

ISSN 0132-3423

Том 49, Номер 4

Июль - Август 2023



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 49, номер 4, 2023

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

Методы анализа интерактома микробелков, кодируемых короткими открытыми рамками считывания (обзорная статья)

И. А. Седлов, И. А. Фесенко 333

Структурно-функциональные особенности кетозо-3-эпимераз и их использование для производства D-аллюлозы (обзорная статья)

Н. С. Иванова, А. А. Кульминская, С. В. Швецова 348

Роль RIG-I-подобных рецепторов в активации врожденного иммунитета при туберкулезе (обзорная статья)

Ю. В. Скворцова, О. С. Быченко, Т. Л. Ажикина 360

Теоретическое обоснование и формирование экспериментальных подходов к изменению структуры гиалуронидазы на основе ее вычислительного взаимодействия с короткоцепочечными гликозаминогликановыми лигандами (обзорная статья)

А. В. Максименко, Р. Ш. Бибилашвили 369

Внеклеточный белок холодового шока YB-1 индуцирует толерантность к GMDP и LPS в клеточной линии макрофагов мыши J774

Л. Г. Алексеева, А. Г. Ламан, Е. А. Мещерякова, А. О. Шепеляковская, Ф. А. Бровко, В. Т. Иванов 384

Строение сульфатированных полисахаридов из морского огурца *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea*

М. И. Билан, А. С. Дмитренко, С. П. Никогосова, Е. А. Цветкова, Н. Е. Устюжанина, Cao Thi Thuy Hang, Pham Duc Thinh, Dinh Thanh Trung, Tran Thi Thanh Van, А. И. Усов, Н. Э. Нуфантаев 392

Рекомбинантный SLURP-1 ингибирует рост и миграцию глиомы U251 MG в результате ареста клеточного цикла и модуляции сигнальных путей MAPK и AKT

М. А. Шулепко, М. Л. Бычков, М. П. Кирпичников, Е. Н. Люкманова 403

Региоспецифичный метод синтеза защищенного производного β -разветвленного дипептида аспарагиновой кислоты

В. Н. Азев, Л. К. Байдакова, А. Н. Чулин, А. Б. Тузиков, П. Г. Кислицин, М. В. Молчанов, А. И. Мирошников 411

Получение синтетических аналогов гликолипидов, содержащих тетрасахарид А (тип 2)

Д. О. Петракова, М. С. Савченко, И. С. Попова, А. Б. Тузиков, А. С. Парамонов, А. О. Чижов, Н. В. Бовин, И. М. Рыжов 422

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

Синтез липосом, конъюгированных с CpG-олигонуклеотидом и нагруженных набором Т-клеточных эпитопов вируса SARS-CoV-2

Д. С. Третьякова, Т. Л. Ажикина, И. А. Болдырев, Е. В. Свирцевская, Е. Л. Водовозова 434

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ИНТЕРАКТОМА МИКРОБЕЛКОВ, КОДИРУЕМЫХ КОРОТКИМИ ОТКРЫТЫМИ РАМКАМИ СЧИТЫВАНИЯ¹

© 2023 г. И. А. Седлов*, И. А. Фесенко*, #

*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 10.12.2022 г.

После доработки 22.12.2022 г.

Принята к публикации 24.12.2022 г.

Исследования последних лет показали, что короткие открытые рамки считывания (кОРС, <100 кодонов) могут кодировать пептиды или микробелки, которые выполняют важные функции в прокариотических и эукариотических клетках. Установлено, что продукты трансляции кОРС вовлечены в регуляцию множества процессов, например, они модулируют активность митохондриальной дыхательной цепи или активность мышечных клеток у млекопитающих. Однако идентификация и последующий функциональный анализ пептидов или микробелков, кодируемых кОРС, — нетривиальная задача, требующая использования специальных подходов. Один из критически важных этапов функционального анализа — нахождение белков-партнеров изучаемого пептида. В данном обзоре рассмотрены особенности анализа интерактома коротких белковых молекул и описаны используемые в настоящее время подходы для такого рода исследований.

Ключевые слова: короткая рамка считывания, длинные некодирующие РНК, интерактом, функциональные пептиды, масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S0132342323040395, **EDN:** ODWGHNA

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	333
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕРАКТОМА МИКРОБЕЛКОВ	334
АФФИННОЕ ОБОГАЩЕНИЕ	335
Коиммунопреципитация	336
Преципитация белковых комплексов	342
МЕЧЕНИЕ БЛИЗКОРАСПОЛОЖЕННЫХ МОЛЕКУЛ	343
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	344
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	344

ВВЕДЕНИЕ

Короткая открытая рамка считывания (кОРС) — это нуклеотидная последовательность между по-

тенциальными старт- и стоп-кодонами размером 20–300 нт [1]. Однако в некоторых источниках верхний предел размера кОРС расширен до 150 и даже 250 кодонов [2, 3], в то время как у прокариот общепринятый верхний лимит — 50 кодонов [4]. Поскольку миллионы коротких рамок считывания могут быть обнаружены в любом геноме, то для уменьшения ошибок при идентификации и классификации мРНК существующие алгоритмы предсказания генов обычно не учитывают кОРС при аннотации геномов [5]. Более того, считается, что большинство коротких открытых рамок считывания в геноме не транслируются и не функциональны [3]. Однако показано, что кОРС могут быть источником функциональных пептидов, регулирующих множество ключевых процессов в клетке [6–9], следовательно, поиск и описание таких пептидов — важнейшие задачи современной биологии.

На сегодняшний момент предложено несколько вариантов классификации кОРС в зависимости от их размера, местоположения, консервативности, потенциала транскрипции и трансляции и т.д. В целом можно выделить пять основных классов кОРС. Самый многочисленный класс — межгенные кОРС (intergenic ORFs), которые находятся в нетранскрибируемых участках генома. Этот класс кОРС, по-видимому, формируется

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Вадима Тихоновича Иванова.

Сокращения: кОРС — короткая открытая рамка считывания; длнкРНК — длинная некодирующая РНК; АО-МС — аффинное обогащение с последующей масс-спектрометрией; КоИП — коиммунопреципитация; ЭТЦ — электрон-транспортная цепь; МБМ-МС — мечение близкорасположенных молекул с последующей масс-спектрометрией, ЭПР — эндоплазматический ретикулум; псАА — неканоническая аминокислота.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 335-01-00; эл. почта: feigor@yandex.ru).

случайно и не кодирует функциональных продуктов. Размер таких рамок зависит от GC-состава генома (частота появления стоп-кодона), медиана длины КОРС в геномах млекопитающих составляет 22–23 кодона [6]. КОРС трех других классов расположены на аннотированных транскриптах и потенциально могут быть транслированы. Это короткие рамки считывания, найденные в 5'-лидерных и 3'-трейлерных последовательностях мРНК, а также в белок-кодирующей области, со сдвигом относительно основной рамки считывания (альтернативная рамка считывания). На сегодняшний день самым многочисленным классом КОРС, локализованных на мРНК, считаются upstream open reading frames (uORFs), обнаруженные в 5'-лидерном нетранслируемом регионе. У животных медианная длина таких рамок составляет ~22 кодона, и они найдены у ~50% мРНК [6, 10]. Этот класс КОРС редко находят в генах домашнего хозяйства, и существует значимая отрицательная корреляция между уровнем транскрипции гена и количеством КОРС в 5'-лидерной последовательности [11, 12]. Более того, до сих пор не до конца понятно, какое количество этих КОРС кодирует функциональные пептиды [13]. Тем не менее, принимая во внимание распространенность КОРС в 5'-лидерных последовательностях мРНК, число таких пептидов с неизвестной функцией может достигать нескольких сотен.

