандартным пороговым критерием FSC = 0.143 (здесь и далее) для функции корреляции (Fourier Shell Correlation, FSC) между двумя картами (half-maps), независимо реконструированными в соответствии со случайным разбиением исходного массива на две равные подвыборки проекций [20, 21]. Далее 81 714 и 45 782 проекций 26S субъединицы конститутивной и иммунной протеасомы соответственно вместе с необходимыми метаданными (координаты проекций и относительные сдвиги изображений в стеке, найденные в процессе предобработки) экспортировали в RELION (версия 4.0.1) для оценки траекторий движения частиц, вызванного взаимодействием пучка электронов с образцом, с помощью метода на основе регрессии гауссовского процесса (Bayesian polishing) [22], который позволяет с большей точностью корректировать локальные смещения частиц, возникающие в процессе детектирования изображения.

Данный подход позволил получить карты с разрешением 3.7 Å в случае глобального уточнения (выравнивание по коровой 20S субчастице) и 4.5 Å в случае локального уточнения (Local refinement) для подвижной 19S регуляторной субчастицы с вычитанием сигнала 20S субчастицы. Для локального уточнения коровой 20S субчастицы уточнение достигло максимального разрешения 3.6 Å для данного физического размера пикселя. Для описания непрерывной конформационной динамики 19S в составе 26S протеасомы был применен новый метод уточнения (3D Flexible



**Рис. 1.** (а) – Характерное исходное крио-ЭМ-изображение протеасомных субчастиц конститутивной (c26S) и иммунной (i26S) формы; (б) – результат двумерной классификации исходного набора проекций; (в) – подвыборки проекций 26S протеасомных субчастиц.



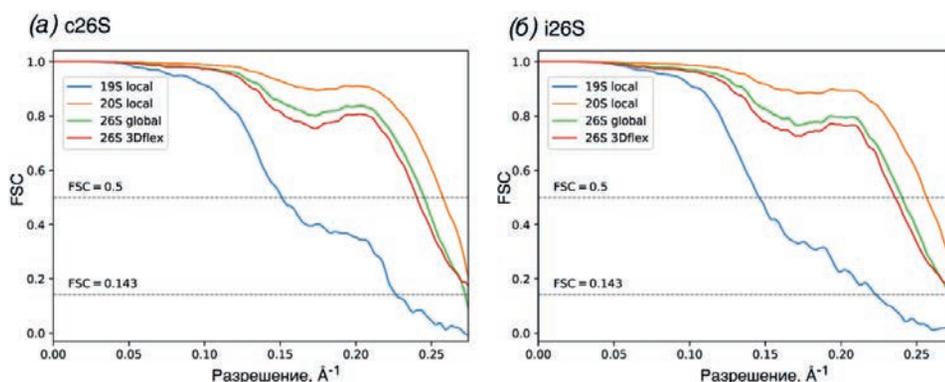
**Рис. 2.** Результат гетерогенного уточнения (Heterogeneous Refinement) в случае конститутивной c26S (а) и иммунной i26S (б) форм протеасомы. Показаны ортогональные срезы крио-ЭМ-карт вдоль трех осей для трех структурных организаций протеасомных субчастиц. Указаны абсолютные количества соответствующих проекций в выборке данных после двумерной классификации.

Refinement) [23], позволяющий с помощью генеративного моделирования параметризовать подвижность на уровне вторичной структуры в виде скрытых переменных. Результаты глобального уточнения использовали в качестве усредненной по всем конформациям консенсус-карты и подавали на вход процедуры, пространство скрытых переменных было ограничено двумя измерениями, все прочие параметры были выбраны по умолчанию.

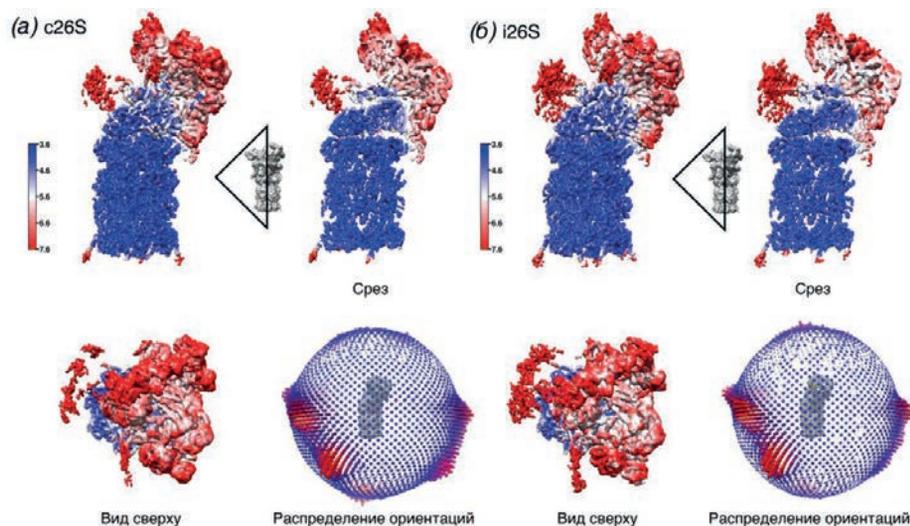
Разрешение полученных карт составило 3.6 Å (для наиболее стабильных областей), разрешение в области 19S значительно улучшено относительно глобального уточнения. Корреляционные кривые FSC для четырех полученных крио-ЭМ-изображений в каждом из двух экспериментов показаны на рис. 3. Для всех карт выпол-

нена оценка локального разрешения (рис. 4) с помощью реализованной в cryoSPARC стандартной процедуры, аналогичной алгоритму Blocres [24], локальная фильтрация, а также проведена постобработка с помощью алгоритма DeepEMhancer [25], что позволило качественно повысить интерпретируемость карт в областях высокой подвижности. Карты электронных плотностей депонированы в базу данных EMDB (Electron Microscopy Data Bank) под референсными номерами EMD-19571 и EMD-19572.

**Анализ особенностей структурной организации 26S иммунопротеасомы человека.** В настоящей работе нами были получены структуры 26S протеасомы человека в конститутивной и иммунной формах с разрешением 3.6 Å. Сравнительный анализ общей структуры двух комп-



**Рис. 3.** Корреляционные кривые (Fourier Shell Correlation, FSC) в случае конститутивной c26S (а) и иммунной i26S (б) форм протеасомной субчастицы. Показаны кривые для локального уточнения 19S субчастицы (19S local, синий), локального уточнения коровки 20S субчастицы (20S local, оранжевый), глобального уточнения 26S субчастицы с выравниванием относительно 20S (26S global, зеленый) и уточнения с помощью метода 3D Flexible Refinement (26S 3Dflex, красный). Пунктирными линиями показаны два стандартных пороговых значения корреляций 0.5 и 0.143.

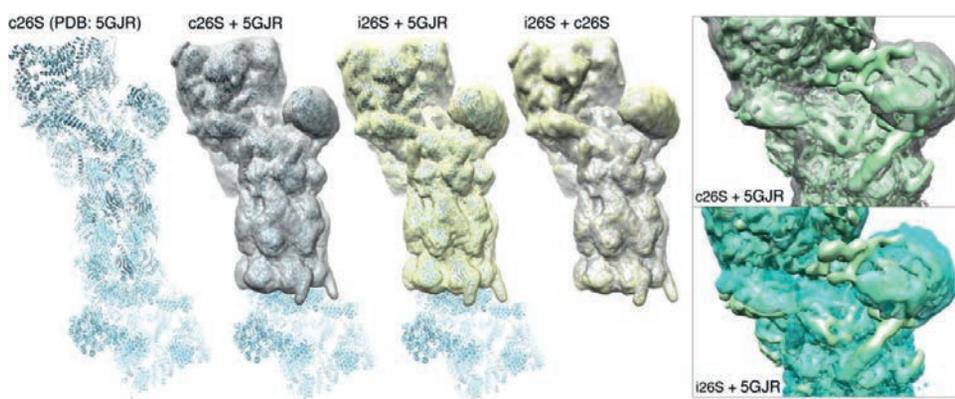


**Рис. 4.** Результат анализа локального разрешения в случае конститутивной c26S (а) и иммунной i26S (б) форм протеасомной субчастицы, а также распределение проекций 26S в соответствии с найденными угловыми ориентациями. Для визуализации локального разрешения использованы крио-ЭМ-карты, полученные с помощью 3D Flexible Refinement и дополнительно обработанные с помощью DeepEMhancer. Показаны боковой вид, центральный срез и вид сверху.

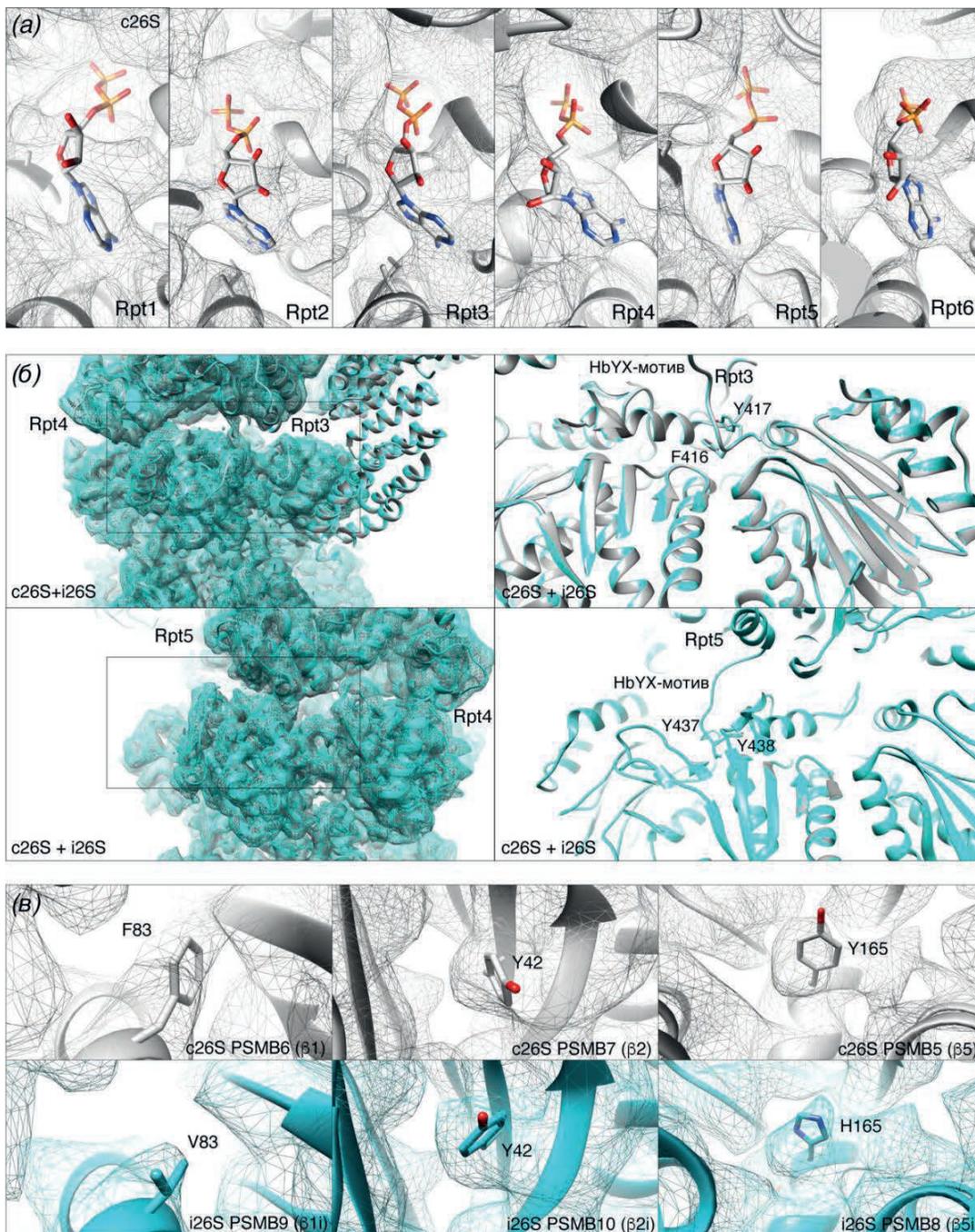
лексов не выявил значимых различий с референсной структурой 26S протеасомы человека [26] (рис. 5). Анализ электронной плотности в субстрат-связывающих карманах гексамерного АТФазного кольца подтвердил наличие всех шести молекул АТФ в связанном состоянии в обоих комплексах (рис. 6а), а также закоривание НbУХ-мотивов субъединиц Rpt3 и Rpt6 в гидрофобные полости гептамерного  $\alpha$ -кольца (рис. 6б). В иммунопротеасоме конститутивные каталитические субъединицы  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$  под действием  $\text{IFN}\gamma$  заменяются на  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  и  $\beta 5i$ . Мы подтвердили наличие иммуносубъединиц в протеасоме, выделенной из клеток HeLa, предварительно обработанных  $\text{IFN}\gamma$ ,

на основании изменения электронной плотности (рис. 6в) в положениях характеристических аминокислотных остатков протеасомы иммунного фенотипа [27].

Сравнительный анализ проксимального (непосредственно взаимодействующего с 19S регуляторной субчастицей) и аксиального (удаленного) гептамерного  $\alpha$ -кольца выявил кооперативный сдвиг *N*-концевых областей  $\alpha$ -субъединиц в структуре иммунопротеасомы в сравнении с протеасомой конститутивного фенотипа (рис. 7). *N*-Концевые фрагменты субъединиц PSMA1, PSMA4 и PSMA6 поступательно сместились в направлении субъединицы PSMA2. Визуализация электронной



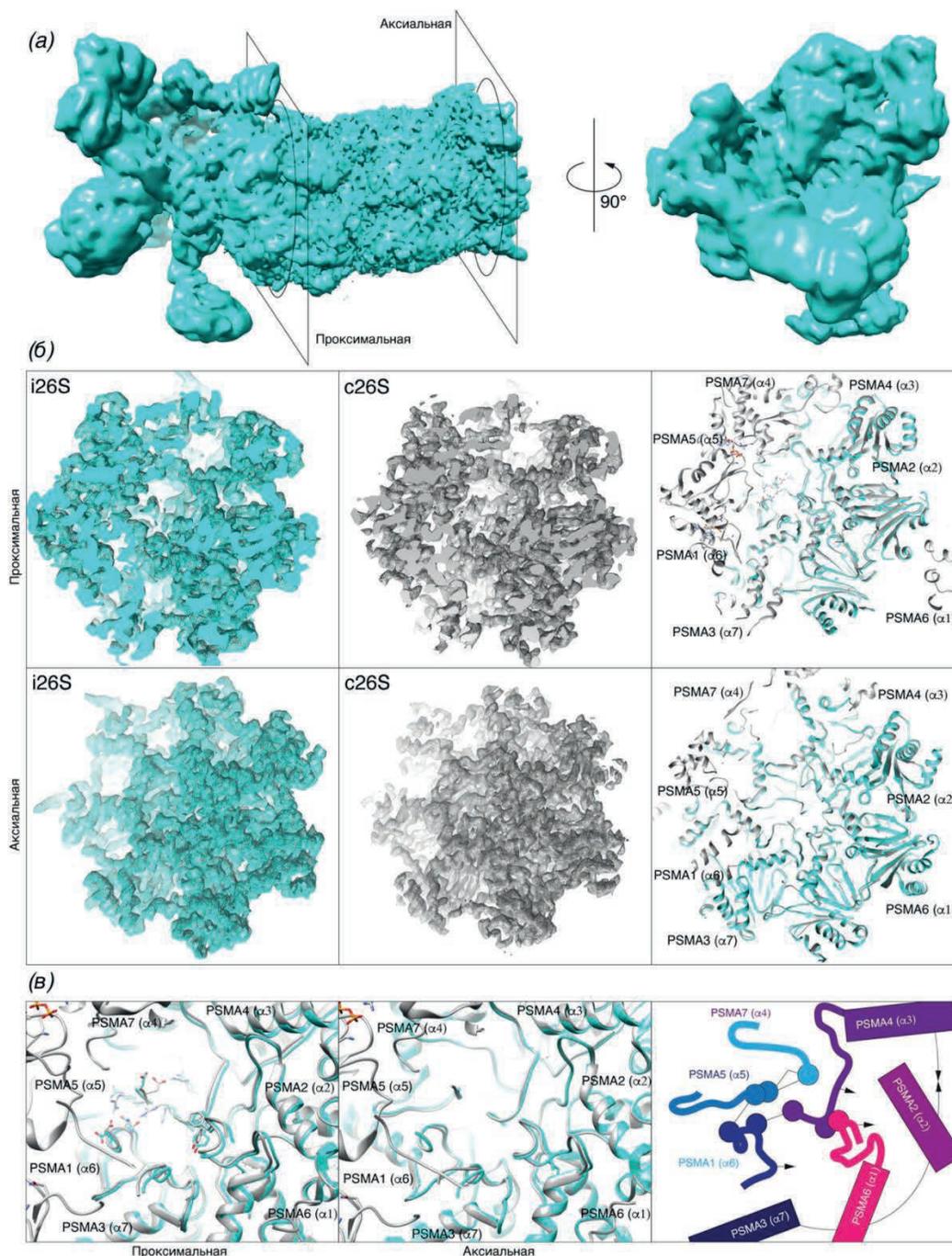
**Рис. 5.** Сравнительный анализ глобальной структуры 26S протеасомы человека в конститутивной (c26S) и иммунной (i26S) формах. Структура 26S протеасомы человека PDB 5GJR дана в качестве референса.



**Рис. 6.** (а) – Анализ электронной плотности в субстрат-связывающих карманах гексамерного АТФазного кольца; (б) – закрепление HbYX-мотивов субъединиц Rpt3 и Rpt6 в гидрофобные полости гептамерного  $\alpha$ -кольца; (в) – присутствие иммуносубъединиц в протеасоме, изолированной из клеток HeLa, предварительно обработанных IFN $\gamma$ , на основании изменения электронной плотности в положениях характеристических аминокислотных остатков протеасомы иммунного фенотипа.