Один из самых интересных и плохо изученных классов КОРС — те из них, которые расположены на длинных некодирующих РНК (длнкРНК). Длинные некодирующие РНК — это обширная группа транскриптов длиной >200 нт, которые не содержат длинных рамок считывания и не обладают предсказанным кодирующим потенциалом [14, 15]. Предполагается, что значительная часть таких транскриптов экспонирована и содержит поли-А-хвост, а значит, может быть транслирована [16]. Короткие рамки считывания, расположенные на длнкРНК, выступают третьим по распространенности классом КОРС, а продукты их трансляции в литературе принято называть пептидами, микропептидами или микробелками [6, 17]. Медианная длина таких рамок составляет ~24 кодона, а эффективность трансляции схожа с upstream КОРС. В данном обзоре мы будем обозначать продукты трансляции КОРС, расположенных на длинных некодирующих РНК, микробелками. Показано, что по крайней мере 98% аннотированных длнкРНК содержат как минимум одну КОРС, а медиана количества рамок на один транскрипт составляет 6. Хотя длнкРНК — неконсервативные транскрипты [18], оказалось, что некоторые из них кодируют высококонсервативные функциональные микробелки [7, 19, 20].

Функциональная роль микробелков была наиболее полно изучена у человека и животных.

Функциональные пептиды, транслируемые с КОРС на длнкРНК, участвуют в регуляции клеточной пролиферации [21], пролиферации опухолей [22], апоптозе и образовании аутофагосом [23], активности митохондриальной дыхательной цепи [24], презентации антигенов [25], половом размножении [26]. Например, анализ тканеспецифичной транскрипции длинных некодирующих РНК, совмещенный с предсказанием эволюционно консервативных коротких открытых рамок считывания, позволил идентифицировать два микробелка — dwarf open reading frame (DWARF) и myoregulin (MLN), участвующих в регуляции сокращения сердечной мышцы [19, 27]. Микробелок HOXB-AS3, супрессирующий рост опухоли рака прямой кишки, был обнаружен при анализе экспрессии антисенс-некодирующих РНК в различных тканях методами секвенирования второго поколения с последующим предсказанием коротких рамок на выявленных транскриптах [9].

В сравнении с животными, у растений функциональная роль пептидов, кодируемых длнкРНК, практически не изучена. Только несколько пептидов, кодируемых транскриптами, не имеющими рамок считывания длиной >100 кодона, были функционально охарактеризованы у растений к настоящему времени: PLS (POLARIS), 36 а.о. [28], ROT4 (ROTUNDIFOLIA FOUR), 53 а.о. [29], ROT18/DLV1, 51 а.о. [30], ENOD40 (EARLY NODULIN GENE 40), 12 и 24 а.о. [31], KOD (KISS OF DEATH), 25 а.о. [32], BRK1 (BRICK1), 84 а.о. [33], Zm-908p11, 97 а.о. [34], Zm-401p10, 89 а.о. [35], OSIP108, 10 а.о. [36]. Несмотря на практически отсутствующие данные о механизмах действия и скудность информации о функциях таких пептидов у растений, можно отметить, что они вовлечены в регуляцию целого ряда важнейших физиологических процессов.

Результаты функционального анализа большинства известных микробелков, кодируемых КОРС, показали, что чаще всего их биологическая роль заключается в регуляции активности клеточных белков при прямом взаимодействии. Таким образом, анализ интерактомов — необходимый этап изучения молекулярных механизмов биологического действия микробелков.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕРАКТОМА МИКРОБЕЛКОВ

Предполагается, что микробелки слишком малы, чтобы содержать функциональные домены, поэтому роль микробелков может заключаться в модуляции функций более крупных белков-партнеров. Поиск белков-партнеров — важный этап функционального анализа микробелков, позволяющий установить их локализацию и биологическую роль в клетке.

Белки-партнеры также называют интерактомами, а общую совокупность молекул, взаимодействующих с изучаемым белком или микробелком, — его интерактомом. Методы идентификации белок-белковых взаимодействий (методы качественной интерактомики) позволяют определять состав белок-микробелковых комплексов. Как и другие омиксные методы, качественная интерактомика базируется на высокопроизводительном анализе, в случае белков это масс-спектрометрический анализ. Подходы, применяемые для нахождения интерактома микробелков, не имеют принципиального отличия от методов интерактомики крупных белков, однако существуют тонкие различия, определяющиеся физико-химической природой продуктов трансляции КОРС.

АФФИННОЕ ОБОГАЩЕНИЕ

Аффинное обогащение (АО; affinity purification) — группа методов анализа интерактома, позволяющих изолировать интересующие белковые комплексы с использованием принципов аффинной хроматографии. Основа метода — сильное специфическое взаимодействие химических групп на поверхности твердой фазы носителя с исследуемой молекулой. Предполагаемые белки-партнеры, которые коэлюируются с твердой фазы, идентифицируются масс-спектрометрически, что часто подчеркивается в названии подхода — аффинное обогащение-масс-спектрометрия (АО-МС, affinity purification—mass spectrometry). В общем случае аффинность обеспечивается известными парами сильных взаимодействий (антиген—антитело, биотин—авидин, GST (глутатион-*S*-трансфераза) — глутатион, MBP (мальтозасвязывающий белок) — амилоза и проч.) [37, 38].

К последовательности изучаемого микробелка с помощью методов геной инженерии через линкерный участок (кодирующий 3–10 а.о., обычно глицин) присоединяют последовательность, кодирующую один из компонентов аффинной пары. Последний будет называться аффинным тэгом. Полученной конструкцией временно или постоянно трансфицируют клетки. В последнее время часто применяется метод редактирования геномного локуса микробелка, при котором последовательность тэга направленно сливается непосредственно с последовательностью микробелка в геномной ДНК с помощью системы CRISPR-Cas9 [7, 39, 40]. В последнем случае ожидается, что количество микробелка в клетке будет сопоставимо с его количеством в норме (поскольку используется эндогенный промотор); в таких клетках будет только тэгированный вариант молекул, что будет способствовать формированию нативных белковых комплексов и исключать конкуренцию за белок-партнер, воз-

можную при наличии двух форм микробелка. Клетки лизируют, после чего на аффинном к тэгу носителе очищают белковые комплексы, содержащие тэгированный микробелок и его белки-партнеры, затем идентифицируют интеракторы с помощью масс-спектрометрии.

Существует риск, что прибавление к белку какой-либо последовательности в виде тэга с линкером может повлиять на его взаимодействия с другими белками и на его функции. Выбор аффинного тэга в случае микробелков имеет особенно важное значение из-за большой длины тэга относительно последовательности микробелка. В интерактомике крупных белков часто применяют тэги, сами представляющие собой белки (например, MBP или GFP) [41–43].

Подобный подход для интерактомики микробелков весьма дискуссионен, поскольку эти крупные тэги могут сильно повлиять на физико-химические особенности микробелков и белок-микробелковые взаимодействия, может быть нарушена правильная субклеточная локализация микробелка [44]. Молекулярная масса микробелка может быть в 5–10 раз меньше массы такого тэга (42.5 кДа для MBP, 26 кДа для GFP). Для анализа интерактома микробелков предпочтительно использование систем АО-МС с небольшими по размеру тэгами, которые будут рассмотрены в данном обзоре.

Широкое применение в интерактомике микробелков находят тэги пептидной природы. Они представляют собой эпитоп коммерчески доступных антител, как правило, состоящий из 8–10 а.о., что меньше размеров большинства микробелков, поэтому предполагается их меньшее влияние на функции молекулы. Такие тэги присоединяют либо к *N*-, либо к *C*-концу последовательности. Не рекомендуется присоединение тэга к *N*-концу микробелка, поскольку его влияние на субклеточную локализацию конструкции может быть значительным, т.к. на *N*-конце обычно располагается сигнальная последовательность сортировки [45]. Используемые в интерактомике микробелков тэги приведены в табл. 1.

Как правило, компоненты белковых комплексов связаны между собой слабыми взаимодействиями. Поскольку при АО-МС белковые комплексы изолируют после лизиса клеток, возникает проблема сохранения их стабильности и нативности, для чего требуется, во-первых, поддержание условий, приближенных к внутриклеточным, во-вторых, внесение добавок, стабилизирующих белковые комплексы и препятствующих случайным взаимодействиям. Общие рекомендации по составу экстрагирующего раствора отсутствуют; для каждого частного случая необходима оптимизация условий эксперимента, поскольку любая добавка может оказать непред-

Таблица 1. Применяемые к микробелкам аффинные тэги и их свойства

Название тэга	Последовательность	Количество а.о.	pI*	Количество заряженных а.о. при нейтральном pH	Молекулярная масса, кДа	Тип аффинного носителя**
FLAG	DYKDDDDK	8	4.0	7	1.0	Антитела
HA	YPYDVPDYA	9	3.6	2	1.1	Антитела
MYC	EQKLISEEDL	10	4.0	5	1.2	Антитела, нанотела
mNG11	TELNFKEWQKAFTDMM	16	4.7	5	2.0	Нанотела
GFP	Идентификационный номер в базе данных UniProt P42212	238	5.7	60	26.8	Антитела, нанотела

* pI — изоэлектрическая точка. Расчет pI произведен веб-инструментом ProtParam на сайте web.expasy.org.

** Приведена информация о коммерчески доступных аффинных носителях.

сказуемое влияние на стабильность белкового комплекса [45]. В состав растворов входят, в первую очередь, различные буферные системы, поддерживающие кислотность раствора на физиологическом уровне pH 7–8. Поскольку при лизисе происходит разрушение клеточных компартментов, содержащих активные протеазы, для сохранения интактности белков в лизирующие растворы добавляют ингибиторы протеаз, такие как фенолметилсульфонилфторид (PMSF) или коммерчески доступные смеси ингибиторов. Добавление солей, таких как хлорид натрия, в общем случае способствует экстракции белков и препятствует неспецифической адсорбции на носитель [46]. Добавление мягких неденатурирующих детергентов, таких как Tween-20 и Triton X-100, может понизить уровень неспецифических взаимодействий. В случае мембранных белков критически важен подбор детергента для солюбилизации. Особые добавки, такие как глицерин до концентрации 10% или цитрат натрия до 250 мМ, могут стабилизировать белковые комплексы [46, 47]. Отмывки твердой фазы, как правило, проводятся в мягких условиях, т.е. не включают реагентов, способных разрушать комплексы (такие, как, например, денатурирующий детергент SDS), поскольку в классических методах белковые комплексы связаны слабо и не стабилизированы.

Группа методов, основанных на применении сродства антигена к антителу, традиционно обособляется и носит название коиммунопреципитации.

Коиммунопреципитация

Метод коиммунопреципитации (КоИП; coImmunoprecipitation, CoIP) основывается на использовании высокого сродства и селективности связывания антитела со своим антигеном. На

первом этапе получают антитела, которые связывают участок в пределах последовательности микробелка (антиген, эпитоп). Далее, иммобилизовав такие антитела на твердофазном носителе, есть возможность изолировать микробелок и физически связанные с ним белки из клеточного лизата. После ряда отмывок белковую смесь, обогащенную интеракторами, анализируют масс-спектрометрически (рис. 1).

В работах по изучению интерактома белков с помощью КоИП, как правило, получают поликлональные антитела, специфичные к различным эпитопам белка [47, 48]. Однако в случае микробелков этот подход может иметь ограничения, поскольку из-за короткой последовательности микробелка эпитоп антитела может перекрываться с местом связывания белков-партнеров. Данный вариант КоИП был использован для анализа интерактома митохондриального микробелка BRAWNIN. Было установлено, что он взаимодействует с комплексом III электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий, а именно с субъединицей UQCRC1 [49]. Полученные результаты были подтверждены с использованием системы с коротким аффинным тэгом FLAG. В дальнейшем было показано, что BRAWNIN способствует сборке и функционированию комплекса III ЭТЦ [49]. При исследовании микробелка человека CIP2A-BP был также применен интерактомный метод с использованием антител против полной последовательности [22]. В качестве белка-партнера был идентифицирован CIP2A — ингибитор протеинфосфатазы 2A. После связывания микробелка активность протеинфосфатазы 2A повышается, что способствует ингибированию сигнального пути PI3K/AKT/NF-κB, вследствие чего у опухолей снижается способность к метастазированию [22].

Использование охарактеризованной системы антиген—моноклональное антитело с коммерче-

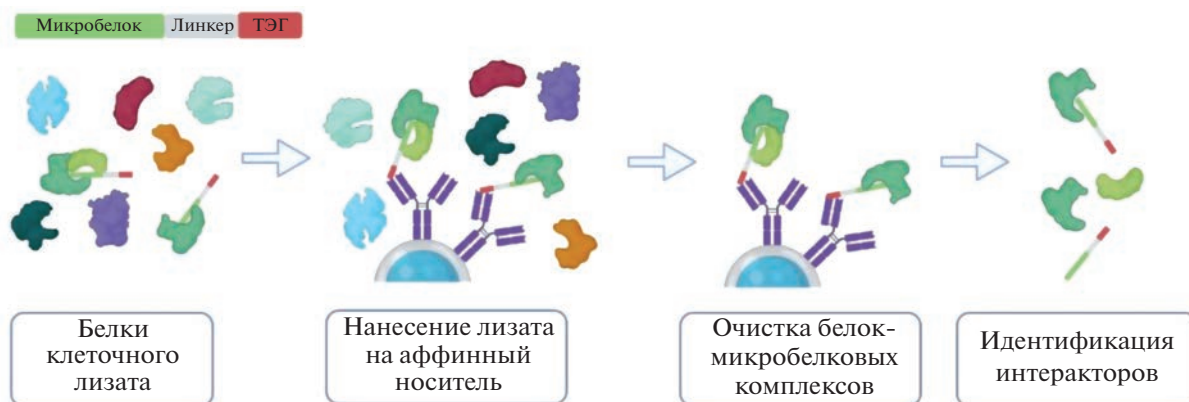


Рис. 1. Метод коиммунопреципитации (КоИП), применяемый к микробелкам. Рисунок сделан с использованием сайта BioRender.com.

ски доступными компонентами имеет преимущества перед описанным выше вариантом КоИП. Уровень неспецифических взаимодействий, обусловленный природой охарактеризованных антител и носителей, как правило, низкий, а их доступность избавляет от этапов иммунизации, очистки и иммобилизации на сорбенте антител или рекомбинантных белков [45]. Однако все же существует риск, что добавление к микробелку какой-либо последовательности в виде тэга с линкером может повлиять на его взаимодействия с белками и на его функции.

Наиболее известен FLAG-тэг (табл. 1). Тэг из восьми аминокислотных остатков первоначально был разработан как компонент системы аффинной очистки рекомбинантных белков [50]. Было показано, что крупные белки с таким тэгом лучше растворимы и сохраняют свою активность после очистки. FLAG — это искусственная последовательность, обладающая специфическими свойствами, такими как высокая гидрофильность и большой заряд при физиологическом pH, вследствие чего нахождение подобного эпитопа среди белков клетки маловероятно. Уникальность последовательности FLAG приводит к высокой селективности распознавания тэга. Специфичность элюции может быть достигнута коммерчески доступной конкурентной системой элюции синтетическим пептидом [47].

Однако было отмечено, что FLAG-система все же обладает некоторым уровнем неспецифических взаимодействий в клетках млекопитающих, дрожжей и растений [51–53]. Кроме того, возможно влияние столь сильно заряженного гидрофильного тэга на свойства микробелка. Например, показано нарушение правильной локализации тэгированного FLAG микробелка в клетках нематоды [54]. При тэгировании FLAG не были идентифицированы интеракторы микробелка MIEF-MP (определенные методом мечения

близкорасположенных молекул (МБМ-МС) и подтвержденные функциональными исследованиями), несмотря на правильную митохондриальную локализацию конструкции [54]. Таким образом, в случае микробелков к выбору тэга следует подходить с осторожностью, по возможности, используя несколько тэгов.

Тем не менее интеракторы целого ряда микробелков были определены с использованием FLAG (табл. 2). Например, интерактом микробелка NoBody в клеточной линии человека исследовали с помощью КоИП anti-FLAG [55]. Его белковыми партнерами оказались белки декэпирующего комплекса EDC4, Dcp1A, Dcp1B, Dcp2, которые участвуют в процессах деградации мРНК и локализируются в Р-тельцах. С помощью исследования мутантов по микробелку и определения локализации было подтверждено участие пептида в регуляции количества Р-теллец и показано, что NoBody локализуется в этих структурах [55].

Используя КоИП с FLAG-тэгом, определили, что трансмембранный микробелок SPAR взаимодействует с субъединицами V-АТРазного комплекса [56]. Впоследствии было показано, что мишень действия микробелка — неочевидная функция V-АТРаза — взаимодействие с комплексом Regulator, активирующим киназу mTORC1 в ответ на свободные аминокислоты. Показано, что SPAR препятствует формированию активирующего киназу комплекса и регенерации мышечных волокон [56].