плотности проксимального  $\alpha$ -кольца в области входа во внутреннюю камеру каталитической 20S субчастицы выявила снижение стерической затрудненности в центральном канале иммунопротеасомы в сравнении с конститутивной

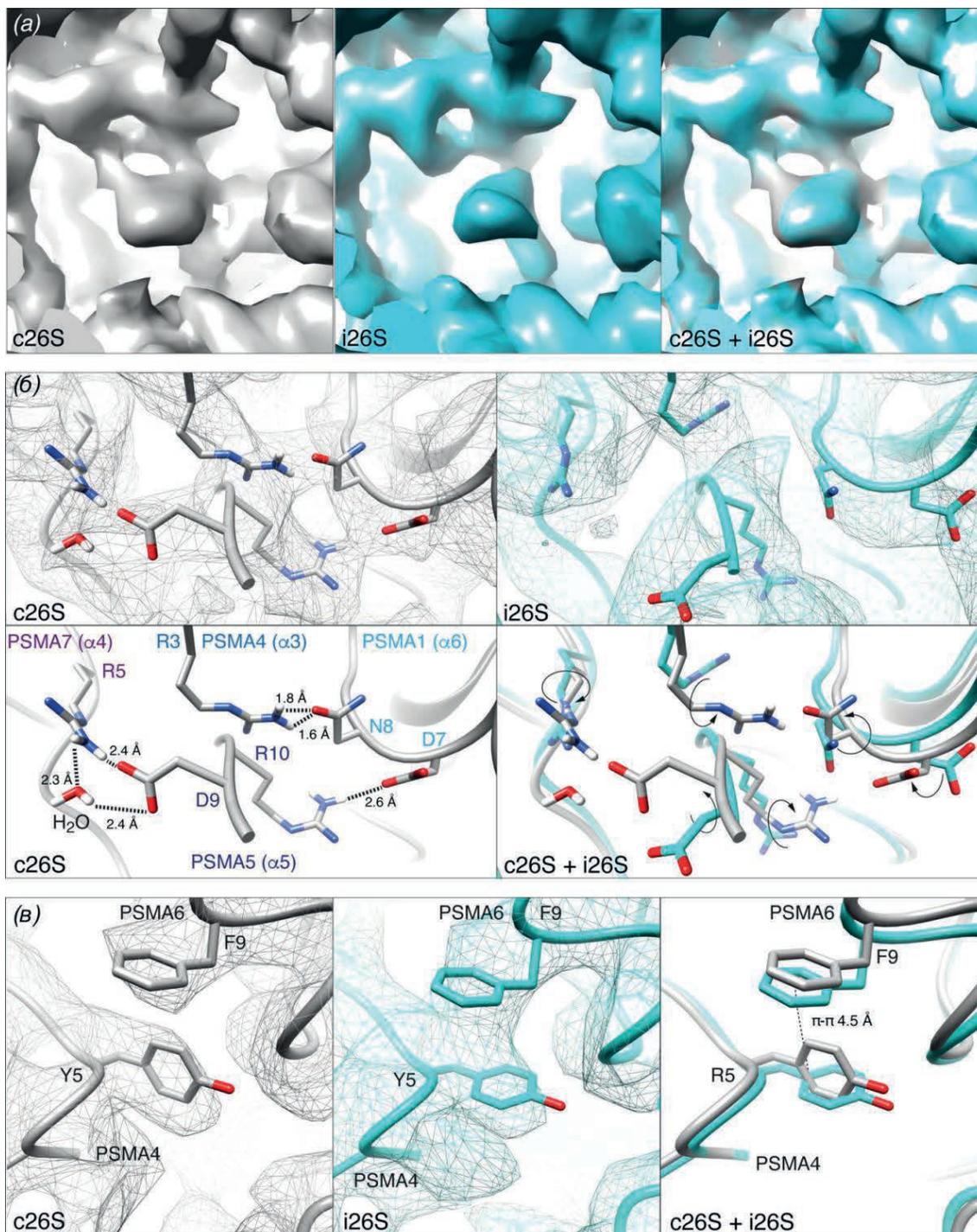
формой (рис. 8а). Подобный эффект вызван разобщением системы ионных связей, наблюдаемой в случае конститутивной протеасомы, между аминокислотными остатками Arg5 субъединицы PSMA7 и аспаратом субъединицы



**Рис. 7.** Сравнительный анализ проксимального (непосредственно взаимодействующего с 19S регуляторной субчастицей) и аксиального (удаленного) гептамерного  $\alpha$ -кольца (а) *N*-концевых областей  $\alpha$ -субъединиц в структуре иммунопротеасомы в сравнении с протеасомой конститутивного фенотипа (б); (в) – кооперативный сдвиг *N*-концевых фрагментов субъединиц PSMA1, PSMA4 и PSMA6 в направлении субъединицы PSMA2.

PSMA5 в положении 9, Arg10 субъединицы PSMA5 и Asp7 субъединицы PSMA1, а также аспарагина субъединицы PSMA1 в положении 8 и Arg3 субъединицы PSMA4 в структуре иммунопротеасомы (рис. 8б). При этом наблюдаемый сдвиг *N*-концевых последова-

тельств субъединиц PSMA способствует образованию  $\pi$ - $\pi$ -укладки между остатками Trp5 и Phe9 субъединиц PSMA4 и PSMA6 соответственно, что, в свою очередь, фиксирует их *N*-концевые фрагменты в удалении от центрального канала (рис. 8в).



**Рис. 8.** (а) – Визуализация электронной плотности проксимального  $\alpha$ -кольца в области входа во внутреннюю камеру каталитической 20S субчастицы; (б) – разобщение системы ионных связей, наблюдаемой в случае конститутивной протеасомы, между аминокислотными остатками Arg5 PSMA7 и Asp9 PSMA5, Arg10 PSMA5 и Asp7 PSMA1, а также Asn8 PSMA1 и Arg3 PSMA4 в структуре иммунопротеасомы; (в) – образование  $\pi$ - $\pi$ -укладки между остатками Tyr5 и Phe9 субъединиц PSMA4 и PSMA6.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Выделение и очистка препаратов протеасомы с различным каталитическим фенотипом.**

Клетки HeLa (аденокарцинома шейки матки человека) были получены из исследовательского центра “Коллекция культур клеток позвоночных” Института цитологии РАН. Клеточные линии млекопитающих культивировали в среде DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США). В среду добавляли 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) и 1% антибиотика-антимикотика (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США). Клеточные линии культивировали в инкубаторе с постоянным увлажнением при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Все клеточные культуры рутинно тестировали на наличие микоплазмы при помощи набора MycoReport (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Получение стабильных клеточных линий HeLa, сверхэкспрессирующих субъединицу протеасомы человека PSMD14 с тегом НТВН, а также выделение препаратов протеасомы проводили согласно ранее опубликованной методике [28]. Для индукции экспрессии иммуносубъединиц клетки HeLa перед выделением протеасомы обрабатывали IFN $\gamma$  (Фармаклон, Россия) в дозировке 400 U/мл и инкубировали в течение 96 ч.

**Подготовка образцов для крио-ЭМ.** Для подготовки образцов для крио-ЭМ использовали медные сетки Quantifoil R1.2/1.3 400 mesh (Lot #211014, Quantifoil Micro Tools GmbH, Германия), имеющие основную углеродную подложку толщиной 10–12 нм с массивом регулярных отверстий диаметром 1.2 мкм и периодом 2.5 мкм, а также тонкую (толщина < 1 нм) подложку из оксида графена, нанесенную сверху. Перед использованием сетки хранили в вакуумном эксикаторе при комнатной температуре и давлении 0.9 МПа, что обеспечивает достаточную гидрофильность поверхности подложки. Чтобы сохранить целостность подложки и исключить дополнительное влияние на ориентацию частиц при взаимодействии с поверхностью подложки, сетки не были предварительно обработаны в тлеющем разряде. Подготовленные препараты 26S протеасомных субчастиц с концентрацией 0.9 мг/мл и объемом 3 мкл в буфере 30 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ АТФ, 1 мМ ТСЕР наносили на сетки в камере установки для витрификации Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США) при следующих параметрах: степень сжатия при промакивании (blot force) – 0 усл. ед., время промакивания (blot time) – 3 с,

температура в камере – 4°C, относительная влажность в камере – 100%. После удаления излишков сетки с тонким слоем препарата быстро погружали в жидкий этан, за счет чего обеспечивали условия витрификации (образование слоя аморфного льда с препаратом).

**Криоэлектронная микроскопия препаратов 26S конститутивной и 26S иммунопротеасомы.**

Подготовленные сетки препаратов протеасомы и иммунопротеасомы были перенесены в жидком азоте в криоэлектронный просвечивающий микроскоп Titan Krios 60-300 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенный источником полевой эмиссии электронов типа Шоттки (FEI XFEG, Нидерланды), корректором сферических aberrаций (CEOS GmbH, Германия) и КМОП (CMOS) устройством прямого детектирования электронов Falcon II (Thermo Fisher Scientific, США). В автоматическом режиме с помощью программного обеспечения EPU (версия 1.9.1.16REL; Thermo Fisher Scientific, США) получено 1106 и 1130 наборов изображений для конститутивной и иммунной формы 26S протеасомных субчастиц соответственно, детектируемых в течение времени экспозиции 3 с. Микроскоп работал при ускоряющем напряжении 300 кВ, номинальном увеличении 37 000 $\times$  и соответствующем калиброванном размере пикселя 1.8 Å на уровне образца, объективной линзой в режиме дефокусировки с номинальными значениями в интервале от –0.8 до –2.5 мкм с шагом 0.2 мкм и величиной суммарной дозы 60 e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup>, равномерно распределенной по стеку изображений из 20 кадров. Основные параметры эксперимента сведены в табл. 1.

Исходные данные криоэлектронной микроскопии в данном случае представляли собой стек (набор) из 20 изображений-кадров, полученных за время экспонирования одной области образца и объединенных в единый MRC-файл [29]. Предобработку данных выполняли с помощью программного обеспечения Warp (версия 1.0.9) [30]. Стек изображений был условно разбит на 5  $\times$  5 локальных областей, для каждой из которых оценивали локальное значение дрейфа образца и дефокусировки, таким образом достигалось более точное моделирование функции передачи контраста. Поиск координат проекций частиц на скорректированных изображениях производили с помощью предобученной сверточной нейронной сети VoxNet2Mask\_20180918. Для более точного распознавания частиц было проведено три раунда переобучения с помощью случайных выборок из 10 изображений с различной дефокусировкой.

**Таблица 1.** Параметры подготовки образцов, обработки данных и разрешения криоэлектронных структур конститутивной и иммунной 26S протеасомы человека

Подготовка образцов				
Сетки (производитель, тип основания, диаметр отверстий в мкм/расстояние между отверстиями в мкм основной подложки, тип верхнего слоя)		Quantifoil, 400 mesh (Cu), R1.2/1.3, Graphene oxide		
Концентрация, мг/мл		0.9		
Установка для витрификации		Vitrobot Mark IV		
Параметры витрификации (blot time, blot force, температура, влажность)		0 усл. ед., 3 с, 4°C, 100%		
Сбор данных				
ПЭМ		Titan Krios		
Детектор		Falcon II		
Ускоряющее напряжение, кВ		300		
Номинальное увеличение		37 000×		
Размер пикселя, Å		1.8		
Номинальный интервал дефокусировки, мкм		от -0.8 до -2.5		
Суммарная доза за время экспозиции, $e^-/\text{Å}^2$		60		
Время экспозиции, с		5		
Размер стека изображений		20		
Доза на одно изображение в стеке, $e^-/\text{Å}^2$		3		
Диаметр объективной апертуры, мкм		100		
Обработка данных	Конститутивная (c26S)		Иммунная (i26S)	
Исходное количество стеков изображений	1106		1130	
Размер бокса, пкс	400		400	
Исходное количество проекций	239 705		146 134	
Количество проекций 26S субчастиц	81 714		45 782	
Код депонирования в EMDB	EMD-19571		EMD-19572	
Разрешение (c26S)	19S (local)	20S (local)	26S (global)	26S (3D flex)
Итоговое разрешение (FSC <sub>0.5</sub> ), Å	6.64	3.88	4.08	4.17
Итоговое разрешение (FSC <sub>0.143</sub> ), Å	4.43	3.6*	3.68	3.6*
Разрешение (i26S)	19S (local)	20S (local)	26S (global)	26S (3D flex)
Итоговое разрешение (FSC <sub>0.5</sub> ), Å	6.89	3.90	4.17	4.25
Итоговое разрешение (FSC <sub>0.143</sub> ), Å	4.51	3.6*	3.68	3.6*

\* Уточнение крио-ЭМ-карт достигло предельно возможного разрешения при данном физическом размере пикселя исходного изображения с учетом выбранного порогового значения FSC (рис. 4).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании впервые была определена структура 26S иммунопротеасомы человека с использованием криоэлектронной микроскопии с разрешением 3.6 Å с последующим проведением сравнительного анализа данной структуры с 26S протеасомой конститутивного фенотипа при том же разрешении. Транслокация субстрата в каталитическую полость – одна из ключевых и времязатратных стадий гидролиза белков 26S протеасомой. Так, известно, что мутантные варианты протеасомы с делетированным N-концевым участком субъединицы  $\alpha 3$  проявляют повышенную активность по гидролизу как низкомолекулярных субстратов *in vitro*, так и белков непосредственно в клетках [31]. В научной литературе имеется ряд свидетельств, что 26S иммунопротеасома гидролизует клеточные субстраты быстрее [32]. Данное наблюдение было подтверждено в отношении основных белков [33, 34] и потенциально связано с захватом положительно заряженных субстратов иммунопротеасомами с регуляторными субчастицами PA28 [35, 36]. Также известно об альтернативной укладке каталитических иммуносубъединиц в  $\beta$ -гептамерном кольце и структурно различном механизме активации 20S конститутивной и иммунной протеасомы комплексами типа PA28 [27]. Суммируя данные наблюдения с нашими результатами, можно предположить, что аллостерический эффект каталитических иммуносубъединиц, находящихся непосредственно под внешним  $\alpha$ -кольцом, приводит к большему разведению N-концевых фрагментов  $\alpha$ -субъединиц при присоединении регуляторной 19S субчастицы и, в свою очередь, возникновения у 26S иммунопротеасомы “преактивационного” фенотипа.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Экспериментальная часть работы была выполнена на оборудовании Ресурсного центра зондовой и электронной микроскопии (Курчатовский комплекс НБИКС-технологий, НИЦ “Курчатовский институт”).

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено в рамках гранта Российского научного фонда № 23-74-00053 “Молекулярные механизмы действия модуляторов активности протеасомы химической и белковой природы”.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ciechanover A.* // Best Pract. Res. Clin. Haematol. 2017. V. 30. P. 341–355.  
<https://doi.org/10.1016/j.beha.2017.09.001>
2. *Kudriaeva A.A., Livneh I., Baranov M.S., Zigan-shin R.H., Tupikin A.E., Zaitseva S.O., Kabilov M.R., Ciechanover A., Belogurov A.A., Jr.* // Cell Chem. Biol. 2021. V. 28. P. 1192–1205.  
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.02.009>
3. *Chau V., Tobias J.W., Bachmair A., Marriott D., Ecker D.J., Gonda D.K., Varshavsky A.A.* // Science. 1989. V. 243. P. 1576–1583.  
<https://doi.org/10.1126/science.2538923>
4. *Ciechanover A., Heller H., Katz-Etzion R., Hershko A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 761–765.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.78.2.761>
5. *Arrigo A.P., Tanaka K., Goldberg A., Welch W.* // Nature. 1988. V. 331. P. 192–194.  
<https://doi.org/10.1038/331192a0>
6. *Lander G.C., Estrin E., Matyskiela M.E., Bashore C., Nogales E., Martin A.* // Nature. 2012. V. 482. P. 186–191.  
<https://doi.org/10.1038/nature10774>
7. *Deveraux Q., Ustrell V., Pickart C., Rechsteiner M.* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 7059–7061.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37244-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37244-7)
8. *Smith D.M., Kafri G., Cheng Y., Ng D., Walz T., Goldberg A.L.* // Mol. Cell. 2005. V. 20. P. 687–698.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.019>
9. *Verma R., Aravind L., Oania R., McDonald W.H., Yates J.R., 3rd, Koonin E.V., Deshaies R.J.* // Science. 2002. V. 298. P. 611–615.  
<https://doi.org/10.1126/science.1075898>
10. *de la Peña A.H., Goodall E.A., Gates S.N., Lander G.C., Martin A.* // Science. 2018. V. 362. P. eaav0725.  
<https://doi.org/10.1126/science.aav0725>
11. *Kudriaeva A.A., Belogurov A.A.* // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. P. S159–S192.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297919140104>
12. *Chapiro J., Claverol S., Piette F., Ma W., Stroobant V., Guillaume B., Gairin J.E., Morel S., Bulet-Schiltz O., Monsarrat B., Boon T., Van den Eynde B.J.* // J. Immunol. 2006. V. 176. P. 1053–1061.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.2.1053>
13. *Chen W., Norbury C.C., Cho Y., Yewdell J.W., Ben-nink J. R.* // J. Exp. Med. 2001. V. 193. P. 1319–1326.  
<https://doi.org/10.1084/jem.193.11.1319>
14. *Sijts E.J., Kloetzel P.M.* // Cell. Mol. Life Sci. 2011. V. 68. P. 1491–1502.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-011-0657-y>

15. Husnjak K., Elsasser S., Zhang N., Chen X., Randles L., Shi Y., Hofmann K., Walters K.J., Finley D., Dikic I. // *Nature*. 2008. V. 453. P. 481–488.  
<https://doi.org/10.1038/nature06926>
16. Shi Y., Chen X., Elsasser S., Stocks B.B., Tian G., Lee B.H., Shi Y., Zhang N., de Poot S.A., Tuebing F., Sun S., Vannoy J., Tarasov S.G., Engen J.R., Finley D., Walters K.J. // *Science*. 2016. V. 351. P. aad9421.  
<https://doi.org/10.1126/science.aad9421>
17. Matyskiela M.E., Lander G.C., Martin A. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. P. 781–788.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2616>
18. Punjani A., Rubinstein J.L., Fleet D.J., Brubaker M.A. // *Nat. Methods*. 2017. V. 14. P. 290–296.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4169>
19. Punjani A., Zhang H., Fleet D.J. // *Nat. Methods*. 2020. V. 17. P. 1214–1221.  
<https://doi.org/10.1038/s41592-020-00990-8>
20. van Heel M., Schatz M. // *J. Struct. Biol.* 2005. V. 151. P. 250–262.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.05.009>
21. Rosenthal P.B., Henderson R. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 333. P. 721–745.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.07.013>
22. Zivanov J., Nakane T., Scheres S.H.W. // *IUCrJ*. 2019. V. 6. P. 5–17.  
<https://doi.org/10.1107/S205225251801463X>
23. Punjani A., Fleet D.J. // *Nat. Methods*. 2023. V. 20. P. 860–870.  
<https://doi.org/10.1038/s41592-023-01853-8>
24. Cardone G., Heymann J.B., Steven A.C. // *J. Struct. Biol.* 2013. V. 184. P. 226–236.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.08.002>
25. Forsberg B.O., Shah P.N.M., Burt A. // *Nat. Commun.* 2023. V. 14. P. 5802.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-41478-1>
26. Huang X., Luan B., Wu J., Shi Y. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. V. 23. P. 778–785.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb.3273>
27. Chen J., Wang Y., Xu C., Chen K., Zhao Q., Wang S., Yin Y., Peng C., Ding Z., Cong Y. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 739.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-21028-3>
28. Saratov G.A., Vladimirov V.I., Novoselov A.L., Ziganshin R.H., Chen G., Baymukhametov T.N., Konevega A.L., Belogurov A.A., Jr., Kudriaeva A.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 2091.  
<https://doi.org/10.3390/ijms24032091>
29. Cheng A., Henderson R., Mastronarde D., Ludtke S.J., Schoenmakers R.H., Short J., Marabini R., Dallakyan S., Agard D., Winn M. // *J. Struct. Biol.* 2015. V. 192. P. 146–150.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.04.002>
30. Tegunov D., Cramer P. // *Nat. Methods*. 2019. V. 16. P. 1146–1152.  
<https://doi.org/10.1038/s41592-019-0580-y>
31. Choi W.H., de Poot S.A., Lee J.H., Kim J.H., Han D.H., Kim Y.K., Finley D., Lee M.J. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 10963.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms10963>
32. Seifert U., Bialy L.P., Ebstein F., Bech-Otschir D., Voigt A., Schröter F., Prozorovski T., Lange N., Steffen J., Rieger M., Kuckelkorn U., Aktas O., Kloetzel P.M., Krüger E. // *Cell*. 2010. V. 142. P. 613–624.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.036>
33. Raule M., Cerruti F., Cascio P. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1843. P. 1942–1947.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.005>
34. Kuzina E.S., Chernolovskaya E.L., Kudriaeva A.A., Zenkova M.A., Knorre V.D., Surina E.A., Ponomarenko N.A., Bobik T.V., Smirnov I.V., Bacheva A.V., Belogurov A.A., Gabibov A.G., Vlasov V.V. // *Dokl. Bio. Bioph.* 2013. V. 453. P. 300–303.  
<https://doi.org/10.1134/S1607672913060070>
35. Kudriaeva A., Kuzina E.S., Zubenko O., Smirnov I.V., Belogurov A., Jr. // *FASEB J.* 2019. V. 33. P. 6852–6866.  
<https://doi.org/10.1096/fj.201802237R>
36. Belogurov A., Jr., Kuzina E., Kudriaeva A., Kononikhin A., Kovalchuk S., Surina Y., Smirnov I., Lomakin Y., Bacheva A., Stepanov A., Karpova Y., Lyupina Y., Kharybin O., Melamed D., Ponomarenko N., Sharova N., Nikolaev E., Gabibov A. // *FASEB J.* 2015. V. 29. P. 1901–1913.  
<https://doi.org/10.1096/fj.14-259333>