HA-тэг представляет собой последовательность из 9 а.о. белка гемагглютинаина вируса гриппа А, на которую были получены и охарактеризованы моноклональные антитела (табл. 1) [57]. В отличие от FLAG, HA-тэг имеет меньший заряд при физиологическом pH. Однако было показано, что HA разрезается под действием каспаз, поэтому не подходит для исследования интеракто-мов в клетках в состоянии апоптоза [58]. Данный

Таблица 2. Методы интерактомики микробелков с иллюстрациями применения

Метод	Микробелок	Тэг	Белки-партнеры	Функция	Ссылка
КоИП	BRAWNIN	Поликлональные антитела на полную последовательность, FLAG	Субъединица комплекса III дыхательной цепи митохондрий UQCRC1	Сборка комплекса III дыхательной цепи	[49]
	CIP2A-BP	Поликлональные антитела на полную последовательность	CIP2A, ингибитор протеинфосфатазы 2A	Ингибирование метастазирования опухолей за счет ингибирования сигнального пути PI3K/AKT/NF-κB	[22]
	NoBody	FLAG	Белки декэпирующего комплекса EDC4, Dcp1A, Dcp1B, Dcp2	Уменьшение общего количества Р-теллец	[55]
	SPAR	FLAG	Субъединицы v-ATPазного комплекса (ATP6V0A1, ATP6V0A2, ATP6V0D1 и ATP6AP2)	Препятствие активации mTOR киназного комплекса через комплекс Ragulator, собирающегося при содействии v-ATPазы; препятствие регенерации мышечных волокон	[56]
	HOXB-AS3	FLAG	Белок сплайсинга hnRNP A1	Регуляция альтернативного сплайсинга гена пируваткиназы М, онкосупрессия	[9]
	Minion	FLAG	Dysferlin, myomixer	Участие в слиянии миобластов при развитии мышечного волокна	[77]
	MRI-2 (CYREN)	FLAG	Ku70, Ku80	Ингибирование процесса негетерологичного соединения концов ДНК (NHEJ) в фазах S и G2	[40]
	Mitoregulin	HA	NADH-цитохром b5-редуктаза 3 (Cyb5r3)	Увеличение эффективности окислительного фосфорилирования	[24]
	Mitolamban	HA	Субъединицы комплекса III ЭТЦ митохондрий UQCRC1, UQCRC2, UQCR10 и UQCRFS1P1	Регуляция сборки и активности комплекса III ЭТЦ митохондрий	[59]
	pTINCR	HA	Rho GTPаза CDC42	Индукция сумоилирования CDC42, приводящего к увеличению его активности	[78]
	Nrs1	MYC	Субъединицы фактора транскрипции SBF (Swi4, Swi6)	Регуляция деления дрожжей при недостатке азота в среде	[61]
	NEMEP	GFP	GLUT1, GLUT3	Усиление транспорта глюкозы при дифференцировке мезодермы	[63]

Таблица 2. Окончание

Метод	Микробелок	Тэг	Белки-партнеры	Функция	Ссылка
КоИП	Микробелок (62 а.о.) на lncRNA RP11_469A15.2	mNG11	Субъединицы цитохромоксидазы и митохондриального комплекса Prohibitin	Не исследована	[7]
	SEHBP	AbK, FLAG	Изоформы гистона H2B, белки HMG (HMGN1, HMGN2, HMGN3, HMGN4), транскрипционные регуляторы MYCBP и NME2	Регуляция транскрипционных программ	[66]
Преципитация белковых комплексов	P155	Биотин	HSC70	Подавление процесса презентации антигена, происходящей с помощью шаперон-зависимой аутофагии (СМА)	[25]
	ENOD40-I и ENOD40-II	Биотин	Субъединица сахарозсинтазы podulin 100	Регуляция потребления сахарозы симбиотическими бактериями в клубеньках	[31]
МБМ-МС	PIGBOS	APEX	Хлорный канал ЭПР CLCC1	Подавление ответа на несвернутые белки	[74]
	MIEF1-MP	APEX	Белки митохондриальной рибосомы (MRPL4, MRPL10, MRPL12, MRPL21, MRPL39)	Ускорение трансляции на митохондриальной рибосоме	[76]
	C11orf98	APEX	Нуклеолин (NCL), нуклеофосмин (NPM1)	Не исследована	[75]
	CYREN (MRI-2)	APEX	Ku70, Ku80	Ингибирование процесса негомологичного соединения концов ДНК (NHEJ) в фазах S и G2	[75]

тэг часто применяют в интерактомике микробелков (табл. 2). Убиквитин-подобный микробелок pTINCR, экспрессирующийся в эпителиальной ткани, был исследован с применением данного тэга. С использованием НА было обнаружено, что микробелок взаимодействует с Rho GTPазой CDC42. Дальнейшие исследования показали, что pTINCR вызывает сумоилирование, и, тем самым, активацию CDC42, что способствует клеточной дифференцировке и препятствует малигнизации [58].

Исследуя интерактом экспрессирующегося в сердечной мышце микробелка mitolamban, полученный с использованием НА, было обнаружено, что микробелок взаимодействует с комплексом III ЭТЦ митохондрий. Показано, что mitolamban регулирует окислительное фосфорилирование, способствуя сборке и функционированию комплекса III ЭТЦ [59].

В интерактомике микробелков применяют также МУС-тэг длиной 10 а.о. (табл. 1). Это сильно заряженный, гидрофильный фрагмент последовательности протоонкогена человека c-myc, на который получены и охарактеризованы моноклональные антитела [60].

МУС-тэг использовали, проводя интерактомное исследование микробелка дрожжей Nrs1. В результате обнаружили, что микробелок физически взаимодействует с субъединицами фактора транскрипции SBF. В дальнейшем показано, что Nrs1 участвует в регуляции начала клеточных делений на фоне низкого содержания азота в окружающей среде [61].

Несмотря на описанные проблемы применения крупных тэгов в интерактомике микробелков, тэгирование микробелков GFP тем не менее применяют из-за выраженных преимуществ тэга. Во-первых, флуоресцентные тэги позволяют наблюдать за локализацией микробелков в клетках. Кроме того, разработаны аффинные носители, использующие нанотела против флуоресцентных белков, характеризующиеся низкой способностью неспецифически связывать белки вследствие маленького размера и поэтому хорошо подходящие для интерактомных задач.

Ряд примеров использования GFP-тэга показал, что он часто не нарушает функции микробелков. Тэгирование GFP микробелка дрозофилы Pegasus и последующая экспрессия конструкции в клетках, нокаутных по микробелку, способствовала восстановлению фенотипа дикого типа у мутанта. Кроме того, GFP не нарушил биологическое взаимодействие Pegasus с сигнальным белком Wingless/Wnt1 [62]. Использование тэга GFP для микробелка Nrs1 не повлияло на его специфическую ядерную локализацию [61].

Однако существует обратный пример. В случае микробелка P155 использование EGFP привело к

отсутствию его солокализации с белками-партнерами. Применение синтетического микробелка, флуоресцентно-меченого с помощью небольшой молекулы FITC, позволило установить нативную локализацию [25].

Тем не менее успешное использование GFP в интерактомном исследовании проведено для важного при эмбриональном развитии микробелка NEMER. Обнаружено, что он взаимодействует с транспортерами глюкозы GLUT1 и GLUT3. Было показано, что тем самым NEMER усиливает транспорт глюкозы при дифференцировке клеток мезодермы [63].

Относительно недавно разработана стратегия тэгирования, сочетающая в себе преимущества визуализации локализации флуоресцентных белков и небольшие размеры пептидных тэгов [64]. Технология основана на использовании разделенных флуоресцентных белков (self-complementing split fluorescence proteins) и реализована на белке mNeonGreen (mNG). Флуоресцентные белки имеют структуру бочонка из 11 β -листов. В клетках с помощью CRISPR-Cas9 к белку интереса присоединяется тэг из 16 а.о., соответствующий 11-му β -листу mNG, поэтому такой тэг называется mNG11. Вторым фрагментом флуоресцентного белка (mNG1-10) будет постоянно экспрессирован в этих же клетках. Фрагменты имеют сильное сродство друг к другу. По отдельности они не способны флуоресцировать, однако при димеризации возникает сигнал, как от полноценного флуоресцентного белка. Кроме того, используя аффинный носитель для mNeonGreen (в состав которого входят нанотела, обладающие низкой способностью к неспецифическому связыванию), возможно изолировать белки-партнеры. Таким образом, становится возможным исследование как внутриклеточной локализации, так и интерактома, используя относительно небольшой тэг из 16 а.о. Данный метод успешно применен к белкам с различной субклеточной локализацией: ядерным гистону H2B и ламину A, субъединице транслокатора Sec61B в ЭПР, ассоциированном с эндомембранной системой клетки белкам легкой цепи клатрина A (CLTA) и белку Rab11A [64].

Технология разделенных флуоресцентных белков была успешно использована для анализа интерактома шести микробелков человека [7]. Было показано, что пять из них формировали устойчивые белок-микробелковые комплексы. Так, для микробелка (62 а.о.), кодируемого длнкРНК RP11_469A15.2, показано взаимодействие с субъединицами цитохромоксидазы и митохондриального комплекса Prohibitin; показана его митохондриальная локализация. Микробелок (70 а.о.), кодируемый длнкРНК RP11-84A1.3, локализуется в плазматической мембране и взаимодействует с белками клеточной поверхности, такими как

CD81, субъединица транспортера SLC3A2, субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы. Для микробелка (59 а.о.), кодируемого длнкРНК LINC00998, локализуемого в ЭПР и аппарате Гольджи, показано наличие в интерактоме везикулярных и лизосомальных белков (гемоксидаза HMOX2, тиоредоксин-подобный трансмембранный белок TMX1, CISD2 и др.) [7].

Недавно разработанный интерактомный метод основывается на применении технологии сайт-направленного встраивания неканонических аминокислот в белки *in vivo* [65]. Данная технология основывается на переписывании, переназначении кодона в последовательности мРНК для кодирования неканонической аминокислоты (псАА). Часто это стоп-кодон TAG, поскольку он самый редкий, но возможно использование четырехнуклеотидного кодона. Его помещают в кодирующую последовательность в желаемом месте встраивания псАА. Система включает следующие компоненты: модифицированную посредством белковой эволюции аминоацил-тРНК-синтетазу, узнаваемую только ею тРНК (с переписанным антикодоном) и псАА. При наличии всех этих компонентов в клетках будет синтезироваться псАА-тРНК. Она будет встраиваться рибосомой по месту переписанного кодона [65].

Применение в интерактомике микробелков описанная система получила в варианте встраивания между микробелком и FLAG-тэгом фотореактивной псАА, представляющей собой модифицированный диазирином лизин (N6-((2-(3-метил-3H-диазириин-3-ил)этокси)карбонил)-L-лизин, AbK), способный разрушаться при действии ультрафиолета с образованием реакционно-способных частиц и ковалентно связывать химерную конструкцию с окружающими молекулами. Аминоацил-тРНК-

синтетаза и тРНК кодируются плазмидой, которой трансфицируют клетки. псАА добавляется на определенное время, в течение которого в клетках происходят трансляция с образованием химерной конструкции и формирование белковых комплексов. Затем клетки облучают ультрафиолетом, и белок-микробелковые комплексы стабилизируются ковалентными связями. Далее проводят КоИП anti-FLAG и очищают белковые комплексы (рис. 2). Преимущества данной схемы заключаются в возможности детектировать слабые и транзистентные взаимодействия, разрушающиеся при стандартной КоИП. Так, определили, что кроме идентифицированных при стандартной КоИП anti-FLAG белков-партнеров микробелка MRI-2 (CYREN) – Ku70 и Ku80, осуществляющих негомологию репарацию двуцепочечных разрывов ДНК, – с микробелком MRI-2 взаимодействуют также импортин, требуемый для перемещения в ядро, и белок Translin (TLN), который связывается с белком TRAX и сигнализирует о повреждениях в ДНК [65]. Ранее не охарактеризованный микробелок SEHBP был исследован тем же методом. Среди его белков-партнеров были выявлены изоформы гистона H2B, белки перестройки хроматина семейства HMG (HMG1, HMG2, HMG3, HMG4), а также транскрипционные регуляторы, зависимые от клеточного цикла: MYCBP и NME2. Было предположено, что SEHBP выполняет функцию регулятора транскрипционных перестроек хроматина в связи с клеточным циклом [66].

Таким образом, преимущества данной системы по сравнению с классической КоИП заключаются в стабилизации белок-микробелковых комплексов, что важно в условиях лизата, где параметры среды отличаются от внутриклеточных и

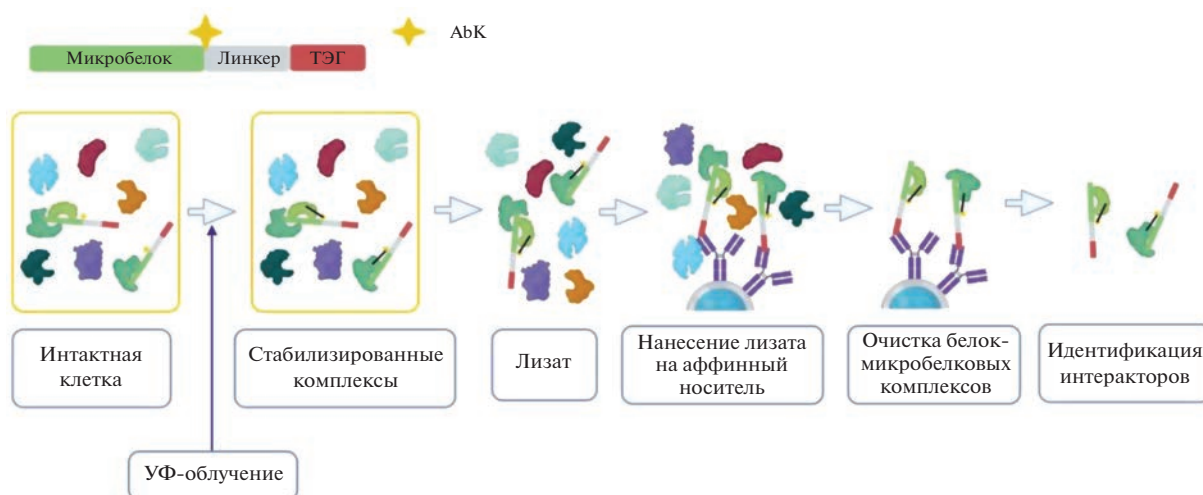


Рис. 2. Метод КоИП со вставкой неканонической аминокислоты (псАА), применяемый к микробелкам. Рисунок сделан с использованием сайта BioRender.com.

есть риск разрушения белковых комплексов. Благодаря ковалентной стабилизации, такая система способна идентифицировать как сильные, так и, что особенно важно, временные и слабые взаимодействия, что показано для MRI-2 (CYREN) [66].

Внедрение неканонической аминокислоты применили для изучения субклеточной локализации микробелков. Разработана система STELLA, при которой происходит *N*- и *C*-концевое тэгиrowание единичной аминокислотой, которая может быть помечена флуоресцентным красителем BODIPY-FL после фиксации клеток. Система протестирована на цитоплазматическом микробелке NoBody, локализуемом в Р-тельцах, и PIGBOSS в наружной митохондриальной мембране. Были получены достоверные данные о локализации микробелков [67].

Существование подобных систем и их применение к микробелкам дает потенциальную возможность для разработки эндогенно-кодируемого аффинного тэга, состоящего всего из одной аминокислоты и тем самым оказывающего минимально возможное влияние на свойства микробелка и белок-микробелковые взаимодействия.

Преципитация белковых комплексов

Подходы аффинной хроматографии, не использующие взаимодействие антиген–антитело, объединяют в группу методов соосаждения или преципитации белковых комплексов (pull-down assay). Использование пары биотин–стрептавидин представляет особый интерес в интерактоме микробелков. Во-первых, данное взаимодействие характеризуется очень высокой аффинно-

стью и специфичностью [38], вследствие чего возможно использование жестких условий отмывки сорбента, приводящих к снижению сигнала от неспецифических взаимодействий. Во-вторых, молекула биотина мала по сравнению с микробелком, поэтому нарушение белок-микробелковых взаимодействий маловероятно. В методе применяется преимущество микробелков как объекта изучения — возможность получения молекул высокой чистоты с помощью технологий химического синтеза пептидов, затем, после реакции присоединения биотина, получается готовая для применения конструкция. Однако эндогенно такую конструкцию экспрессировать невозможно, требуется экзогенная обработка синтетическими биотинилированными пептидами (рис. 3).