# The 3.6 Å Cryo-EM Structure of the Outer Heptameric $\alpha$ -Ring of Human 26S Immunoproteasome in the Preactivation State

G. A. Saratov\*, T. N. Baymukhametov\*\*, A. L. Konevega\*\*, \*\*\*, \*\*\*\*, A. A. Kudriaeva\*, and A. A. Belogurov, Jr.\*, \*\*\*, \*\*\*, #

# Phone: +7 (495) 335-22-88; e-mail: belogurov@ibch.ru

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

\*\* National Research Center, “Kurchatov Institute”, pl. Academica Kurchatova 1, Moscow, 123182 Russia

\*\*\* Petersburg Nuclear Physics Institute Named by B.P. Konstantinov of National Research Centre,  
Kurchatov Institute,

mc: Orlova Roshcha 1, Gatchina, 188300 Russia

\*\*\*\* Institute of Biomedical Systems and Biotechnologies, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University,  
ul. Politekhnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia

\*\*\*\*\* Department of Biological Chemistry, Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry,  
ul. Delegatskaya 20/1, Moscow, 127473 Russia

The 26S proteasome is a unique multicatalytic proteinase complex, together with a ubiquitination system, providing controlled degradation of most intracellular eukaryotic proteins. The problem of studying the proteasome is the multiplicity of its intracellular forms, which are formed due to the modularity of the proteasome assembly process. In this study, using cryoelectron microscopy, we described for the first time the structure of the 26S human immunoproteasome in comparison with its constitutive form with a resolution of 3.6 Å. A detailed analysis of the structural features of the two complexes revealed the opening of the entrance in the outer heptameric 20S ring of the immunoproteasome subunit due to the separation of the *N*-terminal regions of the PSMA4 and PSMA5 subunits and the formation of a  $\pi$ – $\pi$  stacking between the amino acid residues Tyr5 and Phe9 of the PSMA5 and PSMA6 subunits, respectively. The revealed removal of steric obstruction in the central channel of the 20S subunit may indicate the preactivation phenotype of the 26S human immunoproteasome, even in the absence of a bound substrate.

*Keywords: proteasome, immunoproteasome, cryoelectron microscopy*



УДК 631.417.2

# ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ ФРАКЦИЙ ПРИРОДНЫХ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ – КЛЮЧ К РАЗГАДКЕ ИХ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

© 2024 г. О. Е. Трубецкая\*, #, О. М. Селиванова\*\*,  
В. В. Рогачевский\*\*\*, О. А. Трубецкой\*\*\*\*

\* Филиал ФГБУН “Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,  
Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 6

\*\* ФГБУН “Институт белка” РАН, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 4

\*\*\* ФГБУН “Институт биофизики клетки” РАН, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 3

\*\*\*\* ФГБУН “Институт фундаментальных проблем биологии” РАН, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 2

Поступила в редакцию 22.11.2023 г.

После доработки 05.12.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2023 г.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) с негативным контрастированием препаратов раствором уранилацетата была использована для изучения морфологических различий между почвенными гуминовыми кислотами (ГК) и их фракциями А, В и С + D, полученными сочетанием препаративной эксклюзивной хроматографии низкого давления и аналитического электрофореза в полиакриламидном геле. Электрофоретическая подвижность фракций изменялась в порядке  $C + D > B > A$ . Анализ распределения различных морфологических элементов между фракциями показал, что крупные структуры типа везикулоподобных образований длиной 70–150 нм и шириной 30–80 нм с четкими краями были обнаружены исключительно во фракции А и занимали ~55% площади ПЭМ-изображений. С другой стороны, длинные фибриллы длиной 60–100 нм, шириной 4–6 нм и толщиной 2–3 нм, а также их пучки длиной >150 нм и диаметром 30–70 нм были идентифицированы только во фракции С + D и занимали ~59% площади ПЭМ-изображений. Более мелкие морфологические элементы, такие как точечные частицы диаметром 2–3 нм, кольцевые частицы диаметром 4–6 нм, червеподобные короткие частицы длиной 20–30 нм и сфериды диаметром 10–30 нм, наблюдали во всех образцах, но в различном количестве. Значительные морфологические различия между фракциями могут быть объяснены их составом, установленным ранее с помощью комплекса физико-химических методов. Отношение  $S_{аром}(165–108 \text{ м.д.})/S_{алиф}(10–0 \text{ м.д.})$ , или индекс ароматичности, рассчитанный на основании  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, является одним из вероятных показателей формирования различных морфологических структур. Полученные результаты дают визуальное представление о морфологических особенностях почвенных ГК и фракций, доказывая их супрамолекулярную организацию.

*Ключевые слова:* почвенные гуминовые кислоты, электрофорез в полиакриламидном геле, эксклюзивная хроматография, просвечивающая электронная микроскопия, физико-химические характеристики, супрамолекулярная организация

DOI: 10.31857/S0132342324030118, EDN: NYSDGM

## ВВЕДЕНИЕ

Гуминовые вещества (ГВ) представляют собой сложный, устойчивый к разложению комплекс разнообразных органических соединений, формирующийся в почвах и природных водах в результате деструкции отмерших растительных,

животных и микробных остатков [1–3]. Одно из важнейших свойств природных ГВ – высокое содержание функциональных кислородных групп, главным образом карбоксильных и фенольных. Экстрагируемые из природных образцов ГВ разделяются на гуминовые кислоты (ГК) и фульвокислоты (ФК), различающиеся по их растворимости

Сокращения: ГВ – гуминовые вещества; ГК – гуминовые кислоты; ИА – индекс ароматичности; пиролиз/ГХ/МС – пиролиз, сопряженный с газовой хроматографией и масс-спектрометрией; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; ФК – фульвокислоты; ЭП – электрофоретическая подвижность; ЭПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле; ЭХ – эксклюзивная хроматография низкого давления;  $V_e$  – объем элюции.

# Автор для связи: (эл. почта: olegi03@yahoo.com).

в щелочных и кислых водных растворах (ФК растворимы при любых значениях pH, а ГК растворимы в щелочных растворах и полностью выпадают в осадок при  $\text{pH} < 2$ ) [1, 4]. Запасы углерода в составе почвенных ГВ в 3 раза превышают его суммарное количество в виде атмосферного  $\text{CO}_2$  и всей растительности, покрывающей планету [5]. Являясь обязательным и стабильным компонентом почв и природных вод, ГВ в значительной мере влияют на основные физико-химические свойства экосистем, обеспечивая большинство токсикопротекторных функций, связывая и инактивируя пестициды, тяжелые металлы, полициклические углеводороды и другие загрязнения [4]. Сравнительно недавно была обнаружена важнейшая функция ГВ – деградация или трансформация органических загрязняющих веществ с использованием энергии солнечного света, т.е. сенсibilизированный фотолиз загрязнений [6]. Убедительно продемонстрировано влияние ГВ на рост и ассимиляцию растениями минеральных питательных макро- и микроэлементов, что создает фундаментальную основу для разработки гуминовых удобрений [7–9]. В отличие от подавляющего большинства индивидуальных органических соединений, поглощение солнечной энергии гуминовыми веществами увеличивается экспоненциально с уменьшением длины волны облучающего света, обеспечивая защиту живых организмов от воздействия ультрафиолетовой радиации в атмосфере и на суше [10, 11]. В последнее время доказано, что ГВ, будучи самым большим природным резервуаром углерода на Земле, являются одним из определяющих источников парниковых газов (углекислого газа и метана) и связанного с ними глобального потепления климата планеты [3, 12, 13]. В какой-то степени парадоксально, что несмотря на столь многочисленные экологически значимые функции, до сих пор не существует единого мнения ни о механизмах образования, ни о принципах строения ГВ. Все предложенные модели ГВ имеют гипотетический характер, отражая в той или иной мере экспериментальные данные и уровень развития техники на момент исследования.

До 1980-х гг. доминировала макромолекулярная концепция, подразумевающая строение ГВ в виде гетерополимера, основной структурной и функциональной частью которого считали устойчивое к разложению уникальное ароматическое полимерное ядро, к которому с помощью ковалентных связей присоединены белковые и углеводные фрагменты [1, 4, 14–17]. В последней четверти прошлого столетия в связи с широким использованием различных вариантов ЯМР и пиролизической газовой хроматографии/масс-

спектроскопии было сделано одно из наиболее выдающихся открытий в области химии гумуса, а именно обнаружение в составе ГВ наряду с ароматическими, углеводными и белковыми компонентами значительного количества алифатических длинноцепочечных углеводородных фрагментов, содержание которых в некоторых образцах достигало 30–40% общего веса ГВ [18–21].

Обнаружение существенной весовой доли индивидуальных амфифильных насыщенных или ненасыщенных монокарбоновых жирных кислот привело к возникновению супрамолекулярной концепции структурной организации ГВ. Термин супрамолекулярная (надмолекулярная) химия введен лауреатом Нобелевской премии по химии 1987 г. Жаном-Мари Леном и определен как “химия, описывающая сложные образования, являющиеся результатом ассоциации двух (или более) химических частиц, связанных вместе межмолекулярными нековалентными связями” [22]. Одну из первых моделей строения природных ГВ, которую можно отнести к супрамолекулярной, предложил R.L. Wershaw [23], назвав ее мембрано-мицеллярной. Согласно этой модели, ГВ представляют собой не макромолекулу (гетерополимер), а мембраноподобную (на поверхности минералов) или мицеллоподобную (в водном растворе) структуру, состоящую как из реально существующих амфифильных молекул – длинных монокарбоновых жирных кислот, так и “универсальных амфифилов”, которые образуются в процессе деполимеризации и окисления природных растительных и животных биополимеров – белков, полисахаридов, лигнинов, восков и др. Эта концепция не была принята научным сообществом в связи с отсутствием прямых экспериментальных данных о формировании таких “универсальных амфифилов”. Развитие супрамолекулярной теории строения ГВ получило в работах А. Piccolo [24], предположившего, что крупные гуминовые агрегаты формируются за счет случайных гидрофобных, водородных и других нековалентных связей между небольшими органическими молекулами, образующимися в результате деградации отмерших растительных и животных остатков. Однако его экспериментальные работы вызвали ряд обоснованных вопросов и замечаний, т.к. могли быть объяснены как с точки зрения макромолекулярного, так и супрамолекулярного подходов. В работах A.J. Simpson et al. [25, 26] с помощью многомерных ЯМР-экспериментов для нескольких почвенных ГВ было показано существование независимых полисахаридных, полипептидных, лигниновых и углеводородных цепочек, объединенных, так же как и у А. Piccolo,

случайным образом в супрамолекулярный комплекс, но с помощью металлических мостиков.

Однако для подтверждения супрамолекулярной концепции в настоящий момент все еще недостаточно убедительных экспериментальных данных. Учитывая тот факт, что ГВ – “природный монстр”, включающий множество органических соединений различной природы [27], логично было бы исследовать более простые, но стабильные составляющие ГВ (т.е. фракции), различающиеся по одному или нескольким четко определенным физико-химическим параметрам.

Ранее нами был разработан эффективный метод фракционирования природных ГВ различного происхождения, основанный на сочетании препаративной эксклюзивной хроматографии низкого давления на колонке с сефадексом G-75 (ЭХ) и аналитического электрофореза в 10%-ном ПААГ (ЭПААГ) [28]. Электрофорез применяли для анализа хроматографического профиля с целью отбора индивидуальных фракций, различающихся электрофоретической подвижностью (ЭП). Оригинальность и преимущество сочетания ЭХ–ЭПААГ состоит в том, что подвижная фаза ЭХ и буфер полиакриламидного геля (ПААГ) содержали 7 М мочевины, разрывающую водородные связи, предотвращая взаимодействие ГВ как с сефадексом, так и с ПААГ. Одновременно должна происходить дезагрегация ассоциатов ГВ, состоящих из объединенных водородными связями отдельных органических компонентов. Использование сочетания методов ЭХ–ЭПААГ впервые позволило получить из ГВ различного происхождения препаративные количества стабильных электрофоретических фракций, которые в течение последних 25 лет были исследованы нами с использованием как рутинных, так и современных аналитических методов, что подтвердило их контрастные физико-химические свойства и химический состав [29–34]. Между тем выявление морфологических отличий (если таковые существуют) между электрофоретическими фракциями могло бы стать переломным моментом в понимании структурной организации ГВ.

С середины прошлого века исследование морфологии коллоидных частиц ГВ проводили с помощью различных методов электронной микроскопии, среди которых наиболее информативной оказалась просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) [35–39]. Было обнаружено, что в зависимости от концентрации препаратов, ионной силы и рН растворов, ГВ склонны формировать разнообразные морфологические структуры, такие как сфероиды и их агрегаты, длинные фибриллы и их пучки, а также плоские листообразные образования. Однако взаимосвязь

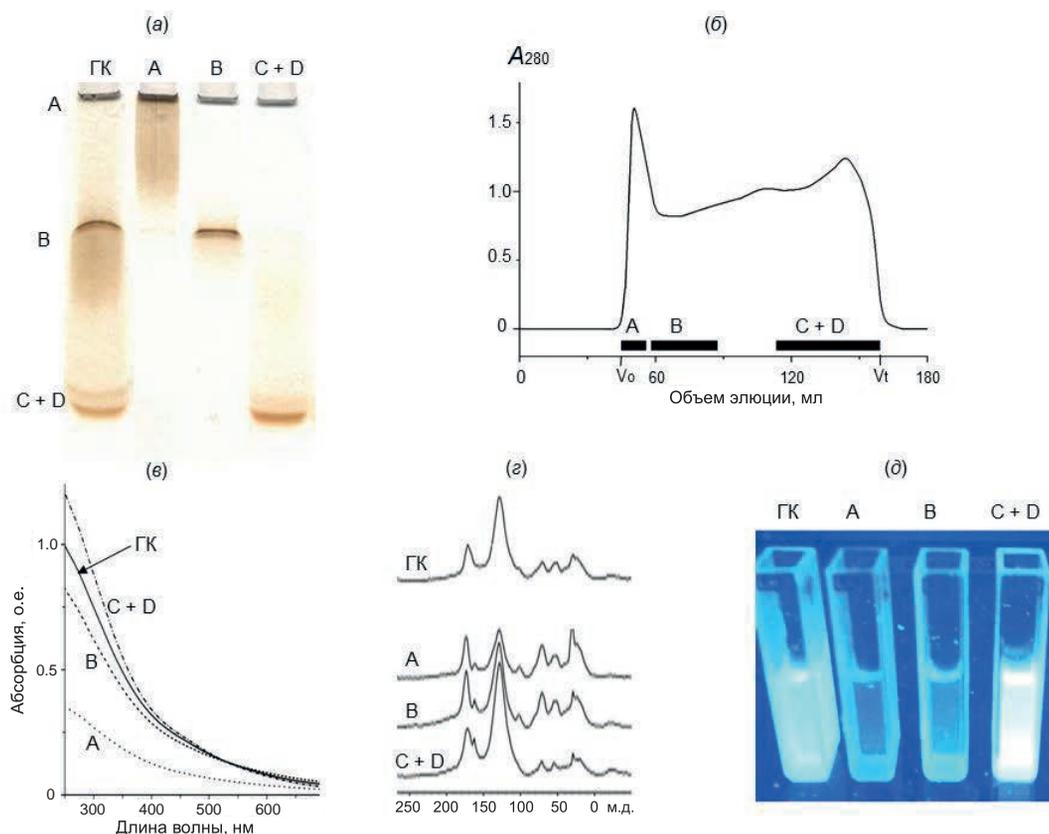
между обнаруженными морфологическими структурами и физико-химическими характеристиками препаратов ГВ (молекулярный размер, индекс ароматичности, оптические и флуоресцентные характеристики, содержание функциональных групп и др.) обнаружено не было. Следует отметить, что электронно-микроскопические исследования ранее проводили исключительно на нефракционированных образцах почвенных и водных ГК и ФК.

Целью настоящего исследования было проведение сравнительного ПЭМ-исследования почвенных ГК и их стабильных электрофоретических фракций, полученных сочетанием ЭХ–ЭПААГ. При подготовке ГК и фракций для ПЭМ-анализа был впервые применен метод негативного контрастирования препаратов водным раствором уранилацетата, широко применяемого в биохимии для изучения морфологии разнообразных биологических объектов, слабо поглощающих электроны [40–43].

Принимая во внимание широкий набор морфологических структур, наблюдавшихся ранее другими исследователями в нефракционированных препаратах ГК и ФК различного происхождения, можно допустить две возможности: 1) каждая фракция содержит полный набор структурных элементов или 2) отдельные структуры доминируют в конкретных электрофоретических фракциях. Если ПЭМ-изображения фракций покажут существенные морфологические различия, то логично было бы связать эти различия с обнаруженными нами ранее физико-химическими характеристиками ГК и фракций.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Выделение из ГК чернозема стабильных электрофоретических фракций, их физико-химические характеристики и химический состав.** В качестве объекта исследования использовали препарат ГК, выделенный из чернозема, представляющего наиболее плодородную почву, занимающую обширную территорию европейской и азиатской частей России. На рис. 1а представлены электрофореграммы природно окрашенных препаратов ГК чернозема и его трех электрофоретических фракций А, В и С + D, полученных с помощью ранее разработанного сочетания методов ЭХ–ЭПААГ [28]. Фракции различаются как электрофоретической подвижностью (ЭП), так и объемом элюции ( $V_e$ ) с хроматографической колонки (рис. 1а, 1б). Фракция А ( $V_e = 47–56$  мл) была обнаружена в свободном объеме колонки и представляла собой стартовую зону, частично проникающую в поры 10%-ного ПААГ, фракция В ( $V_e = 57–80$  мл)



**Рис. 1.** Электрофорез ГК чернозема и фракций А, В, С + D в 10%-ном ПААГ (а); фракционирование ГК на колонке с сефадексом G-75 (б); спектры поглощения ГК и фракций при концентрации препаратов 20 мг/л (в);  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры (г) и распределение интенсивности флуоресценции препаратов при освещении УФ-светом длиной волны 312 нм (д).