Для микробелков метод, основанный на взаимодействии биотин–стрептавидин, применяли для идентификации белкового партнера микробелков ENOD40-I и ENOD40-II, экспрессирующихся в клубеньках бобовых растений. Биотинилированные синтетические пептиды ENOD40 добавляли в лизаты клеток клубеньков. После формирования белковых комплексов смесь очищали на носителе с иммобилизованным стрептавидином. Таким образом, обогащались белковые партнеры пептидов. Субъединица сахарозсинтазы Nodulin100 была идентифицирована как основной интерактор ENOD40-I и ENOD40-II [38].

Белковых партнеров микробелка P155, обнаруженного в клетках человека, определяли при соосаждении с добавленным к клеткам биотинилированным пептидом. Выяснилось, что P155 связывается с шапероном HSC70 и препятствует его взаимодействию с HSP90 при формировании

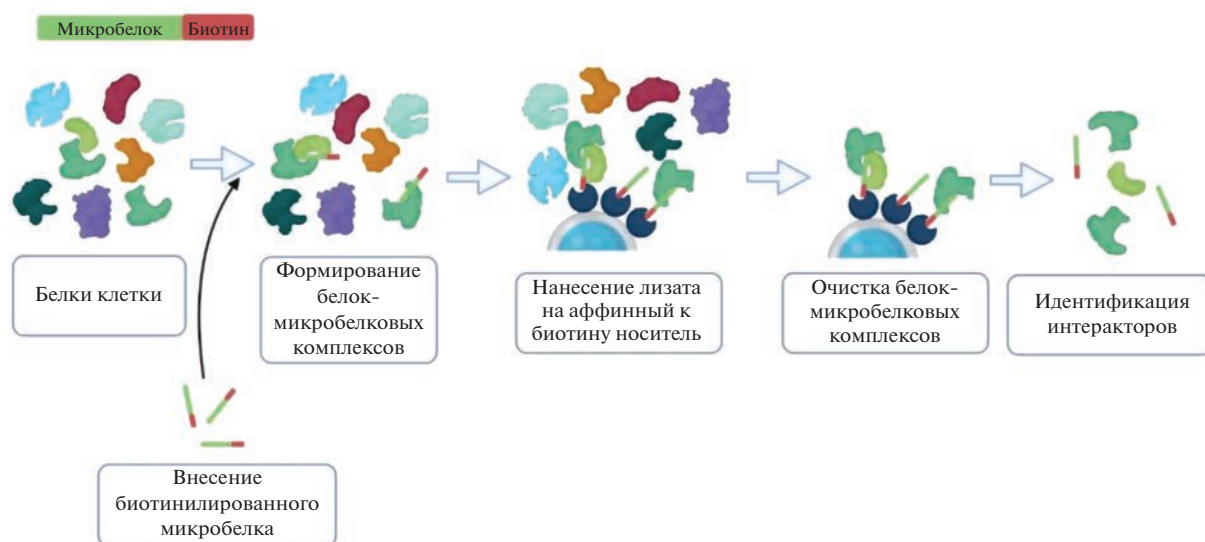


Рис. 3. Метод преципитации белковых комплексов, применяемый к микробелкам. Рисунок сделан с использованием сайта BioRender.com.

комплекса, контролирующего процесс презентации антигена [25].

МЕЧЕНИЕ БЛИЗКОРАСПОЛОЖЕННЫХ МОЛЕКУЛ

Несмотря на все преимущества классических методов аффинного обогащения, они все же характеризуются высоким уровнем идентификации неспецифических интеракторов. При лизисе клеток происходит смешение компартментов, и белки, которые в клетке не контактируют физически, могут проявлять взаимодействие, не имеющее биологического смысла [68]. Мягкие условия отмывок твердой фазы и неспецифические интеракторы осложняют анализ [69].

Метод мечения близкорасположенных молекул с последующей масс-спектрометрией — МБМ-МС (proximity labeling-MS, PL-MS) — подразумевает тэги́рование белка интереса с ферментом, катализирующим присоединение биотина к молекулам, находящимся на близком расстоянии, что наиболее вероятно при физическом контакте с химерным белком. Биотинилированные молекулы очищают с помощью аффинной хроматографии на носителе с иммобилизованным стрептавидином, после чего проводят масс-спектрометрический анализ (рис. 4). В качестве ферментативных тэгов применяют биотинлигазы, присоединяющие биотин к остатку лизина (системы BioID, TurboID), а также пероксидазы (пероксидаза хрена (HRP) или аскорбат-пероксидаза (APEX)) [69]. Последние в присутствии пероксида водорода окисляют фенольное производное биотина до высокореактивных феноксильных радикалов, которые, обладая временем жизни <1 мс, ковалентно присоединяются к находящимся рядом белкам по тирозину и другим элек-

трон-обогащенным аминокислотам [70, 71]. В случае APEX мечению подвергаются молекулы в радиусе 20 нм от фермента [71]. Поскольку лизис клеток, связывание с носителем и отмывки происходят уже после мечения белков-партнеров, эти процедуры могут осуществляться в жестких (даже ненативных) условиях с высокими концентрациями детергентов и солей, снижающих неспецифическое связывание. Таким образом, требующая особых условий солюбилизации мембранная локализация белка интереса или белка-партнера не препятствует данному методу. Однако требуется введение контроля — свободного фермента, чтобы исключить модифицируемые мажорные белки компартментов. Метод примечателен тем, что позволяет определять белковых партнеров в клетках *in vivo*. Слабые и временные взаимодействия также могут быть детектированы [69].

Применительно к микробелкам наиболее подходящая система — APEX. Из всех вариантов ферментативных тэгов APEX обладает наименьшим размером (27 кДа), что соответствует размеру GFP. Кроме того, это самая быстрая система — мечение происходит в течение ~1 мин [72]. Активность фермента, в отличие от HRP, стабильна в восстанавливающих условиях внутри клетки [73]. Именно с использованием APEX проведены исследования интеракто́мов нескольких микробелков (табл. 2).

С помощью метода МБМ-МС в системе APEX удалось показать, что микробелок человека PIGBOS, локализующийся в наружной митохондриальной мембране, взаимодействует с интегральным белком, хлорным каналом CLCC1, из другого компартмента — ЭПР. Этот результат помог авторам исследования определить биологическую функцию микробелка — подавление стресса ЭПР, не-

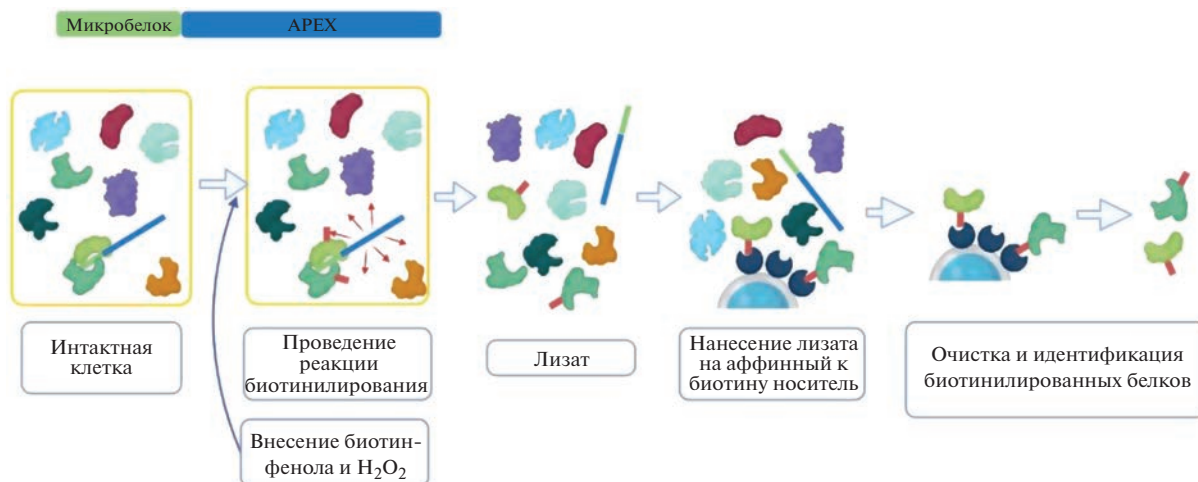


Рис. 4. Метод мечения близкорасположенных молекул, применяемый к микробелкам. Рисунок сделан с использованием сайта BioRender.com.

смотря на локализацию PIGBOS в совершенно другом мембранном компартменте [74].

Интерактом прежде не охарактеризованного микробелка C11orf98 исследовали с помощью МБМ-МС при тэгировании APEX. Было обнаружено и впоследствии подтверждено, что он взаимодействует с ядерными белками — нуклеолином (NCL) и нуклеофосмином (NPM1), локализуясь в ядрышках [75].

Для микробелка MRI-2 (CYREN) с помощью МБМ-МС получено большее обогащение белками-партнерами Ku70/Ku80, чем при КоИП в системе anti-FLAG, в то время как фоновый сигнал неспецифических интеракторов (таких как тубулин TUBB и шаперон HSPA9) был значительно ниже при МБМ-МС [75].

Интерактомные опыты с MIEF1-MP также были проведены двумя методами: КоИП anti-FLAG и МБМ-МС с APEX. При КоИП не были обнаружены биологически значимые белки-партнеры — белки митохондриальной рибосомы (MRPL4, MRPL10, MRPL12, MRPL21 и MRPL39), которые, напротив, были успешно идентифицированы в системе биотинилирования APEX. Результаты были подтверждены функциональными исследованиями [76]. Таким образом, тэгирование APEX может предоставлять более полноценные результаты, чем АО-МС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эукариотические геномы содержат миллионы коротких открытых рамок считывания (кОРС), однако вычислительные методы аннотации белков обычно пропускают их при анализе. Часть кОРС, расположенных на длинных некодирующих РНК, подвергается трансляции с образованием микробелков. Выявление и анализ биологических функций таких микробелков — одна из актуальных задач современной биологии. Считается, что микробелки модулируют функции отдельных белков и/или белковых комплексов. Таким образом, нахождение белков-партнеров или интеракторов в случае микробелков — важный этап функционального анализа. Спектр методов интерактомики, применяемых к микробелкам, немного отличается от методик для крупных белков. Наблюдается устойчивая тенденция по применению небольших по размерам аффинных тэгов для снижения их влияния на интерактом микробелка. С другой стороны, развитие получили новые методы по фиксации белок-микробелковых взаимодействий *in vivo*, такие как МБМ-МС и КоИП с внедрением неканонической аминокислоты. Технология разделенных флуоресцентных белков позволяет как визуализировать локализацию микробелка в клетке, так и определять его интерактом с помощью КоИП с использованием относительно не-

большого по размерам тэга. Мы предполагаем, что в ближайшее время на основе технологий встраивания неканонических аминокислот со специфическими свойствами нас ждет появление целого спектра новых методов анализа интерактома микробелков.

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. Guerra-Almeida D., Tschoeke D.A., Nunes-da-Fonseca R. // DNA Res. 2021. V. 28. P. 1–18. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsab007>
2. Yang X., Tschaplinski T.J., Hurst G.B., Jawdy S., Abraham P.E., Lankford P.K., Adams R.M., Shah M.B., Hetlich R.L., Lindquist E., Kalluri U.C., Gunter L.E., Pennacchio C., Tuskan G.A. // Genome Res. 2011. V. 21. P. 634–641. <https://doi.org/10.1101/gr.109280.110>
3. Andrews S.J., Rothnagel J.A. // Nat. Rev. Genet. 2014. V. 15. P. 193–204. <https://doi.org/10.1038/nrg3520>
4. Storz G., Wolf Y.I., Ramamurthi K.S. // Annu. Rev. Biochem. 2014. V. 83. P. 753–777. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-070611-102400>
5. Dinger M.E., Pang K.C., Mercer T.R., Mattick J.S. // PLoS Comput. Biol. 2008. V. 4. P. e1000176. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000176>
6. Couso J.-P., Patraquim P. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017. V. 18. P. 575–589. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.58>
7. Chen J., Brunner A.-D., Cogan J.Z., Nuñez J.K., Fields A.P., Adamson B., Itzhak D.N., Li J.Y., Mann M., Leonetti M.D., Leonetti M.D., Weissman J.S. // Science. 2020. V. 367. P. 1140–1146. <https://doi.org/10.1126/science.aay0262>
8. Wright B.W., Yi Z., Weissman J.S., Chen J. // Trends Cell Biol. 2022. V. 32. P. 243–258. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.10.010>
9. Huang J.-Z., Chen M., Chen D., Gao X.-C., Zhu S., Huang H., Hu M., Zhu H., Yan G.-R. // Mol. Cell. 2017. V. 68. P. 171–184. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.015>
10. Johnstone T.G., Bazzini A.A., Giraldez A.J. // EMBO J. 2016. V. 35. P. 706–723. <https://doi.org/10.15252/embj.201592759>
11. Zhang H., Wang Y., Wu X., Tang X., Wu C., Lu J. // Nat. Commun. 2021. V. 12. P. 1076. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21394-y>