образовала узкую полосу в средней части ПААГ, а фракция С+D ( $V_e = 111\text{--}160$  мл) формировала две зоны разной интенсивности, имеющие близкие ЭП в нижней части геля. Часть ГК, выходящую с хроматографической колонки в виде смеси фракций В и С + D ( $V_e = 81\text{--}110$  мл), для дальнейших анализов не использовали. Весовая доля фракции А составляла 21%, фракции В – 19%, фракции С + D – 37%, смеси фракций В и С + D – 23%. Препараты существенно различаются не только по  $V_e$  и ЭП, но и по целому ряду других физико-химических характеристик. На рис. 1в представлены спектры поглощения ГК чернозема и фракций в УФ- и видимой областях света, измеренные при одинаковой концентрации образцов. Спектры поглощения фракций не имели характерных максимумов, как и спектр исходного препарата ГК, однако существенно различались между собой по оптической плотности в УФ- и видимой областях света (табл. 1). На длине волны 270 нм оптические плотности фракций А ( $A_{270} = 0.32$ ) и С + D ( $A_{270} = 1.1$ ) различались более чем в 3 раза, что, вероятнее всего, связано с различным содер-

жанием ароматических компонентов, поглощающих свет в УФ-области света [44]. Преимущественное содержание ароматических компонентов во фракции С + D по сравнению с фракциями А и В было продемонстрировано нами с помощью твердофазной  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии (рис. 1г, табл. 1) [32]. Методом пиролиза метилированных препаратов ГК и фракций, сопряженного с газовой хроматографией и масс-спектрометрией (пиролиз/ГХ/МС), были идентифицированы линейные насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, алканы и алкены – алифатические компоненты с длиной цепи 12–30 углеродных атомов. Среди обнаруженных ароматических компонентов преобладали бензолполикарбоновые кислоты, а также незначительное количество монофенолов и мономеров окисленных лигнинов [30]. С помощью двумерного и трехмерного флуоресцентных анализов [31, 34] было показано, что во фракции С + D сконцентрирована значительная доля флуоресцирующих групп с длинами волн испускания в видимом диапазоне 450–550 нм (рис. 1д, табл. 1), а фрак-

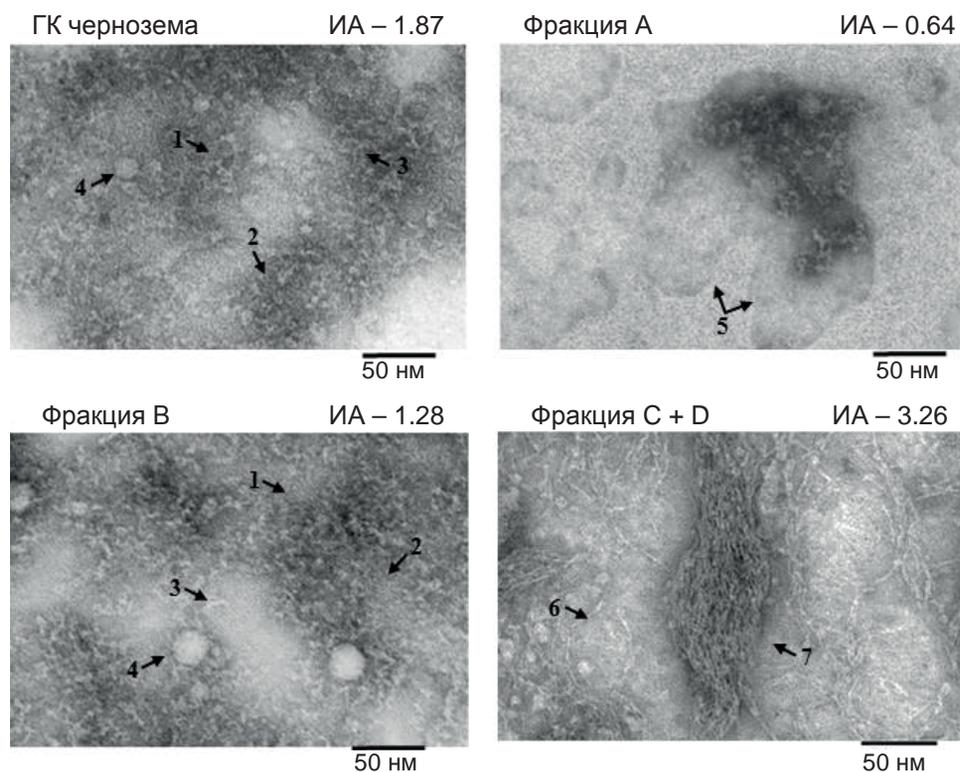
Таблица 1. Некоторые физико-химические характеристики ГК чернозема и электрофоретических фракций А, В и С + D

Образцы	ОФ-ВЭЖХ [33]	Кислотный гидролиз [29]	Твердофазный <sup>13</sup> C-ЯМР [32]		Пиролиз/ГХ/МС [30]	Интенсивность испускания флуоресценции [31, 34]		Оптические свойства (C <sub>препаратов</sub> = 20 мг/л)	
			индекс ароматичности C <sub>аром</sub> (165–108 м.д.)/C <sub>алиф</sub> (108–0 м.д.)	аномерный углерод (100 м.д.)		УФ-флуоресценция (λ = 320–350 нм)	видимая флуоресценция (λ = 450–550 нм)	A <sub>270</sub>	A <sub>465</sub>
ГК чернозема	29	6.1 ± 0.3	1.87	+	C12–C30	+	++	0.91	0.21
Фракция А	73	13.2 ± 1.0	0.64	+++	C12–C30	+++	+	0.32	0.08
Фракция В	33	7.9 ± 0.5	1.28	++	C12–C22	++	+	0.75	0.19
Фракция С + D	0	2.3 ± 0.2	3.26	–	C12–C22	–	+++++	1.1	0.22

ции А и В обогащены протеиноподобными флуоресцирующими группами с длинами волн испускания в УФ-диапазоне 320–350 нм (табл. 1). Обогащение фракций А и В аминокислотами было подтверждено с помощью кислотного гидролиза препаратов (табл. 1) [29]. Препараты различались по степени гидрофобности [33], а также по биологической [45] и фотохимической активности [31].

Таким образом, многолетний комплексный анализ препаратов ГК чернозема и электрофоретических фракций выявил принципиальные различия в их физико-химических свойствах, химическом составе и экологических функциях. Морфологический анализ, несомненно, дополнил бы их “характеристический паспорт” и возможно, в сочетании с другими ранее выявленными параметрами, дал бы ключ к пониманию структурной организации природного органического вещества. Исходя из этого предположения, мы проанализировали ГК чернозема и электрофоретические фракции с помощью ПЭМ.

**ПЭМ-анализ препаратов ГК чернозема и электрофоретических фракций А, В и С + D.** В настоящей работе был впервые применен метод пробоподготовки почвенных ГК с использованием негативного контрастирования препаратов водным раствором уранилацетата. Сравнительный ПЭМ-анализ ГК и фракций был проведен через 10 сут после приготовления растворов одинаковой концентрации. ПЭМ-изображения ГК чернозема и фракций А, В, С + D приведены на рис. 2. Обнаруженные структурные элементы различной морфологии сведены в табл. 2 (п. 1–7). Все исследованные образцы содержали точечные частицы диаметром 2–3 нм (п. 1), кольцевые частицы (п. 2, диаметр 4–6 нм) с отверстием в центре диаметром ~2 нм и червеподобные короткие частицы (п. 3, длина 20–30 нм, ширина 4–6 нм). Кроме того, в ГК и фракциях присутствовали сфериды (п. 4) различного диаметра (10–30 нм). Крупные морфологические элементы – капельные везикулоподобные образования с неровными четко выраженными краями (п. 5, длина 70–150 нм, ширина 30–80 нм) обнаружены только во фракции А, занимая ~55% площади ПЭМ-изображений. Другие крупные морфологические элементы – длинные цепочкообразные или линейные фибриллы (п. 6, длина 60–100 нм, ширина 4–6 и 2–3 нм соответственно) и их пучки (п. 7, длина >150 нм, диаметр 30–70 нм), обнаружены только во фракции С + D и занимали ~59% площади ПЭМ-изображений. Длинные цепочкообразные и линейные фибриллы предположительно представляют собой два разных ПЭМ-изображения одних и тех же морфологических структур длиной 60–100 нм,



**Рис. 2.** ПЭМ-изображения препаратов ГК чернозема и фракций А, В, С + D. Номера 1–7 соответствуют порядковым номерам морфологических форм, представленных в табл. 2: точечные частицы (1), кольцевые частицы (2), червеподобные частицы (3), сфероиды (4), капельные везикулоподобные образования (5), длинные фибриллы (6), пучки длинных фибрилл (7). Индекс ароматичности (ИА), т.е.  $S_{аром}/S_{алиф}$ , рассчитан на основании  $^{13}C$ -ЯМР-спектров по соотношению площадей над областями химических сдвигов ароматического (165–108 м.д.) и алифатического (108–0 м.д.) углерода согласно нашим ранее опубликованным данным [32].

**Таблица 2.** Распределение структурных элементов различной морфологии (1–7) между исходным препаратом ГК чернозема и электрофоретическими фракциями А, В и С + D

№	Морфологические структурные элементы	ГК чернозема	Фракция А	Фракция В	Фракция С + D
1	Точечные частицы	d (2–3 нм)	d (2–3 нм)	d (2–3 нм)	d (2–3 нм)
2	Кольцевые частицы	d (4–6 нм)	d (4–6 нм)	d (4–6 нм)	d (4–6 нм)
3	Червеподобные частицы	l (20–30 нм) w (4–6 нм)	l (20–30 нм) w (4–6 нм)	l (20–30 нм) w (4–6 нм)	l (20–30 нм) w (4–6 нм)
4	Сфероиды	d (10–20 нм)	d (10–20 нм)	d (20–30 нм)	d (10–15 нм)
5	Капельные везикулоподобные образования	–	l (70–150 нм) w (30–80 нм)	–	–
6	Длинные фибриллы	–	–	–	l (60–100 нм) w (2–3 нм) w (4–6 нм)
7	Пучки длинных фибрилл	–	–	–	l (>150 нм) d (30–70 нм)

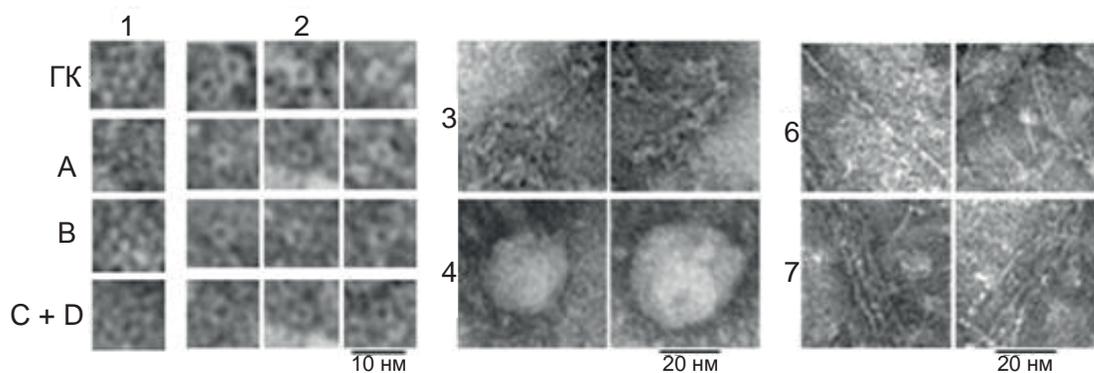
Примечание: d – диаметр, l – длина, w – ширина.

шириной 4–6 нм и толщиной 2–3 нм, расположенных на поверхности пленки формвара под разными углами (рис. 2 и 3, п. 6 и 7). Следует отметить, что если в ГК чернозема и фракции В обнаружены только небольшие морфологические элементы (точечные, кольцевые, червеподобные частицы и сфероиды), то во фракциях А и С+D мелкие элементы покрывали <50% площади ПЭМ-изображений.

**Взаимосвязь морфологических структур и физико-химических свойств препаратов ГК чернозема и электрофоретических фракций А, В и С + D.** Существенные морфологические различия между ГК чернозема и электрофоретическими фракциями связаны с их химическим составом и контрастными физико-химическими характеристиками (табл. 1, рис. 1). По данным  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии отношение  $S_{\text{аром}}(165-108 \text{ м.д.})/S_{\text{алиф}}(108-0 \text{ м.д.})$ , названное индексом ароматичности (ИА), увеличивается в 5 раз от фракции А (ИА – 0.64) к фракции С+D (ИА – 3.26), фракция В имеет среднюю ароматичность (ИА – 1.28) между фракциями А и С + D и сопоставима с ароматичностью ГК чернозема (ИА – 1.87) [32]. В первом приближении ароматичность (т.е. соотношение алифатических и ароматических компонентов в образцах ГК) может служить базовым показателем формирования различных морфологических структур во фракциях (рис. 2).

Неравномерное распределение ароматических и алифатических компонентов между фракциями было подтверждено несколькими аналитическими методами [29–32]. Существенное обогащение фракции С + D ароматическими компонентами – преимущественно низкомолекулярными конденсированными полиароматическими соединениями, содержащими значительное число кислородных функциональных групп – было

подтверждено с помощью ион-циклотронной масс-спектрометрии высокого разрешения с преобразованиями Фурье (неопубликованные данные). Наличие в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах ГК чернозема сигнала с химическим сдвигом 100 м.д. отражает присутствие в препаратах аномального углерода сахаров [32]. Различная интенсивность этого сигнала указывает на максимальное содержание сахаров во фракциях А и В и его отсутствие во фракции С + D (рис. 1г, табл. 1). Наибольшее весовое содержание гидролизуемых аминокислот обнаружено во фракции А (13.2%), а наименьшее – во фракции С + D (2.3%) [29]. Пиролиз/ГХ/МС показал, что во фракции А содержится существенно больше линейных длинноцепочечных насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, алканов и алкенов, чем во фракциях В и С + D. Интересно, что во фракциях В и С + D были идентифицированы только гомологи жирных кислот с длиной цепи 12–22 углеродных атомов, а во фракции А – с длиной цепи 12–30 углеродных атомов. Наиболее примечательно превышение на порядок во всех препаратах содержания амфифильных линейных жирных кислот по сравнению с содержанием алканов и алкенов [30]. Преимущественное содержание во фракции А амфифильных жирных кислот, подтвержденное различными аналитическими методами, хорошо согласуется с формированием везикулярных образований, наблюдаемых в этой фракции методом ПЭМ. С другой стороны, значительное преобладание ароматических соединений во фракции С+D свидетельствует о том, что именно ароматические структуры – основной структурный компонент для формирования длинных фибрилл и их пучков, наблюдаемых на ПЭМ-изображениях этой фракции.



**Рис. 3.** ПЭМ-изображения точечных (1) и кольцевых (2) частиц на различных микрофотографиях препаратов ГК чернозема и фракций А, В, С + D; примеры червеподобных частиц (3), сфероидов (4), длинных фибрилл в двух разных проекциях (6), а также пучков длинных фибрилл (7).

**Результаты ПЭМ как существенный визуальный аргумент в пользу супрамолекулярной организации почвенных ГК.** В настоящей работе использован инновационный подход, заключающийся в разделении препарата ГК чернозема на стабильные электрофоретические фракции, различающиеся по ряду физико-химических параметров и химическому составу, с последующим морфологическим анализом образцов методом ПЭМ. Подготовку препаратов для ПЭМ почвенных ГК проводили методом негативного контрастирования раствором уранилацетата. Ранее I.L. Stevenson и M. Schnitzer [36, 37], используя для контрастирования образцов метод реплик в сочетании с ПЭМ, наблюдали на изображениях почвенных препаратов ГК канадского чернозема сфероиды диаметром 9–50 нм и их агрегаты диаметром 100–200 нм, а также линейные, цепочкообразные фибриллы. Основываясь на полученных результатах, M. Schnitzer [21] предположил, что агрегаты сфероидов – строительные блоки для сборки более крупных морфологических структур, таких как длинные волокна. Используя методику негативного контрастирования уранилацетом, мы подтвердили предположение M. Schnitzer о сборке крупных морфологических структур из более мелких и впервые выявили новые структурообразующие морфологические элементы почвенных ГК, названные точечными и кольцевыми частицами (рис. 3, табл. 2, п. 1 и 2). Обнаружение новых морфологических элементов меньшего размера стало возможным благодаря методике негативного контрастирования образцов ГК и фракций 1%-ным раствором уранилацета, легко проникающим внутрь сложно организованных частиц.

Согласно нашим результатам, базовыми строительными блоками для сборки ряда более крупных морфологических структур, таких как сфероиды, червеподобные короткие частицы, длинные фибриллы и пучки длинных фибрилл (рис. 3, табл. 2, п. 3, 4, 6, 7), являются не агрегаты сфероидов, как у I.L. Stevenson и M. Schnitzer [36, 37], а более мелкие кольцевые частицы с отверстием в центре (рис. 3, табл. 2, п. 2, диаметр частиц 4–6 нм, диаметр отверстия 2 нм), взаимодействующие между собой за счет разнообразных нековалентных связей (водородных и стэкинг-взаимодействий, сил Ван-дер-Ваальса и др.). Исходя из сравнительного анализа формы и размеров точечных и кольцевых частиц (рис. 3, табл. 2, п. 1 и 2), можно также предположить супрамолекулярную организацию кольцевых частиц из нескольких точечных частиц, однако для подтверждения этого вопроса необходимо использовать электронно-

микроскопические методы более высокого разрешения. С другой стороны, наблюдаемые во фракции А крупные везикулярные образования (рис. 2, табл. 2, п. 5) можно объяснить наличием избытка амфифильных линейных жирных кислот, способных самоорганизоваться в растворе в мицеллы или везикулы. Полученные результаты впервые дают визуальное представление о механизмах формирования супрамолекулярных агрегатов почвенных ГК.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Почвенный образец и выделение гуминовых кислот.** В качестве почвенного образца была выбрана хорошо известная в мире наиболее плодородная черноземная почва, занимающая значительную территорию европейской и азиатской частей России. Образец почвы был отобран из верхнего горизонта А (10–20 см) чернозема на территории государственного почвенного заповедника, расположенного в Курской области.

После высушивания на воздухе, тщательного удаления растительных остатков, измельчения с помощью фарфоровой ступки и просеивания через сито с размером пор 2 мм образец почвы пересыпали в плотно закрывающуюся стеклянную колбу и хранили в темноте при комнатной температуре для дальнейших исследований.

Гуминовые кислоты (ГК) выделяли из почвы щелочной экстракцией с последующим осаждением соляной кислотой по методу Кононовой–Бельчиковой [1]. Лиофильный препарат ГК чернозема хранили в плотно закрытой стеклянной колбе в темноте при комнатной температуре. Содержание воды (8.5%) и золы (2.3%) измеряли на термобалансаторе (Perkin Elmer, США). Элементный состав сухого беззольного препарата ГК (С 62.6%, Н 4.3%, N 4.2%) проводили на анализаторе CHN Analyzer, series II 2400 (Perkin Elmer, США).

**Фракционирование ГК чернозема сочетанием методов ЭХ–ЭПААГ.** Фракционирование препарата ГК проводили с помощью ЭХ, а отбор нужных фракций осуществляли на основании анализа хроматографического профиля с помощью аналитического ЭПААГ. Методика ЭХ–ЭПААГ подробно описана нами ранее [28]. ГК (10 мг) растворяли в 1 мл 7 М мочевины и наносили на колонку с сефадексом G-75 (Pharmacia, Швеция) (1.5 × 100 см), уравновешенную тем же раствором. Скорость потока составляла 15 мл/ч. С помощью коллектора фракций (ISCO, США) вещество с колонки собирали в виде аликвот объемом 2 мл. Из каждой третьей аликвоты отбирали 0.1 мл элюата для ЭПААГ-анализа на приборе для вертикального электрофореза

(LKB 2001 Vertical Electrophoresis, Швеция) с пластинками геля размером 20 × 20 см. Электрофорез проводили в 10%-ном ПААГ в течение 1 ч при комнатной температуре (сила тока – 25 мА). В качестве буфера для приготовления геля использовали 89 мМ Tris-борат (pH 8.3), 7 М мочевины, 1 мМ ЭДТА. Электродный буфер содержал 89 мМ раствор Tris-бората (pH 8.3) и 1 мМ ЭДТА. Перед ЭПААГ к каждому образцу (0.1 мл элюата) добавляли 0.01 мл раствора, содержащего 890 мМ Tris-бората (pH 8.3), 10 мМ ЭДТА и 10% додецилсульфата натрия. В результате ЭПААГ-анализа из хроматографического профиля были выделены три области, каждая из которых содержала индивидуальную электрофоретическую зону коричневого цвета. Фракции, названные А, В и С + D, различались как объемами элюции ( $V_e$ ) с колонки, так и электрофоретической подвижностью (ЭП). Фракции диализовали в течение 7 сут против дистиллированной воды на диализной мембране с размером пор 10–12 кДа, высушивали лиофилизацией и хранили в плотно закрытых стеклянных ампулах в темноте при комнатной температуре. Процедуру фракционирования повторяли несколько раз для получения достаточного количества вещества для дальнейших исследований. Массовый баланс (%) сухих электрофоретических фракций рассчитывали по соотношению  $W_i/\Sigma W_k$ , где  $W_i$  – масса фракции, а  $\Sigma W_k$  – масса всех фракций, полученных после фракционирования, очистки диализом и лиофилизацией.

**Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ).** Образцы исходного препарата ГК чернозема и электрофоретических фракций А, В и С + D взвешивали и растворяли в 10 мМ NaOH до концентрации 0.1 мг/мл, pH растворов составлял ~8–9. Образцы для ПЭМ-исследований готовили методом негативного контрастирования. Медные сеточки (400 mesh, Electron Microscopy Sciences, США), покрытые формваровой пленкой (0.2%-ный раствор формвара в хлороформе), помещали на каплю препарата (8–10 мкл). После 5 мин адсорбции сеточки с препаратом перенесли на каплю (40 мкл) 1%-ного (w/v) уранилацетата. Время контрастирования составляло 1–2 мин. Избыток жидкости (при перенесении препарата на контрастер и после контрастирования) убирали, касаясь краем сеточки кусочка фильтровальной бумаги. Препараты анализировали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1200EX (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Изображения фиксировали на электронную фотопленку Kodak (SO-163, Kodak Electron Image Film, США) при номинальном увеличении 40 000×. ПЭМ-анализ проводили для каждого образца через

10 сут после приготовления растворов в трех повторностях.

**Спектры поглощения и флуоресценция.** Спектры поглощения в УФ- и видимой областях света были получены на спектрофотометре Cary 3 (Varian, США) в кварцевой кювете длиной 1 см. Препараты ГК и фракций растворяли в растворе 10 мМ NaOH до концентрации 20 мг/л. Оптические плотности ( $A_{270}$  и  $A_{465}$ ) на длинах волн 270 и 465 нм для ГК и фракций приведены в табл. 1. Распределение между образцами флуоресценции в видимой области света демонстрировали с помощью трансиллюминатора на длине волны возбуждения 312 нм в кварцевых кюветах. Для минимизации эффекта внутреннего фильтра растворы ГК и фракций разбавляли до оптической плотности 0.05 на длине волны 270 нм.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ПЭМ большого увеличения (40 000×) с контрастным окрашиванием раствором уранилацетата впервые была использована для характеристики почвенных ГК и их электрофоретических фракций А, В и С + D, полученных сочетанием методов ЭХ–ЭПААГ. Мелкие морфологические элементы, такие как точечные и кольцевые частицы, червеподобные короткие частицы и сфероиды, наблюдали во всех образцах, но в разных количествах. Крупные морфологические структуры в виде размазанных капель с четкими краями формировались только во фракции А, а длинные волокна или их пучки – исключительно во фракции С + D. Была обнаружена корреляция между морфологическими формами и физико-химическими характеристиками образцов ГК и фракций. Результаты ПЭМ дают новую информацию о размере и форме кольцевых частиц с отверстием в центре, являющихся потенциальными строительными блоками для формирования более крупных супрамолекулярных морфологических структур, таких как сфероиды, червеподобные короткие частицы или удлиненные волокна. Супрамолекулярная концепция строения природных ГК может быть успешно использована для объяснения природных процессов, происходящих с участием ГК, и более точного определения их экологических функций в биосфере.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания на базе Центра электронной микроскопии Пущинского центра биологических исследований (<http://www.ckp-rf.ru/ckp/670266>).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием

людей или использованием животных в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кононова М.М. // Органическое вещество почв. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 314 с.
2. Wershaw R.L. Evaluation of Conceptual Models of Natural Organic Matter (Humus) From a Consideration of the Chemical and Biochemical Processes of Humification, U.S. Geological Survey, Reston, VA. 2004. Scientific Investigations Report No. 2004-5121.
3. Kleber M., Johnson M.G. // Adv. Agron. 2010. V. 106. P. 77–142.  
[https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)06003-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)06003-7)
4. Stevenson F.J. // Humus chemistry – Genesis, Composition, Reactions (2nd ed.). New York, John Wiley. 1994. 496 p.
5. Schmidt M.W.I., Torn M.S., Abiven S., Dittmar T., Guggenberger G., Janssens I.A., Kleber M., Kögel-Knabner I., Lehmann J., Manning D.A.C., Nannipieri P., Rasse D.P., Weiner S., Trumbore S.E. // Nature. 2011. V. 478. P. 49–56.  
<https://doi.org/10.1038/nature10386>
6. Zepp R.G., Schlotzhauer P.F., Sink R.M. // Environ. Sci. Technol. 1985. V. 19. P. 74–81.
7. Христева Л.А., Пиеничный А.Е., Пивоваров Л.П. // Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. Изд-во Харьковского ун-та, 1957. С. 109–126.
8. Canellas L.P., Piccolo A., Dobbss L.B., Spaccini R., Olivares F.L., Zandonadi D.B., Façanha A.R. // Chemosphere. 2010. V. 78. P. 457–466.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.018>
9. Martinez-Balmon D., Spassini R., Aguiar N.O., Novotny E.H., Olivares F.L., Canellas L.P. // J. Agric. Food Chem. 2014. V. 62. P. 11412–11419.  
<https://doi.org/10.1021/jf504629c>
10. Boyle E.S., Guerriero N., Thiallet A., Vecchio, R.D., Blough N.V. // Environ. Sci. Technol. 2009. V. 43. P. 2262–2268.  
<https://doi.org/10.1021/es803264g>
11. Alberts J.J., Takacs M. // Org. Geochem. 2004. V. 35. P. 243–256.  
<https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2003.11.007>
12. Lehmann J., Kleber M. // Nature. 2015. V. 528. P. 60–68.  
<https://doi.org/10.1038/nature16069>
13. Kleber M., Lehmann J. // J. Environ. Qual. 2019. V. 48. P. 207–216.  
<https://doi.org/10.2134/jeq2019.01.0036>
14. Haworth R.D. // Soil Sci. 1971. V. 111. P. 71–79.  
<https://doi.org/10.1097/00010694-197101000-00009>
15. Schulten H.R., Schnitzer M. // Soil Science. 1997. V. 162. P. 115–130.
16. MacCarthy P. // Soil Sci. 2001. V. 166. P. 738–751.  
<https://doi.org/10.1097/00010694-200111000-00003>
17. Kleinhempel D. // Archives of Agronomy and Soil Science. 1970. V. 14. P. 3–14.
18. Farmer V.C., Pisaniello D.L. // Nature. 1985. V. 313. P. 474–475.  
<https://doi.org/10.1038/313474a0>
19. Shnitzer M., Neyroud A. // Fuel. 1975. V. 54. P. 17–19.
20. Saiz-Jimenez C. // Environ. Sci. Technol. 1994. V. 28. P. 197–200.
21. Schnitzer M. // Soil Sci. 1991. V. 151. P. 41–58.
22. Студ Д.В., Эввуд Д.Л. // Супрамолекулярная химия (в 2 т.). М.: Академкнига, 2007.
23. Wershaw R.L. // J. Contam. Hydrol. 1986. V. 1. P. 29–45.  
[https://doi.org/10.1016/0169-7722\(86\)90005-7](https://doi.org/10.1016/0169-7722(86)90005-7)
24. Piccolo A. // Soil Sci. 2001. V. 166. P. 810–832.
25. Kingery W.L., Simpson A.J., Hayes M.H.B., Hayes M.A., Locke M.A., Hicks R.P. // Soil Sci. 2000. V. 165. P. 483–494.
26. Simpson A.J., Kingery W.L., Hayes M.H., Spraul M., Humpfer E., Dvortsak P., Kerssebaum R., Hofmann M. // Naturwissenschaften. 2002. V. 89. P. 84–88.
27. Piccolo A., Conte P., Trivellone E., Van Lagen B. // Environ. Sci. Tech. 2002. V. 36 P. 76–84.  
<https://doi.org/10.1021/es010981v>
28. Trubetskoy O.A., Trubetskaya O.E., Afanas'eva G.V., Reznikova O.I., Saiz-Jimenez C. // J. Chromatogr. A. 1997. V. 767. P. 285–292.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00019-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00019-8)
29. Trubetskaya O.E., Trubetskoy O.A., Afanas'eva G.V., Reznikova O.I., Markova L.F., Muranova T.A. // Environ. Int. 1998. V. 24. P. 573–581.  
[https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(98\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(98)00036-1)
30. Saiz-Jimenez C., Hermosin B., Trubetskaya O., Reznikova O., Afanas'eva G., Trubetskoy O. // Geoderma. 2006. V. 131. P. 22–32.  
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.03.001>
31. Richard C., Trubetskaya O.E., Trubetskoy O.A., Reznikova O.I., Afanas'eva G.V., Aguer J.-P., Guyot G. // Environ. Sci. Technol. 2004. V. 38. P. 2052–2057.  
<https://doi.org/10.1021/es030049f>
32. Trubetskoy O.A., Hatcher P.G., Trubetskaya O.E. // Chem. Ecol. 2010. V. 26. P. 315–325.  
<https://doi.org/10.1080/02757541003785825>
33. Trubetskoy O.A., Richard C., Guyot G., Voyard G., Trubetskaya O.E. // J. Chromatogr. A. 2012. V. 1243. P. 62–68.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.043>
34. Трубецкой О.А., Трубецкая О.Е. // Почвоведение. 2017. № 9. С. 1057–1064.  
<https://doi.org/10.7868/S0032180X17090088>

35. Orlov D.S., Ammosova Ya.M., Glebova G.I. // *Geoderma*. 1975. V. 13. P. 211–229.  
[https://doi.org/10.1016/0016-7061\(75\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0016-7061(75)90019-1)
36. Stevenson I.L., Schnitzer M. // *Soil Sci.* 1982. V. 133. P. 179–185.  
<https://doi.org/10.1097/00010694-198203000-00007>
37. Stevenson I.L., Schnitzer M. // *Soil Sci.* 1984. V. 138. P. 123–126.
38. Kerner M., Hohenberg H., Ertl S., Reckermann M., Spitz A. // *Nature*. 2003. V. 422. P. 150–154.  
<https://doi.org/10.1038/nature01469>
39. Dong V., Wan L., Cai J., Fang Q., Chi V., Chen G. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 10037.  
<https://doi.org/10.1038/srep10037>
40. Vasiliev V.D., Selivanova O.M., Baranov V.I., Spirin A.S. // *FEBS Lett.* 1983. V. 155. P. 167–172.  
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80232-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80232-4)
41. Peschek J., Braun N., Franzmann T.M., Georgalis Y., Haslbeck M., Weinkauff S., Buchner J. // *PNAS*. 2009. V. 106. P. 13272–13277.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0902651106>
42. Selivanova O.M., Surin A.K., Marchenkov V.V., Dzhus U.F., Grigorashvili E.I., Suvorina M.Y., Glyakina A.V., Dovidchenko N.V., Galzitskaya O.V. // *J. Alzheimers Dis.* 2016. V. 54. P. 821–830.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-160405>
43. Galzitskaya O.V., Selivanova O.M. // *J. Alzheimers Dis.* 2017. V. 59. P. 785–795.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-170230>
44. Traina S.J., Novak J., Smeck N.E. // *J. Environ. Qual.* 1990. V. 19. P. 151–153.  
<https://doi.org/10.2134/jeq1990.00472425001900010023x>
45. Трубецкая О.Е., Трубецкой О.А. // *Почвоведение*. 2021. № 7. С. 862–870.  
<https://doi.org/10.31857/S0032180X21060150>

## Electron Microscopy of Stable Electrophoretic Fractions of Natural Humic Acids – the Key to the Understanding of Their Structural Organization

O. E. Trubetskaya\*, #, O. M. Selivanova\*\*, V. V. Rogachevsky\*\*\*, and O. A. Trubetskoj\*\*\*\*

# E-mail: olegi03@yahoo.com

\* Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, prosp. Nauki, 6, Pushchino, 142290 Russia

\*\* Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki, 4, Pushchino, 142290 Russia

\*\*\* Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki, 3, Pushchino, 142290 Russia

\*\*\*\* Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki, 2, Pushchino, 142290 Russia

Transmission electron microscopy (TEM) with contrast staining by uranyl acetate solution was used to study morphological differences between soil humic acids (HAs) and their A, B and C + D fractions obtained using coupling preparative low-pressure size exclusion chromatography and analytical polyacrylamide gel electrophoresis. The electrophoretic mobility of fractions varied in order C + D > B > A. The distribution of various morphological elements between fractions showed that large structures such as vesicle-like formations 70–150 nm long and 30–80 nm wide with clear edges were found exclusively in fraction A and occupied ~55% of the TEM image area. On the other hand, long fibrils with a length of 60–100 nm, a width of 4–6 nm and a thickness of 2–3 nm, as well as their bundles with a length of >150 nm and a diameter of 30–70 nm were identified only in the C + D fraction and occupied ~59 % area of TEM images. Smaller morphological elements such as point particles with a diameter of 2–3 nm, ring particles with a diameter of 4–6 nm, worm-shaped short particles with a length of 20–30 nm, and spheroids with a diameter of 10–30 nm were observed in all samples, but in varying quantities. Significant morphological differences between the fractions can be explained by their composition, previously established by using a few physico-chemical methods. The ratio  $C_{ar}(165-108 \text{ ppm})/C_{alk}(108-0 \text{ ppm})$ , or aromaticity index, calculated from  $^{13}\text{C-NMR}$ , could be one of the indicators of the various morphological structures formation. The obtained TEM results clearly confirm the supramolecular organization of soil HAs.

**Keywords:** soil humic acids, electrophoresis by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), size exclusion chromatography (SEC), transmission electron microscopy (TEM), physico-chemical characteristics, supramolecular structure



УДК 636.028

# АКТУАЛЬНОСТЬ ИНЖЕНЕРНО-ТЕХНИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ, РЕАЛИЗОВАННЫХ В ФИЛИАЛЕ ИБХ РАН, И СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ВИВАРИЕВ И ПИТОМНИКОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

© 2024 г. А. Н. Мурашев<sup>\*,#</sup>, Ф. А. Мещеряков<sup>\*</sup>

*\* Филиал института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 142290 Пущино, проспект Науки, 6*

Поступила в редакцию 29.10.2023 г.

После доработки 10.11.2023 г.

Принята к публикации 11.11.2023 г.

В статье обсуждаются инженерно-технические решения, которые были реализованы в Филиале института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) в 1980-е гг. при проектировании лабораторного корпуса с виварием и питомника лабораторных животных, свободных от патогенов (SPF). Такие лабораторные животные используются при выполнении доклинических исследований по международному стандарту надлежащей лабораторной практики (GLP).

*Ключевые слова: виварий, питомник, лабораторные животные, доклинические исследования*

**DOI:** 10.31857/S0132342324030123, **EDN:** NYNYLZ

В 1980-е гг. академик Юрий Анатольевич Овчинников одобрил проект строительства питомника лабораторных животных и лабораторного корпуса с виварием в наукограде Пущино в филиале Института биоорганической химии РАН. Проекты, одобренные академиком Ю.А. Овчинниковым, были лучшими в мировой практике по научно-технологическим и инженерно-техническим решениям на тот период развития технического прогресса. Это решение стало ключевым для развития отечественной науки в области лабораторного животноводства и выполнения доклинических исследований при создании инновационных лекарственных средств.

В настоящее время Питомник лабораторных животных и испытательный центр “Центр биологических испытаний” ИБХ РАН занимают лидирующее положение в России, они в нашей стране единственные, кто получил международную AAALAC-аккредитацию по работе с лабораторными животными. Современный международный уровень поддерживается благодаря инженерно-техническими решениями, которые были

заложены в проектах, одобренных академиком Ю.А. Овчинниковым более 40 лет тому назад.

В питомнике разводят лабораторных животных SPF-статуса (свободных от патогенов). Испытательный центр выполняет доклинические исследования также на животных SPF-статуса. Поддержание SPF-статуса обеспечивается технологией, реализуемой в питомнике и испытательном центре с помощью санитарно-пропускного режима прохождения в зону содержания лабораторных животных сотрудников и материалов, а также конструктивными и инженерно-техническими решениями зданий. Система приточно-вытяжной вентиляции обеспечивает избыточное давление (3–4 Па) в комнатах содержания животных. Воздух, поступающий в комнаты содержания животных, очищается с помощью фильтров (HEPA H13). Воздухообмен в комнате составляет 12–15-кратное обновление воздуха в час, что соответствует требованиям ГОСТ 33215-2014 [1].

Кроме сохранения статуса здоровья требуется обеспечить животным стандартные условия содержания. В комнатах содержания животных

Сокращения: GLP – надлежащая лабораторная практика (Good Laboratory Practice); SPF – свободные от специфических патогенов (Specific Pathogen Free).

<sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (916) 446-12-20; эл. почта: murashev@bibch.ru).

необходимо поддерживать следующие величины параметров микроклимата: температура 20–24°C, влажность 40–60%, освещенность – не более 325 Люкс на уровне 1 м от пола. Кроме этого, необходимо поддерживать определенный режим освещения, соблюдать 12-часовую смену темноты и света. Уровень шума в комнатах не должен превышать 85 дБ. Величины параметров условий содержания лабораторных животных отражены в ГОСТ 33216-2014 [2]. В питомнике и испытательном центре уровень параметров микроклимата поддерживается системой кондиционирования воздуха, включающей в себя системы подогрева и охлаждения воздуха, а также его увлажнения. Имеется также компьютеризированная система для мониторинга параметров микроклимата, которая работает в круглосуточном режиме. Световой режим поддерживается с помощью компьютеризированной системы.

Проектное инженерно-техническое оснащение питомника и испытательного центра не потеряло своей актуальности. Технологическому оборудованию, которое служит уже более 40 лет, заменили только электронную начинку. Например, исходный блок управления для кондиционирования воздуха занимал шкаф, теперь он представляет собой небольшую коробочку, при этом все функции управления исходным оборудованием для подогрева или охлаждения воздуха сохранены. Систему мониторинга параметров микроклимата несколько раз модернизировали в соответствии с развитием компьютерных технологий. В настоящее время эта система стала компьютеризированной, она позволяет круглосуточно регистрировать температуру и влажность в каждой комнате содержания животных в онлайн-режиме. Информация о параметрах сохраняется в электронном виде, имеется возможность извлекать необходимую информацию о параметрах за любой период времени. Была также модернизирована система управления световым режимом – электромеханическое реле времени было заменено на компьютеризированные электронные часы, которые в 8:00 свет включают, а в 20:00 выключают.

Успех Центра биологических испытаний ИБХ РАН как испытательного центра, выполняющего доклинические исследования по международному стандарту надлежащей лабораторной практики (GLP) [3, 4], стал возможен только при наличии питомника лабораторных животных и лабораторного корпуса с виварием для грызунов, которые были построены более 40 лет тому назад по лучшим мировым проектам. Строительством питомника и лабораторного корпуса академик Ю.А. Овчинников обозначил траекторию развития в области создания отечественных иннова-

ционных лекарственных средств. Испытательный центр ИБХ РАН первым в России в 2013 г. получил GLP-сертификат от Словацкой национальной службы по аккредитации (SNAS). Международный GLP-статус от SNAS испытательный центр поддерживал в течение 10 лет. Национальный GLP-статус от Росаккредитации был получен в 2014 г., Росаккредитацией было выдано GLP-свидетельство № 1. Испытательный центр ИБХ РАН свое лидирующее положение в России в области организации и проведения доклинических исследований по международному стандарту GLP подтверждает тем, что результаты доклинических исследований, выполненных в нем, признаются Европейским химическим агентством – ведущим международным регистратором (регулятором). Результаты доклинического исследования по изучению расширенной острой токсичности радиофармпрепарата <sup>68</sup>Ga-Trivehexin на крысах успешно прошли экспертную оценку (The Standard for Exchange of Non-Clinical Data, SEND) другого ведущего международного регулятора – Food and Drug Administration (FDA, США). Признание Европейским химическим агентством и FDA результатов доклинических исследований свидетельствует о том, что их выполнение соответствует мировому уровню.

Важное направление развития современной инновационной фармацевтики – создание высокотехнологичных лекарственных препаратов, в том числе генотерапевтических. Центр биологических испытаний ИБХ РАН выполняет доклинические исследования генотерапевтических препаратов для лечения ранней эпилептической энцефалопатии, которая вызвана мутациями в генах *GNAO1* или *CYFIP2*. Инициаторами разработок этих генотерапевтических препаратов выступают родители детей, страдающих данными орфанными заболеваниями. Создаваемые препараты представляют собой антисмысловые олигонуклеотиды. Международный опыт создания генотерапевтических средств для лечения орфанных заболеваний показал, что от момента установления мутантного гена до получения ребенком разработанного лекарственного средства может пройти меньше одного года. Временной фактор имеет огромное значение – чем быстрее будет оказано воздействие на мутантный ген, тем выше вероятность выздоровления.

Несомненно, лидерство Центра биологических испытаний ИБХ РАН в России и мировое признание результатов доклинических исследований, выполненных в этом центре, были бы достойно оценены академиком Юрием Анатольевичем Овчинниковым. В планах дальнейшего развития испытательного центра ИБХ РАН стоит расширение его компетенций, что позволит создать в России

центр, который будет выполнять доклинические исследования по международному стандарту GLP в объеме, который необходим для получения разрешения на проведение клинических исследований и подготовки регистрационного досье в формате Общего технического документа (СТД) для отечественных инновационных лекарственных средств. Расширение компетенций Центра биологических испытаний ИБХ РАН позволит устранить существующий в России временной разрыв между научной разработкой лекарственных средств и их клиническим применением. Центр сможет выполнять функции “технологического моста” и оказывать содействие отечественным разработчикам и производителям инновационных лекарственных средств в преодолении этого разрыва, который получил название “долина смерти”.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание в России испытательного центра, выполняющего доклинические исследования по международному стандарту GLP в объеме, который необходим для получения разрешения на проведение клинических исследований и регистрации, позволит российским разработчикам и производителям инновационных лекарственных средств получить независимость от зарубежных испытательных центров при выводе своей продукции на мировой рынок, что повысит технологический суверенитет России. Несомненно, планы развития Центра биологических испытаний ИБХ РАН были бы одобрены академиком Ю.А. Овчинниковым.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ 33215-2014. Правила оборудования помещений и организации процедур при работе с лабораторными животными. Москва: Стандартинформ, 2016. 20 с.
2. ГОСТ 33216-2014. Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами. Москва: Стандартинформ, 2016. 16 с.
3. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, no. 1 // OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997). Paris: 1998. 41 p.  
[https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd\\_glpdm.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_glpdm.pdf)
4. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств”. 79 с.  
<https://docs.cntd.ru/document/456026101>

## The Relevance of Engineering and Technical Solutions Implemented in the Branch of IBCh RAS, and Modern Problems of Vivariums and Breeding Facility of Laboratory Animals

A. N. Murashev\*,# and F. A. Meshcheryakov\*

# Phone: +7 (916) 446-12-20; e-mail: [murashev@bibch.ru](mailto:murashev@bibch.ru)

\* Branch of Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, prosp. Nauki 6, Pushchino, 142290 Russia

The article discusses the relevance of engineering and technical solutions that were implemented in the Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences (IBCh RAS) in the 1980s when designing a laboratory building with a vivarium and a nursery of laboratory animals free of pathogens (SPF). Such laboratory animals are used when performing preclinical studies according to the international standard of good laboratory practice (GLP).

*Keywords: vivarium, breeding facility, laboratory animals, non-clinical studies*



УДК 577.218

# ФАКТОР РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ Ybx1 СТАБИЛИЗИРУЕТ МАТЕРИНСКУЮ мРНК ГЕНА *ssx2ip*, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК СОЗРЕВАНИЯ ЦЕНТРОСОМ, В ЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ ЛЯГУШКИ *Xenopus laevis*

© 2024 г. Е. А. Паршина\*, А. Г. Зарайский\*, Н. Ю. Мартынова\*,#

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

Поступила в редакцию 07.09.2023 г.

После доработки 17.09.2023 г.

Принята к публикации 18.09.2023 г.

Данная работа – продолжение наших исследований механизмов регуляции экспрессии генов раннего развития с использованием модельного организма – эмбрионов лягушки *Xenopus laevis*. Ранее мы обнаружили, что материнская мРНК двух важных для развития генов – *pou5f3* (ген фактора плюрипотентности семейства) и *rarg* (ген ядерного рецептора ретиноевой кислоты) – образует комплексы с белком рибонуклеопротеиновых комплексов Ybx1, который стабилизирует эти мРНК. В настоящей работе мы показали, что стабильность материнской мРНК *ssx2ip*, кодирующей консервативный белок Ssx2ip (известный также как Msd1 или ADIP, компонент созревания centrosом), также регулируется РНК-связывающим фактором Ybx1. В частности, мы выяснили, что Ybx1 образует рибонуклеопротеиновый комплекс с мРНК *ssx2ip*, в котором участвует домен холодового шока (CSD) фактора Ybx1. Полученные результаты подтверждают предложенную нами гипотезу о селективном связывании фактора Ybx1 с материнскими транскриптами и открывают возможности для поиска возможных *цис*-мотивов для узнавания *транс*-регуляторами, подобными Ybx1, что важно для изучения подобных механизмов регуляции генной экспрессии.

*Ключевые слова:* эмбриогенез, рибонуклеопротеиновый комплекс, мРНК, белок Ybx1, материнские транскрипты, *ssx2ip*

DOI: 10.31857/S0132342324030133, EDN: NXVOFU

## ВВЕДЕНИЕ

Материнские мРНК и белки определяют раннее эмбриональное развитие до активации зиготического генома [1]. Перед активацией зиготического генома транскрипционно неактивные ранние эмбрионы зависят исключительно от материнских транскриптов и белков, накопленных в оогенезе и необходимых для начальных стадий развития, включая оплодотворение, дробление

и раннюю разметку эмбриона [2]. Чтобы стимулировать созревание ооцитов и ранний эмбриогенез в отсутствие транскрипции, стабильность транскриптов и синтез белка необходимо точно настроить с помощью специальных регуляторов трансляции, нацеленных на нужные группы материнских мРНК [3–9]. Регуляция стабильности и трансляции материнских транскриптов определяется комбинацией *цис*-мотивов, присутст-

Сокращения: CSD – домен холодового шока; LIM-домен – от первых букв названий трех белков, у которых был впервые описан данный домен: LIN-11, Isl-1 и MEC-3; 6Myc-C-Ybx1 – делеционный мутант белка Ybx1, содержащий последовательности шести пептидов Myc; 6Myc-Ybx1 – полноразмерный белок Ybx1, содержащий последовательности шести пептидов Myc; *pou5f3* – ген, кодирующий фактор плюрипотентности; RIPA – метод рибоиммунопреципитации; *rarg* – ген, кодирующий ядерный рецептор ретиноевой кислоты; *ssx2ip* – ген, кодирующий консервативный белок Ssx2ip (Msd1, ADIP), компонент созревания centrosом; Ybx1 – фактор рибонуклеопротеиновых комплексов; MO – морфолиновые олигонуклеотиды; мРНК – матричные рибонуклеопротеиды.

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

вующих в мРНК, и *транс*-регуляторов, РНК-связывающих белков, которые связываются с этими последовательностями.

Белок Ybx1 – один из наиболее изученных *транс*-регуляторов, способных эффективно стабилизировать мРНК, предотвращая ее деградацию. В этом процессе ключевую роль играет его домен холодового шока (CSD), который отвечает за связывание с РНК. Образуя компактные мРНК (матричные рибонуклеопротеиды) с недоступными экзонуклеазам 5'- и 3'-концами, Ybx1 ингибирует трансляцию и стабилизирует мРНК [10]. Этот механизм очень важен для половых клеток, особенно ооцитов. Показано, что нокаут гомолога Ybx1, основного зародышевого белка MSY2 мыши, приводит к дестабилизации мРНК и, следовательно, к остановке роста и созреванию ооцитов [11]. В ооцитах MSY2 упаковывает мРНК в очень компактные комплексы, недоступные для клеточного аппарата деградации мРНК. Во время созревания ооцитов MSY2 фосфорилируется киназой CDK1, что вызывает переход MSY2-содержащих мРНК в менее компактные комплексы. Таким образом, запускается и трансляция, и распад мРНК [12]. Кроме этого, в случае развивающихся эмбрионов важно, чтобы материнские мРНК локализовались в определенных областях ооцита или эмбриона, где они затем транслируются в белок. Это помогает установить асимметрию в развивающемся организме, т.е. производить ткани, которые в конечном итоге станут верхней или нижней, передней или задней, левой или правой частью организма. Показано, что у эмбрионов рыбки *Danio rerio* Ybx1 не только предотвращает преждевременную трансляцию и передачу сигналов Sqt/Nodal, но и участвует в локализации транскриптов *Sqt/Nodal* в дорсальной половине эмбриона [13].

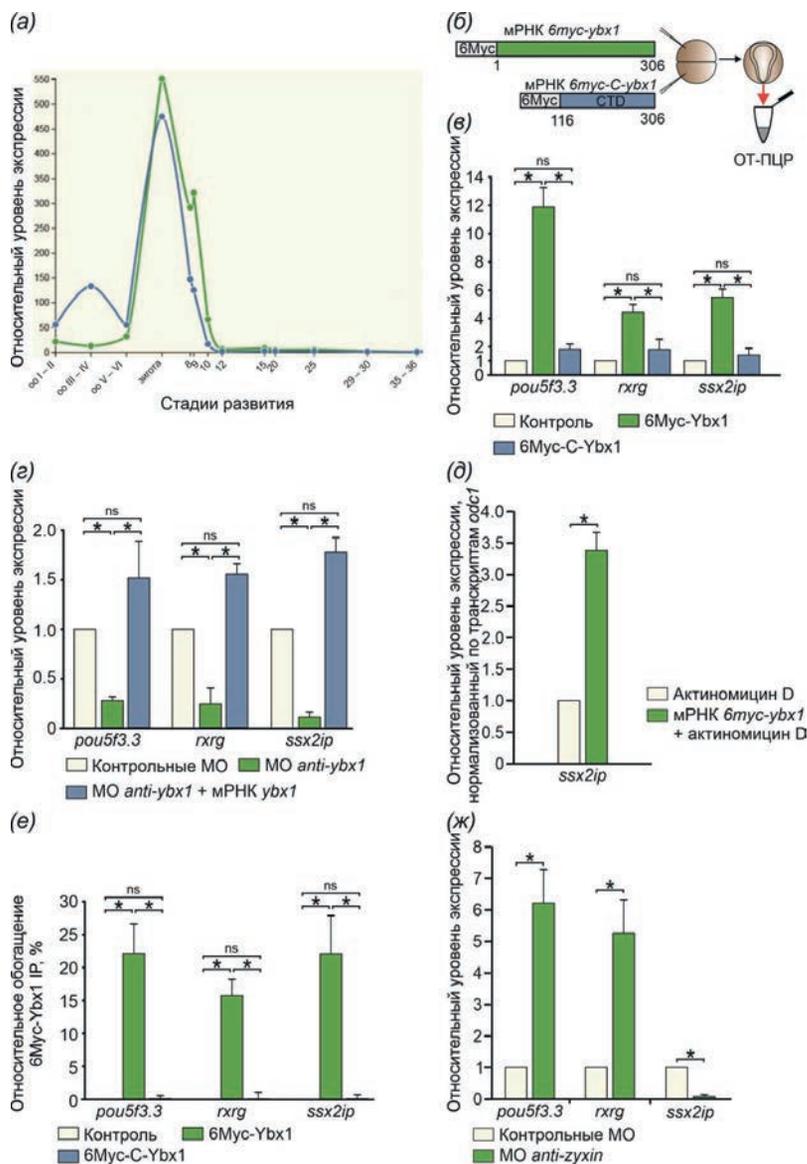
Изучение регуляции экспрессии Ssx2ip представляет интерес в связи с тем, что этот белок участвует в закоривании микротрубочек на centrosome, вовлечен в организацию актинового цитоскелета [14] и, взаимодействуя с несколькими мембранными белками в ресничках, принимает участие в процессе цилиогенеза. Кроме этого, показана важная функция данного белка в раннем развитии: нокаут Msd1, ортолога Ssx2ip из рыбки *D. rerio*, вызывает нарушение лево-правой асимметрии эмбриона [15]. Следует отметить, что участие гена *ssx2ip* в эмбриональном развитии только начинает привлекать внимание исследователей. Совсем недавно появилась работа с использованием эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* [16], в которой было обнаружено его взаимодействие с N-концевым доменом белка Wtip (Wilms tumor-1-interacting

protein), представляющим собой адаптер, который содержит LIM-домены и модулирует сократимость актомиозина и цилиогенез у эмбрионов *X. laevis*. Wtip – представитель семейства зиксин-подобных белков. Его C-конец Wtip с тремя LIM-доменами ассоциирован с актин-связывающим белком Shroom3 и модулирует апикальное сужение в эктодерме клетки [16]. В то же время N-концевой домен Wtip локализуется в базальных тельцах в многореснитчатых клетках [16], и его взаимодействующие партнеры были неизвестны до этого исследования. Интересно, что одновременный нокаут двух генов – *wtip* и *ssx2ip* – у ранних эмбрионов *X. laevis* выявил функциональное взаимодействие их белков во время закрытия нервной трубки [16]. Это указывает на возможную роль комплекса Wtip с Ssx2ip в ремоделировании клеточных контактов при морфогенезе нервной трубки.

В нашей предыдущей работе мы показали, что в раннем эмбриогенезе шпорцевой лягушки Ybx1 взаимодействует с белком зиксином, родственным Wtip [17]. Такое взаимодействие приводит к вытеснению мРНК белка эмбрионального стволового статуса клеток, Pou5f3.3 (ортолог OCT4 млекопитающих), а также мРНК рецептора ретиноевой кислоты Rxrg из их комплекса с Ybx1, что приводит к дестабилизации этих мРНК [17, 18]. Соответственно, искусственное снижение концентрации белка зиксина в эмбрионе вызывало увеличение концентрации мРНК *pou5f3.3* и *rxrg*. В результате широкоформатного поиска с применением секвенирования нового поколения генов, экспрессия которых изменяется в клетках эмбриона шпорцевой лягушки *X. laevis* в ответ на искусственное подавление экспрессии гена *zuxin*, помимо генов *pou5f3.3* и *rxrg* мы обнаружили ген *ssx2ip* [17, 18], кодирующий белок Ssx2ip. В связи с этим мы предположили, что стабильность мРНК *ssx2ip* может регулироваться аналогично мРНК *pou5f3.3* и *rxrg*, т.е. за счет образования комплекса с белком-шапероном рибонуклеопротеиновых комплексов Ybx1 [19].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проверки профиля экспрессии *ssx2ip* по стадиям развития у эмбрионов *X. laevis* по имеющейся базе данных Xenbase (<https://www.xenbase.org/xenbase/>) оказалось, что это материнский ген, т.е. его мРНК запасается в ооцитах, сохраняется на ранних стадиях дробления и после активации генома зародыша уничтожается (рис. 1а, профили экспрессии). Поскольку мы показали способность белка Ybx1 специфично связывать и предохранять именно материнскую



**Рис. 1.** (а) – Профиль экспрессии материнского гена *ssx2ip* (L-гомолог – зеленый, S-гомолог – синий) по стадиям развития лягушки *X. laevis* (по Xenbase); (б) – схема эксперимента по микроинъекциям в эмбрионы *X. laevis*; (в) – влияние экзогенных белков 6Мус-Ybx1 и 6Мус-C-Ybx1 на уровень мРНК гена *ssx2ip* в сравнении с ранее обнаруженными [17, 18] генами *pou5f3.3* и *rxrg*, выявленное методом ОТ-ПЦР (\*  $p < 0.05$ , ns – статистически незначимо); (г) – влияние подавления трансляции морфолиновыми олигонуклеотидами (МО) мРНК *ybx1* на количество мРНК материнских генов *pou5f3.3*, *rxrg*, *ssx2ip* и восстановление нормального уровня этих транскриптов инъекцией синтетической РНК *6musc-ybx1*, выявленное методом ОТ-ПЦР (\*  $p < 0.01$ , ns – статистически незначимо); (д) – уровень мРНК *ssx2ip* в ответ на микроинъекции синтетической мРНК *6musc-ybx1* в условиях блокирования транскрипции актиномицином D, выявленное методом ОТ-ПЦР (\*  $p < 0.05$ , ns – статистически незначимо). Для нормализации данных использовали ОТ-ПЦР с мРНК гена домашнего хозяйства *odc1*. Все вышеприведенные данные, выявленные методом ОТ-ПЦР, представлены в виде кратного изменения экспрессии генов в опытных эмбрионах по сравнению с экспрессией в контрольных эмбрионах. Во всех случаях для нормализации данных использовали гены *odc1* и *eef1a1*, показаны стандартные отклонения, полученные в результате трех независимых экспериментов; (е) – результаты РНК-иммунопреципитации: осаждение факторами 6Мус-Ybx1 и 6Мус-C-Ybx1 мРНК *ssx2ip* в сравнении с ранее изученными мРНК *rxrg* и *pou5f3.3* [17, 18] (\*  $p < 0.01$ , ns – статистически незначимо). В качестве контроля использовали смолу с антителами анти-Flag. Данные представлены в виде процентного соотношения связавшихся мРНК к общему количеству данной мРНК в лизате. Во всех случаях показаны стандартные отклонения, полученные в результате трех независимых экспериментов; (ж) – эффект от подавления трансляции мРНК цитоскелетного белка зиксина морфолиновыми олигонуклеотидами (\*  $p < 0.05$ , ns – статистически незначимо). Количество мРНК *ssx2ip* уменьшается, в то время как уровень мРНК генов *pou5f3.3* и *rxrg* возрастает в ответ на нокадаун гена *zyxin*.

мРНК от деградации [17, 18], было интересно проверить этот феномен на материнской мРНК еще одного гена.

Исследования проводили по предложенной ранее [17, 18] схеме: во-первых, посмотрели ответ на усиление/подавление уровня фактора Ybx1 и проверили специфичность результатов методом “спасения” (*rescue*); во-вторых, исключили возможность активации экспрессии гена *ssx2ip* фактором Ybx1, подтвердив увеличение количества его мРНК в условиях тотального подавления транскрипции; в-третьих, проверили методом рибоиммунопреципитации (RIPA) способность Ybx1 к образованию комплексов непосредственно с мРНК гена *ssx2ip*.

Для усиления экспрессии Ybx1 мы использовали имеющиеся плазмиды для получения синтетической мРНК, кодирующие полноразмерный меченный 6Мус-эпитопом фактор Ybx1 (6Мус-Ybx1) и делеционный мутант Ybx1 (6Мус-C-Ybx1) без N-концевой части, включающей домен холодового шока (CSD) [17]. Укороченный с N-конца мутант, лишенный CSD, использовали в качестве отрицательного контроля. Схемы конструкций приведены на рис. 1б. Микроинъекции РНК в эмбрионы проводили в два бластомера с инкубацией до стадии гастрюлы (11-я стадия). Далее зародыши лизировали, выделяли тотальную РНК [17, 18], а затем проводили количественную оценку транскриптов исследуемого гена и материнских генов *pou5f3.3* и *rxrg* в качестве положительного контроля методом ОТ-ПЦР.

В результате мы показали, что сверхэкспрессия только полноразмерного фактора 6Мус-Ybx1 приводит к значительному увеличению количества транскриптов *ssx2ip*, сравнимому с уровнем усиления экспрессии гена *pou5f3.3* (рис. 1в).

При подавлении экспрессии Ybx1 наблюдалось уменьшение количества мРНК *ssx2ip*, но при добавлении синтетической мРНК *6мус-Ybx1* происходило восстановление (спасение, *rescue*) исходного уровня транскриптов *ssx2ip* (рис. 1з). Это подтверждает специфичность наблюдаемого ответа на изменение уровня Ybx1.

Экспрессию Мус-тагированного Ybx1 и его делеционного мутанта подтверждали методом вестерн-блоттинга. С использованием антител к Мус-пептиду были детектированы полосы с соответствующей расчетным молекулярным массам электрофоретической подвижностью (45 кДа для 6Мус-C-Ybx1 и 60 кДа для 6Мус-Ybx1 [17]).

Для проверки возможности активации транскрипции мРНК *ssx2ip* мы проверили изменение ее количества в ответ на повышение концентрации Ybx1 в условиях тотального ингиби-

рования транскрипции актиномицином D. Мы использовали отработанную ранее методику по инъекциям ингибитора транскрипции в полость бластоцеля [17]. Поскольку при полном ингибировании транскрипции уровень мРНК *ssx2ip* у эмбрионов со сверхэкспрессией Ybx1 был намного выше, чем у контрольных, мы подтвердили, что это увеличение происходит за счет стабилизации материнской мРНК, накопленной в ооцитах (рис. 1д).

Полученные результаты дают возможность предположить, что белок Ybx1 связывает мРНК *ssx2ip*, образуя стабильный рибонуклеопротеиновый комплекс. Применяя разработанный нами метод RIPA (RiboImmunoPrecipitation) [20], мы показали образование комплекса между полноразмерным 6Мус-Ybx1 и мРНК *ssx2ip*, которое сравнили с изученными генами *pou5f3.3* и *rxrg*. Следует отметить, что делеционный мутант 6Мус-C-Ybx1, лишенный CSD и содержащий только C-концевой домен, и в этом случае не смог образовать устойчивый комплекс, что доказывает необходимость наличия домена холодового шока для взаимодействия Ybx1 с РНК.

Ранее мы показали, что при понижении уровня цитоскелетного белка зиксина происходит возрастание уровня мРНК двух материнских генов: гена *pou5f3.3*, маркера стволовых клеток, гомолога известного фактора млекопитающих OCT4, и гена *rxrg*, ядерного рецептора ретиноевой кислоты, и что механизм этого явления связан с отрицательным влиянием зиксина на стабильность комплексов этих мРНК с фактором Ybx1 [17, 18].

Было интересно проверить, как влияет подавление зиксина, компонента комплекса фокальной адгезии, на уровень мРНК белка Ssx2ip. Мы использовали отработанную ранее методику подавления трансляции зиксина в клетках эмбрионов морфолиновыми олигонуклеотидами (МО) [17, 18, 21]. В качестве положительных контролей выбрали гены *pou5f3.3* и *rxrg*, экспрессия которых стабильно повышается при подавлении зиксина [17]. В результате мы обнаружили, что в отличие от двух ранее изученных нами генов, в ответ на подавление зиксина наблюдается уменьшение количества транскриптов *ssx2ip* (рис. 1ж). Это наводит на предположение о том, что стабильность мРНК *ssx2ip* регулируется с участием зиксина, возможно, по другому механизму. Эти данные имеют большую ценность, поскольку показывают, что, во-первых, предложенный нами ранее механизм регуляции стабильности мРНК генов стволового статуса клеток за счет взаимодействия зиксина и Ybx1 специфичен именно для генов, участвующих в регуляции дифференцировки клеток; во-вторых, учитывая данные по ассоциации Ssx2ip с Wtip, не исключена

возможность взаимной регуляции экспрессии цитоскелетных белков *Ssx2ip* и зиксина на ранних стадиях развития. Идентификация материнского гена *ssx2ip*, стабильность транскриптов которого зависит от *Ybx1* по зиксин-независимому механизму, открывает перспективы по поиску и изучению других механизмов регуляции стабильности и, возможно, трансляционной активности материнских мРНК, взаимодействующих с фактором *Ybx1*.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Получение векторов.** Стратегии создания ДНК-конструкций подробно описаны в работе Parshina et al. [17]. Векторные конструкции для экспрессии белка *Ybx1* (Gene ID: 379054, база данных NCBI) представлены в табл. 1.

**Получение синтетической мРНК и микроинъекции мРНК в зародыши *X. laevis*.** Получение зародышей *X. laevis* и искусственное оплодотворение, а также синтез мРНК и микроинъекции проводили по методике, разработанной нами ранее [21].

**Выделение тотальной РНК из эмбрионов *X. laevis*, получение кДНК и ОТ-ПЦР.** Зародыши

*X. laevis* лизировали в тризоле и выделяли тотальную РНК [17, 18] с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) и набора CleanRNA (Евроген) в соответствии с инструкциями производителя. кДНК синтезировали с использованием набора MMLV RT (Евроген) из 250 нг РНК-образца, а для ПЦР применяли qPCRmix-HS SYBR (Евроген). ОТ-ПЦР проводили в амплификаторе DTPprime 4 qPCR (ДНК-Технология, Россия) по методике, разработанной нами ранее [17, 21]. Последовательности праймеров представлены в табл. 2. В качестве положительных контролей использовали материнские гены *pou5f3.3* и *rxrg*. Для проверки статистической достоверности данные ОТ-ПЦР, полученные от трех независимых экспериментов, переносили в программу Microsoft Excel и анализировали с использованием метода  $\Delta\Delta Ct$  [22]. Для нормирования уровня экспрессии генов в качестве внутренних контролей использовали уровни экспрессии генов *eef1a1* и *odc1*, кодирующих, соответственно, фактор элонгации EF-1 $\alpha$  и орнитиндекарбоксилазу (ODC).

**Блокирование трансляции эндогенной мРНК инъекцией антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов (МО).** Для подавления экс-

**Таблица 1.** Векторные конструкции на основе плазмиды pCS2-MT для экспрессии белка *Ybx1*

ДНК-конструкция	Праймеры и стратегии клонирования, использованные для создания ДНК-матриц для синтетических мРНК
pCS2MT-Ybx1	1) ПЦР с тотальной кДНК <i>X. laevis</i> с праймерами: F 5'-ATGCCCATGGTTATGAGC-AGCGAGGTTGAAACAC-3' и R 5'-ATGCCTCGAGTTACTCAGCCCCGCCCTGCT-CAGCC-3' 2) Рестрикция по сайтам NcoI и XhoI, лигирование в плазмиду pCS2-MT
pCS2MT-CTD Ybx1	1) Рестрикция pB42-CTD Ybx1 по сайтам EcoRI и XhoI 2) Клонирование CTD Ybx1 в плазмиду pCS2-MT R1

**Таблица 2.** Праймеры для ОТ-ПЦР, использованные в работе

Ген	Последовательности праймеров (5'-3')	Длина ПЦР-фрагмента, п.н.
<i>odc1</i>	F: GCCAGTTCTAACAAAGAAACCCA R: TCTACGATACGATCCAGCCCA	93
<i>eef1a1</i>	F: GTTCATTTACCGCACAGGTTATCA R: ACACAGGGGCATATCCAGCA	70
<i>ssx2ip</i>	F: TCGTGTGTCCTTGCTATTCCT R: CCAACATAAAAGAGTTTGAGGGGA	91
<i>rxrg</i>	F: CTTCCTTCTCGCACCGCTC R: GCCTACTCCCGCATTGTGT	98
<i>pou5f3.3</i>	F: CACA AAACTGGACTTACTGGGG R: TCTCAACTGCCCTTACCTTCTC	70

прессии Ybx1 трансляцию его эндогенной мРНК блокировали путем инъекций антисмысловых (анти-Ybx1) морфолиновых олигонуклеотидов (МО, 0.5 мМ) в два бластомера на стадии начала дробления, инкубировали также до стадии 13, гастролы [17].

**Блокирование транскрипции актиномицином D.** Транскрипцию в эмбрионах *X. laevis* подавляли путем микроинъекции 0.2 мМ актиномицина D (Sigma, США) в бластоцель на стадии 7. Эмбрионы развивались до стадии 13.

**Осаждение рибонуклеопротеиновых комплексов методом рибонуклеопротеинового осаждения (RIPA).** Осаждение рибонуклеопротеиновых комплексов проводили из лизатов зародышей *X. laevis* на стадии ранней гастролы, инъекцированных синтетическими мРНК, кодирующими полноразмерный белок 6Мус-Ybx1 (опыт) и делеционный мутант 6Мус-С-Ybx1 (отрицательный контроль). Для осаждения использовали разработанную нами ранее методику [17, 20].

**Гель-электрофорез и иммуноблоттинг.** Уровень белков Ybx1, 6Мус-Ybx1 и 6Мус-С-Ybx1 измеряли по разработанной нами методике [21] на лизатах эмбрионов *X. laevis* с помощью SDS-PAGE с последующим вестерн-блоттингом. Мус-содержащие белки детектировали при помощи моноклональных анти-Мус-антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой (Sigma, США). Стабилизированный субстрат Western Blue (Promega, США) использовали для обнаружения антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы установили, что белок Ybx1 способен связывать и стабилизировать мРНК, кодирующую белок Ssx2ip (synovial sarcoma X breakpoint 2 interacting protein), в клетках раннего эмбриона шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*.

Однако в отличие от мРНК *pou5f3.3* и *rxxg*, искусственное снижение концентрации зиксина в эмбрионе приводило не к увеличению, а к снижению концентрации мРНК *ssx2ip*, что указывает на возможно иной механизм регуляции белком зиксином стабильности этой мРНК.

Полученные результаты, во-первых, расширяют список мРНК, взаимодействующих в раннем эмбриогенезе с РНК-связывающим белком Ybx1, а во-вторых, открывают перспективу для изучения возможной роли цитоскелетного белка зиксина в регуляции экспрессии Ssx2ip в эмбриональном развитии.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-30005 (<https://rscf.ru/project/23-74-30005/>).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sun J., Yan L., Shen W., Meng A. // Development. 2018. V. 145. P. dev166587. <https://doi.org/10.1242/dev.166587>
2. Abrams E.W., Mullins M.C. // Curr. Opin. Genet. Dev. 2009. V. 19. P. 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.06.002>
3. Bazzini A.A., Del Viso F., Moreno-Mateos M.A., Johnstone T.G., Vejnar C.E., Qin Y., Yao J., Khokha M.K., Giraldez A.J. // EMBO J. 2016. V. 35. P. 2087–2103. <https://doi.org/10.15252/embj.201694699>
4. Chen J., Torcia S., Xie F., Lin C.J., Cakmak H., Franciosi F., Horner K., Onodera C., Song J.S., Cedars M.I., Ramalho-Santos M., Conti M. // Nat. Cell. Biol. 2013. V. 15. P. 1415–1423. <https://doi.org/10.1038/ncb2873>
5. Miao L., Yuan Y., Cheng F., Fang J., Zhou F., Ma W., Jiang Y., Huang X., Wang Y., Shan L., Chen D., Zhang J. // Development. 2017. V. 144. P. 128–138. <https://doi.org/10.1242/dev.144642>
6. Sha Q.Q., Dai X.X., Dang Y., Tang F., Liu J., Zhang Y.L., Fan H.Y. // Development. 2017. V. 144. P. 452–463. <https://doi.org/10.1242/dev.144410>
7. Tadros W., Goldman A.L., Babak T., Menzies F., Vardy L., Orr-Weaver T., Hughes T.R., Westwood J.T., Smibert C.A., Lipshitz H.D. // Dev. Cell. 2007. V. 12. P. 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.005>
8. Winata C.L., Łapiński M., Pryszcz L., Vaz C., Bin Ismail M.H., Nama S., Hajan H.S., Lee S.G.P., Korzh V., Sampath P., Tanavde V., Mathavan S. // Development. 2018. V. 145. P. dev159566. <https://doi.org/10.1242/dev.159566>

9. Giraldez A.J., Mishima Y., Rihel J., Grocock R.J., Van Dongen S., Inoue K., Enright A.J., Schier A.F. // *Science*. 2006. V. 312. P. 75–79.  
<https://doi.org/10.1126/science.112268910>
10. Evdokimova V., Ruzanov P., Imataka H., Raught B., Svitkin Y., Ovchinnikov L.P., Sonenberg N. // *EMBO J*. 2001. V. 20. P. 5491–5502.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.19.5491>
11. Medvedev S., Pan H., Schultz R.M. // *Biol. Reprod*. 2011. V. 85. P. 575–583.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091710>
12. Medvedev S., Yang J., Hecht N.B., Schultz R.M. // *Dev. Biol*. 2008. V. 321. P. 205–215.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.06.016>
13. Kumari P., Gilligan P.C., Lim S., Tran L.D., Winkler S., Philp R., Sampath K. // *ELife*. V. 2. P. e00683.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.00683>
14. Asada M., Irie K., Morimoto K., Yamada A., Ikeda W., Takeuchi M., Takai Y. // *J. Biol. Chem*. 2003. V. 278. P. 4103–4111.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M209832200>
15. Hori A., Ikebe C., Tada M., Toda T. // *EMBO Rep*. 2014. V. 15. P. 175–184.  
<https://doi.org/10.1002/embr.201337929>
16. Reis A.H., Xiang B., Ossipova O., Itoh K., Sokol S.Y. // *PLoS One*. 2021. V. 16. P. e0259068.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259068>
17. Parshina E.A., Eroshkin F.M., Orlov E.E., Gyoeva F.K., Shokhina A.G., Staroverov D.B., Belousov V.V., Zhigalova N.A., Prokhortchouk E.B., Zاراisky A.G., Martynova N.Y. // *Cell Rep*. 2020. V. 33. P. 108396.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108396>
18. Parshina E.A., Orlov E.E., Zاراisky A.G., Martynova N.Y. // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. V. 23. P. 5627.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23105627>
19. Eliseeva I.A., Kim E.R., Guryanov S.G., Ovchinnikov L.P., Lyabin D.N. // *Biochemistry (Moscow)*. 2011. V. 76. P. 1402–1433.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297911130049>
20. Martynova N.Y., Parshina E.A., Zاراisky A.G. // *STAR Protoc*. 2021. V. 2. P. 100552.  
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100552>
21. Martynova N.Y., Parshina E.A., Eroshkin F.M., Zاراisky A.G. // *Russ. J. Bioorg. Chem*. 2020. V. 46. P. 530–536.  
<https://doi.org/10.31857/S013234232004020X>
22. Livak K.J., Schmittgen T.D. // *Methods*. 2001. V. 25. P. 402–408.  
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

## The Ribonucleoprotein Complex Factor Ybx1 Stabilizes the Maternal mRNA of the *ssx2ip* Gene Encoding the Centrosome Maturation Protein in *Xenopus laevis* Embryogenesis

E. A. Parshina\*, A. G. Zاراisky\*, and N. Y. Martynova\*,#

# Phone: +7 (916) 181-16-32; e-mail: martnat61@gmail.com

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

Our study investigates the mechanisms that regulate early developmental gene expression in *Xenopus laevis* frog embryos. Our previous study demonstrated that maternal mRNAs of two developmentally significant genes, the nuclear retinoic acid receptor *rxrg* and the pluripotency factor *pou5f3*, form complexes with ribonucleoprotein complex Ybx1. Based on the results of the present study, we determined and demonstrated that the stability of the maternal mRNA *ssx2ip*, which encodes a conserved protein, also called Msd1 or ADIP, which is involved in centrosome maturation, is dependent on Ybx1. This research shows that Ybx1 forms a ribonucleoprotein complex with *ssx2ip* mRNA, which is mediated by its cold shock domain (CSD). This study confirms our hypothesis of Ybx1 selectively binding to maternal transcripts. It opens up new opportunities to study new mechanisms of gene expression regulation at the earliest stages of development by searching for possible *cis*-motifs for recognition by *trans*-regulators such as Ybx1.

*Keywords:* embryogenesis, ribonucleoprotein complex, mRNA, Ybx1 protein, maternal transcripts, *ssx2ip*



УДК 577.112.6;577.322.4

# ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ТРОЙНОГО МУТАНТА БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОКАЛИНА С ХРОМОФОРОМ DiB3-F53L/F74L/L129M

© 2024 г. А. В. Россохин\*, \*\*, Е. А. Горячева\*, #, И. В. Артемьев\*, С. Ф. Архипова\*,  
А. Р. Гильванов\*, Н. В. Плетнева\*, В. З. Плетнев\*

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

\*\* Научный центр неврологии, Институт мозга, Россия, 105064 Москва, пер. Обуха, 5

Поступила в редакцию 10.11.2023 г.

После доработки 16.11.2023 г.

Принята к публикации 17.11.2023 г.

Методом молекулярной динамики установлена пространственная организация DiB3-F53L/F74L/L129M – тройного мутанта флуоресцентного нековалентного комплекса генно-инженерного варианта бактериального белка липокалина B1c с синтетическим GFP-подобным хромофором M739. Установлено, что область связывания хромофора в исследуемом комплексе близка к DiB1 и отличается от альтернативной области в DiB3. Данный комплекс отличается повышенной яркостью флуоресценции по сравнению с комплексами хромофора с другими генно-инженерными вариантами липокалина, что выдвигает его в число перспективных маркеров биологических объектов в клеточной биологии.

*Ключевые слова:* хромофор, флуороген-активирующий белок, молекулярная динамика

**DOI:** 10.31857/S0132342324030146, **EDN:** NXOXAI

## ВВЕДЕНИЕ

Природные липокалины представляют собой семейство небольших белков, встречающихся в различных биологических системах [1]. Они имеют общую  $\beta$ -структурную укладку и обладают способностью к комплексообразованию с малыми молекулами для различных физиологических целей. Охарактеризовано более десяти различных изоформ липокалина с разной специфичностью к лиганду или физиологической функцией. Биомаркеры группы DiB – первые примеры использования бактериального липокалина B1c для создания новых флуоресцентных биомаркеров на основе нековалентных комплексов генно-инженерных вариантов B1c (в качестве флуороген-активирующего белка, ~20 кДа) с синтетическим GFP-подобным хромофором M739 (рис. 1, табл. 1) [2–4]. При создании систем маркировки для

целей клеточной биологии липокалин B1c оказался многообещающим каркасом для связывания флуорогена M739. Отдельные комплексы липокалина демонстрируют яркую флуоресценцию и существенно более высокую фотостабильность, чем коммерческие GFP-подобные биомаркеры. При этом в одном эксперименте можно на основе флуорогена комбинировать различные системы мечения с временным разделением. В настоящей работе представлены результаты расчета пространственной организации тройного мутанта DiB3-F53L/F74L/L129M методом молекулярной динамики.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кристаллическая структура родственного флуоресцентного комплекса DiB1 была установлена рентгеноструктурным методом с разрешением 1.58 Å (PDB: 6UBO) [3]. В отличие от флуорес-

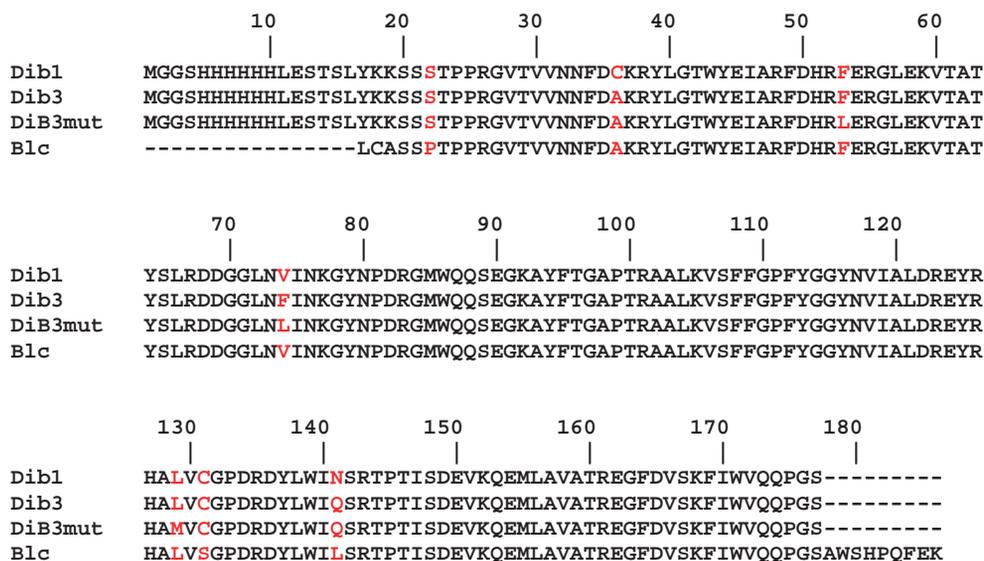
Сокращения: МД – молекулярная динамика; B1c – бактериальный липокалин; GFP – зеленый флуоресцентный белок.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-75-10; эл. почта: goryacheva@ibch.ru).

центных GFP-подобных белков с укладкой белковой цепи в виде  $\beta$ -бочонка из 11 антипараллельных  $\beta$ -сегментов, пространственная структура мономера B1c принимает форму  $\beta$ -бочонка из 8 антипараллельных  $\beta$ -сегментов с присоединенным  $\alpha$ -спиральным фрагментом на C-концевом участке. Четыре петли, расположенные с противоположной стороны от N-конца, образуют овальный ( $8 \times 11 \text{ \AA}$ ) вход в узкую удлиненную полость белка глубиной  $\sim 19 \text{ \AA}$ . На дне полости располагаются гидрофильные остатки (Glu45, Glu54, Asn76, Asn141 и Tyr116), а область ближе к выходу заселена в основном гидрофобными остатками (Gly114/115, Val106/130, Pro133, Trp139, включая гидрофобные части Tyr116 и Tyr137).

В исследуемом комплексе полость белка B1c обеспечивает специфическое связывание трициклического хромофора M739 (рис. 2 и 3). Гидро-

фильное пятичленное кольцо хромофора располагается вблизи гидрофильного дна полости липокалина, а гидрофобное шестичленное кольцо – в гидрофобной части у входа в полость. Положение хромофора M739 в полости белка B1c стабилизируется тремя H-связями с боковыми цепями Asn76, Trp139 и Gln141. Дополнительный вклад в специфическое связывание вносит  $\pi$ -стэкинг хромофора с ароматическим остатком Trp139, а также ряд гидрофобных контактов. Три аминокислотные замены Phe53Leu, Phe74Leu и Leu129Met в DiB3 (рис. 1) увеличивают стереохимическую комплементарность хромофора в полости липокалина, что приводит к усилению его связывания, сопровождаемому существенным увеличением яркости и заметным смещением спектральных полос возбуждения и эмиссии (табл. 1). При этом замены конформационно жестких остатков Phe53 и Phe74 на относительно

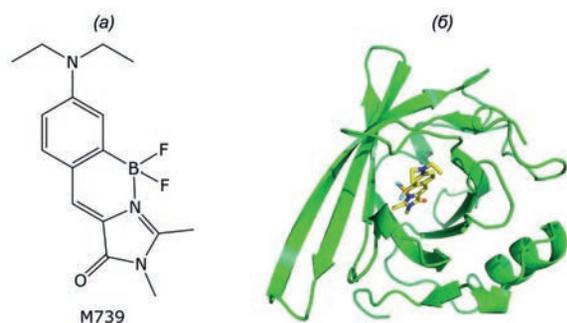


**Рис. 1.** Сравнение аминокислотных последовательностей родительского бактериального липокалина B1c [2] и его мутантов в комплексах с синтетическим GFP-подобным хромофором M739 [3]. Аминокислотные замены выделены красным цветом. DiB3mut – тройной мутант DiB3-F53L/F74L/L129M.

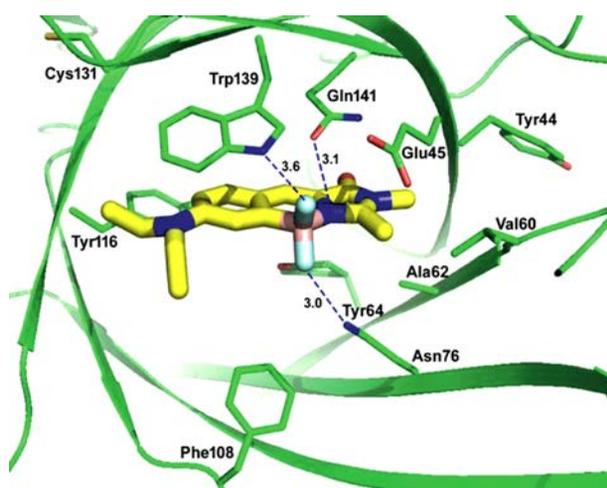
**Таблица 1.** Фотофизические свойства флуоресцентных комплексов генно-инженерных вариантов липокалина с GFP-подобным хромофором M739

Флуоресцентный комплекс	$\lambda_{ex}$ , нм	$\lambda_{em}$ , нм	QY	EC, $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Относительная яркость *
DiB1 [4]	513	542	32	45 800	0.44
DiB3 [4]	546	565	16	45 600	0.22
DiB3-F53L/F74L/L129M [3]	509	546	51	65 700	1.00

\* Яркость, равная произведению квантового выхода (QY) на коэффициент экстинкции (EC), представлена в относительных величинах.



**Рис. 2.** (а) – Структурная формула хромофора M739; (б) – пространственная структура комплекса липокалина (показан зеленым) с хромофором (показан желтым).



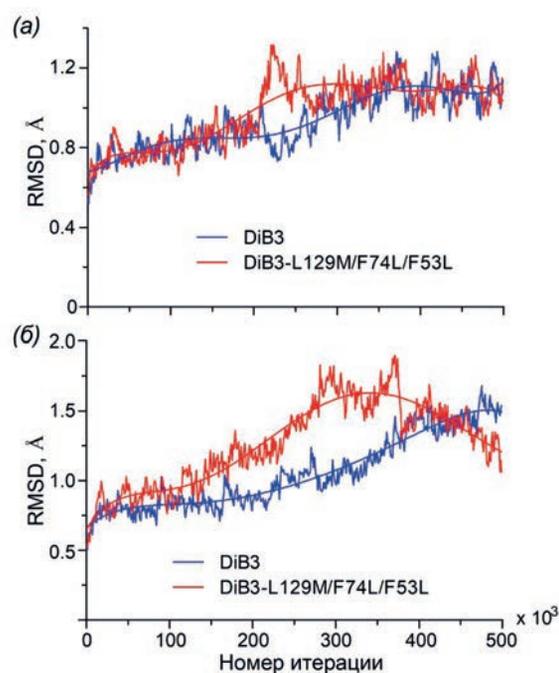
**Рис. 3.** Ближайшее аминокислотное окружение хромофора M739 в связывающей полости липокалина.

гибкий Leu увеличивают связывание хромофора в полости белка. Существенное увеличение яркости мутанта DiB3-F53L/F74L/L129M по сравнению с родительским белком DiB3 указывает на более сильное связывание хромофора с повышенным экранированием от растворителя.

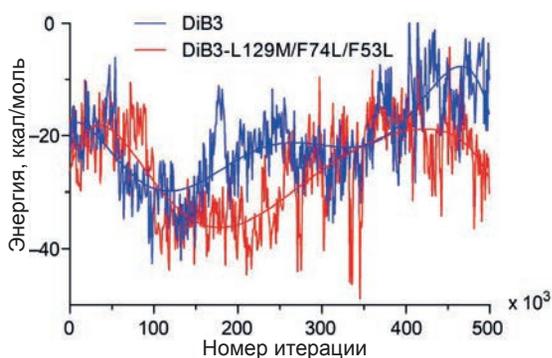
Суперпозиция структур DiB1 и комплекса флуоресцентного белка сандерцианина с биливердином IX $\alpha$  предполагает наличие в липокалинах двух сайтов связывания, способных к  $\pi$ -стэкингу с хромофором. Первый сайт, установленный в комплексах DiB1 и DiB3-F53L/F74L/L129M, содержит ароматический остаток Trp139 в стэкинговзаимодействии с хромофором. В сандерцианине он отсутствует, в этой позиции располагается Ser. Второй минорный сайт, установленный в сандерцианине и в других липокалинах, представляет собой “сэндвич” из двух ароматических боковых

цепей Phe53 и Phe108. Аналогично сандерцианину низкоаффинный комплекс DiB3 связывает хромофор в минорном центре за счет  $\pi$ -стэкинга между двумя ароматическими остатками Phe53 и Phe108. При этом, заметное различие фотофизических характеристик DiB3-F53L/F74L/L129M и DiB3 неявным образом подтверждает существование в полости белка обоих центров связывания хромофора.

Расчеты методом молекулярной динамики (МД) продемонстрировали конформационную устойчивость обоих комплексов. Соответствующие значения RMSD ( $0.95 \pm 0.15$  и  $1.35 \pm 0.19$ ) вышли на плато, что указывает на стабильность структур родительского белка и его тройного мутанта (рис. 4а). В случае управляемой процедуры МД при протяжке молекулы хромофора вглубь полости белка структура претерпевает локальные конформационные изменения (рис. 4б), которые не приводят к потере нативной структуры (значения RMSD для DiB3 –  $1.0 \pm 0.27$  и его тройного мутанта –  $1.5 \pm 0.3$ ). Для тройного мутанта DiB3-F53L/F74L/L129M величина энергии хромофор–белок находится на стабильно более отрицательном уровне по сравнению с DiB3, что предполагает более сильные взаимодействия между хромофором и белком на протяжении практически всей траектории движения хромофора (рис. 5).



**Рис. 4.** Зависимость RMSD (Å) атомов основной цепи белка от времени (номер итерации 500 = 1 нс): без хромофора (а) и при протяжке хромофора вдоль полости белка (б).



**Рис. 5.** Зависимость энергии взаимодействия хромофор–белок от времени (номер итерации 500 = 1 нс) при протяжке хромофора внутри связывающей полости.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Поиск основного центра связывания в исследуемом тройном мутанте DiB3-F53L/F74L/L129M выполняли расчетным методом молекулярной динамики (МД) [5, 6] при протяжке молекулы хромофора вглубь связывающей полости белка В1с. Стартовую модель белка получали на основе рентгеновской пространственной структуры DiB1 введением соответствующих аминокислотных замен (рис. 1) на стереографической станции с помощью программы молекулярной графики COOT [7].

Расчеты МД выполняли в полноатомном приближении при температуре 300 К на основе силового поля CHARMM36 [8] с использованием модели явного растворителя. Учет энергетического вклада от электростатических взаимодействий атомов проводили по методу Эвальда [9, 10]. Протяжку лиганда в полости белка осуществляли при помощи системы коллективных переменных Colvars, реализованной в программе NAMD [11]. К условной переменной “dist”, определяющей расстояние между центром массы хромофора и С $\alpha$ -атомом реперного остатка Q141 в глубине связывающей полости белка, прикладывали гармонический потенциал с силовой константой 20 (ккал/моль) ( $\text{\AA}^2$ )<sup>-1</sup>. При этом 500 000 шагов по данной процедуре привело к уменьшению

расстояния с 20 до 8  $\text{\AA}$  – от начальной позиции хромофора у входа в связывающую полость белка до максимально возможной удаленной позиции в глубине полости. Расчеты движения хромофора по траектории в полости белка включали этапы минимизации общей энергии, термодинамического уравнивания и МД (с временным шагом 2 фс). На первых двух этапах положения С $\alpha$ -атомов белка и неводородных атомов хромофора фиксировали. На завершающем этапе МД все ограничители снимали. Для вычислений и визуализации траекторий использовали программы NAMD [11] и VMD [12] соответственно, для параметризации лиганда (молекулы хромофора) – сетевой ресурс CGenFF (<https://cgenff.silcsbio.com/>).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Флуоресцентная визуализация объектов в живых клетках остается технически сложной задачей, в основном из-за фоторазложения флуоресцентных меток. Эта проблема эффективно решается на основе современного подхода путем использования нековалентных комплексов флуорогенактивирующих белков с синтетическими красителями – флуорогенами. После фотообесцвечивания флуороген в комплексе заменяется новым доступным в растворе интактным флуорогеном. В этом направлении была создана серия новых флуоресцентных нековалентных комплексов серии DiB – генно-инженерных вариантов бактериального мембранного белка липокалина В1с в комплексе с синтетическим GFP-подобным хромофором. Для изучения структурно-функциональной взаимосвязи мы предприняли систематические структурные исследования белков этой серии экспериментальными и расчетными методами. В настоящей работе представлены результаты расчета пространственной организации тройного мутанта DiB3-F53L/F74L/L129M методом молекулярной динамики. Установлено, что область связывания хромофора в белке соответствует рентгеновской кристаллической структуре родственного комплекса DiB1 и отличается от альтернативного центра связывания в родительском белке DiB3.

Исследованный комплекс – наиболее яркий представитель среди известных биомаркеров серии

DiV, представляющий интерес для практического использования в качестве биомаркера в клеточной биологии.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Расчеты производились на базе центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами ФГБОУ ВО “Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00011).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rothe C., Skerra A.* // *BioDrugs*. 2018. V. 32. P. 233–243.  
<https://doi.org/10.1007/s40259-018-0278-1>
2. *Campanacci V., Bishop R.E., Blangy S., Tegoni M., Cambillau C.* // *FEBS Lett*. 2006. V. 580. P. 877–883.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.086>
3. *Muslinkina L., Gavrikov A.S., Bozhanova N.G., Mishin A.S., Baranov M.S., Meiler J., Pletneva N.V., Pletnev V.Z., Pletnev S.* // *ACS Chem. Biol.* 2020. V. 15. P. 2456–2465.  
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00440>
4. *Bozhanova N.G., Mikhail S., Baranov M.S., Klementieva N.V., Gavrikov A.S., Sarkisyan K.S., Yampolsky I.V., Zagaynova E.V., Lukyanov S.A., Konstantin A., Lukyanov K.A., Mishin A.S.* // *Chem. Sci.* 2017. V. 8. P. 7138–7142.  
<https://doi.org/10.1039/C7SC01628J>
5. *Karplus M., Petsko G.A.* // *Nature*. 1990. V. 347. P. 631–639.  
<https://doi.org/10.1038/347631a0>
6. *Sansom M.S., Adcock C., Smith G.R.* // *J. Struct. Biol.* 1998. V. 121. P. 246–262.  
<https://doi.org/10.1006/jsbi.1997.3950>
7. *Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. P. 486–501.  
<https://doi.org/10.1107/s0907444910007493>
8. *Lee J., Cheng X., Swails J.M., Yeom M.S., Eastman P.K., Lemkul J.A., Wei S., Buckner J., Jeong J.C., Qi Y., Jo S., Pande V.S., Case D.A., Brooks C.L., MacKerell A.D. Jr., Klauda J.B., Im W.* // *J. Chem. Theor. Comput.* 2016. V. 12. P. 405–413.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
9. *Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T., Lee H., Pedersen L.G.* // *J. Chem. Phys.* 1995. V. 103. P. 8577–8593.  
<https://doi.org/10.1063/1.470117>
10. *Darden T., York D., Pedersen L.* // *J. Chem. Phys.* 1993. V. 98. P. 10089–10092.  
<https://doi.org/10.1063/1.464397>
11. *Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kale L., Schulten K.* // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. P. 1781–1802.  
<https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
12. *Humphrey W., Dalke A., Schulten K.* // *J. Mol. Graph.* 1996. V. 14. P. 33–38.  
[https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)

# Tree-Dimensional Structure of the Fluorescent Complex of Bacterial Lipocalin Triple Mutant with Chromophore – DiB3-F53L/F74L/L129M

A. V. Rossokhin<sup>\*, \*\*</sup>, E. A. Goryacheva<sup>\*, #</sup>, I. V. Artemyev<sup>\*</sup>, S. F. Arhipova<sup>\*</sup>, A. R. Gilvanov<sup>\*</sup>, N. V. Pletneva<sup>\*</sup>, and V. Z. Pletnev<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (495) 330-75-10; e-mail: goryacheva@ibch.ru

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

<sup>\*\*</sup> Research Center of Neurology, per. Obuha 5, Moscow, 105064 Russia

The three dimensional structure of DiB3-F53L/F74L/L129M – a triple mutant of the fluorescent non-covalent complex of a genetically engineered variant of the bacterial protein lipocalin Blc with the synthetic GFP-like chromophore M739, has been studied by molecular dynamics methods. It was found that the chromophore binding site in the complex is similar to DiB1 and differs from the alternative site in DiB3. The complex is characterized by increased fluorescence brightness compared to those with other genetically engineered variants of lipocalin, which makes it one of the promising markers of biological objects in cell biology.

*Keywords: chromophore, fluorogen-activating protein, molecular dynamics*