12. Eisenberg E., Levanon E.Y. // Trends Genet. 2013. V. 29. P. 569–574.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.010>
13. Hayashi N., Sasaki S., Takahashi H., Yamashita Y., Naito S., Onouchi H. // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. P. 8844–8858.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx528>
14. Hartford C.C.R., Lal A. // Mol. Cell. Biol. 2020. V. 40. P. e00528-19.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00528-19>
15. Kopp F., Mendell J.T. // Cell. 2018. V. 172. P. 393–407.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.011>
16. Ji Z., Song R., Regev A., Struhl K. // eLife. 2015. V. 4. P. e08890.
<https://doi.org/10.7554/eLife.08890>
17. Patraquim P., Magny E.G., Pueyo J.I., Platero A.I., Couso J.P. // Nat. Commun. 2022. V. 13. P. 6515.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-34094-y>
18. Ulitsky I. // Nat. Rev. Genet. 2016. V. 17. P. 601–614.
<https://doi.org/10.1038/nrg.2016.85>
19. Nelson B.R., Makarewich C.A., Anderson D.M., Winders B.R., Troupes C.D., Wu F., Reese A.L., McAnally J.R., Chen X., Kavalali E.T., Cannon S.C., Houser S.R., Bassel-Duby R., Olson E.N. // Science. 2016. V. 351. P. 271–275.
<https://doi.org/10.1126/science.aad4076>
20. Hao Y., Zhang L., Niu Y., Cai T., Luo J., He S., Zhang B., Zhang D., Qin Y., Yang F., Chen R. // Brief. Bioinform. 2018. V. 19. P. 636–643.
<https://doi.org/10.1093/bib/bbx005>
21. Polycarpou-Schwarz M., Groß M., Mestdag P., Schott J., Grund S.E., Hildenbrand C., Rom J., Aulmann S., Sinn H.-P., Vandesompele J., Diederichs S. // Onco-gene. 2018. V. 37. P. 4750–4768.
<https://doi.org/10.1038/s41388-018-0281-5>
22. Guo B., Wu S., Zhu X., Zhang L., Deng J., Li F., Wang Y., Zhang S., Wu R., Lu J., Zhou Y. // EMBO J. 2020. V. 39. P. e102190.
<https://doi.org/10.15252/embj.2019102190>
23. Rubtsova M., Naraykina Y., Vasilkova D., Meerson M., Zvereva M., Prassolov V., Lazarev V., Manuvera V., Kovalechuk S., Anikanov N., Butenko I., Pobeguts O., Govo-run V., Dontsova O. // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. P. 8966–8977.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky705>
24. Chugunova A., Loseva E., Mazin P., Mitina A., Nava-layeu T., Bilan D., Vishnyakova P., Marey M., Golovina A., Serebryakova M., Pletnev P., Rubtsova M., Mair W., Vanyushkina A., Khaitovich P., Belousov V., Vysokikh M., Sergiev P., Dontsova O. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. P. 4940–4945.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1809105116>
25. Niu L., Lou F., Sun Y., Sun L., Cai X., Liu Z., Zhou H., Wang H., Wang Z., Bai J., Yin, Q., Zhang J., Chen L., Peng D., Xu Z., Gao Y., Tang S., Fan L., Wang H. // Sci. Adv. 2020. V. 6. P. eaaz2059.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz2059>
26. Immarigeon C., Frei Y., Delbare S.Y.N., Gligorov D., Machado Almeida P., Grey J., Fabbro L., Nagoshi E., Billeter J.-C., Wolfner M.F., Karch F., Maeda R.K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2021. V. 118. P. e2001897118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2001897118>
27. Anderson D.M., Anderson K.M., Chang C.-L., Makare-wich C.A., Nelson B.R., McAnally J.R., Kasaragod P., Shelton J.M., Liou J., Bassel-Duby R., Olson E.N. // Cell. 2015. V. 160. P. 595–606.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.009>
28. Casson S.A., Chilley P.M., Topping J.F., Evans I.M., Souter M.A., Lindsey K. // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 1705–1721.
<https://doi.org/10.1105/tpc.002618>
29. Narita N.N., Moore S., Horiguchi G., Kubo M., Demura T., Fukuda H., Goodrich J., Tsukaya H. // Plant J. 2004. V. 38. P. 699–713.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02078.x>
30. Guo P., Yoshimura A., Ishikawa N., Yamaguchi T., Guo Y., Tsukaya H. // J. Plant Res. 2015. V. 128. P. 497–510.
<https://doi.org/10.1007/s10265-015-0703-1>
31. Röhrig H., Schmidt J., Miklashevichs E., Schell J., John M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 1915–1920.
<https://doi.org/10.1073/pnas.022664799>
32. Blanvillain R., Young B., Cai Y.-M., Hecht V., Varoquaux F., Delorme V., Lancelin J.-M., Delseny M., Gallois P. // EMBO J. 2011. V. 30. P. 1173–1183.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.14>
33. Frank M.J., Cartwright H.N., Smith L.G. // Develop-ment. 2003. V. 130. P. 753–762.
<https://doi.org/10.1242/dev.00290>
34. Dong X., Wang D., Liu P., Li C., Zhao Q., Zhu D., Yu J. // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 2359–2372.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert093>
35. Wang D., Li C., Zhao Q., Zhao L., Wang M., Zhu D., Ao G., Yu J. // Funct. Plant Biol. 2009. V. 36. P. 73–85.
<https://doi.org/10.1071/FP08154>
36. De Coninck B., Carron D., Tavormina P., Willem L., Craik D.J., Vos C., Thevissen K., Mathys J., Cam-mue B.P.A. // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 5297–5307.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert295>
37. Waugh D.S. // Trends Biotechnol. 2005. V. 23. P. 316–320.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.03.012>
38. Kimple M.E., Brill A.L., Pasker R.L. // Curr. Protoc. Protein Sci. 2013. V. 73. P. 9.9.1–9.9.23.
<https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0909s73>
39. Jackson R., Kroehling L., Khitun A., Bailis W., Jarret A., York A.G., Khan O.M., Brewer J.R., Skadow M.H., Duizer C., Harman C.C.D., Chang L., Bielecki P., Solis A.G., Steach H.R., Slavoff S., Flavell R.A. // Na-ture. 2018. V. 564. P. 434–438.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0794-7>
40. Arnoult N., Correia A., Ma J., Merlo A., Garcia-Gomez S., Maric M., Tognetti M., Benner C.W., Boulton S.J., Saghatelian A., Karlseder J. // Nature. 2017. V. 549. P. 548–552.
<https://doi.org/10.1038/nature24023>
41. Pronier E., Cifani P., Merlinsky T.R., Berman K.B., So-masundara A.V.H., Rampal R.K., LaCava J., Wei K.E., Pastore F., Maag J.L., Park J., Koche R., Kentsis A., Levine R.L. // JCI Insight. 2018. V. 3. № 22.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.122703>

42. Wang F., Zhu S., Fisher L.A., Wang W., Oakley G.G., Li C., Peng A. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 2683. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21040-6>
43. Cristea I.M., Williams R., Chait B.T., Rout M.P. // *Mol. Cell. Proteomics.* 2005. V. 4. P. 1933–1941. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500227-MCP200>
44. Schlesinger D., Elsässer S.J. // *FEBS J.* 2022. V. 289. P. 53–74. <https://doi.org/10.1111/febs.15769>
45. LaCava J., Molloy K.R., Taylor M.S., Domanski M., Chait B.T., Rout M.P. // *Biotechniques.* 2015. V. 58. P. 103–119. <https://doi.org/10.2144/000114262>
46. LaCava J., Fernandez-Martinez J., Hakhverdyan Z., Rout M.P. // *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016. V. 2016. P. 601–605. <https://doi.org/10.1101/pdb.top077545>
47. Gerace E., Moazed D. // *Methods Enzymol.* 2015. V. 559. P. 99–110. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.010>
48. Jia J., Jin J., Chen Q., Yuan Z., Li H., Bian J., Gui L. // *Biol. Res.* 2020. V. 53. P. 24. <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00290-7>
49. Zhang S., Reljić B., Liang C., Kerouanton B., Francisco J.C., Peh J.H., Mary C., Jagannathan N.S., Olexiouk V., Tang C., Fidelito G., Nama S., Cheng R.K., Wee C.L., Wang L.C., Duek Roggli P., Sampath P., Lane L., Petretto E., Sobota R.M., Jesuthasan S., Tucker-Kellogg L., Reversade B., Menschaert G., Sun L., Stroud D.A., Ho L. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 1312. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14999-2>
50. Hopp T.P., Prickett K.S., Price V.L., Libby R.T., March C.J., Pat Cerretti D., Urdal D.L., Conlon P.J. // *Biotechnology.* 1988. V. 6. P. 1204–1210. <https://doi.org/10.1038/nbt1088-1204>
51. Schäfer K., Braun T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 207. P. 708–714. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1245>
52. Zhang Y., Natale R., Domingues A.P. Júnior, Toleco M.R., Siemiatkowska B., Fábregas N., Fernie A.R. // *Curr. Protoc. Plant. Biol.* 2019. V. 4. P. e20099. <https://doi.org/10.1002/cppb.20099>
53. Buker S.M., Iida T., Bühler M., Villén J., Gygi S.P., Nakayama J.-I., Moazed D. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. V. 14. P. 200–207. <https://doi.org/10.1038/nsmb1211>
54. Lightfoot J.W., Wilecki M., Rödelberger C., Moreno E., Susoy V., Witte H., Sommer R.J. // *Science.* 2019. V. 364. P. 86–89. <https://doi.org/10.1126/science.aav9856>
55. D’Lima N.G., Ma J., Winkler L., Chu Q., Loh K.H., Corpuz E.O., Budnik B.A., Lykke-Andersen J., Saghatelian A., Slavoff S.A. // *Nat. Chem. Biol.* 2017. V. 13. P. 174–180. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2249>
56. Matsumoto A., Pasut A., Matsumoto M., Yamashita R., Fung J., Monteleone E., Saghatelian A., Nakayama K.I., Clohessy J.G., Pandolfi P.P. // *Nature.* 2017. V. 541. P. 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature21034>
57. Field J., Nikawa J., Broek D., MacDonald B., Rodgers L., Wilson I.A., Lerner R.A., Wigler M. // *Mol. Cell. Biol.* 1988. V. 8. P. 2159–2165. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.5.2159-2165.1988>
58. Schembri L., Dalibart R., Tomasello F., Legembre P., Ichas F., De Giorgi F. // *Nat. Methods.* 2007. V. 4. P. 107–108. <https://doi.org/10.1038/nmeth0207-107>
59. Makarewich C.A., Munir A.Z., Bezprozvannaya S., Gibson A.M., Young Kim S., Martin-Sandoval M.S., Mathews T.P., Szveda L.I., Bassel-Duby R., Olson E.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2022. V. 119. P. e2120476119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2120476119>
60. Evan G.I., Lewis G.K., Ramsay G., Bishop J.M. // *Mol. Cell. Biol.* 1985. V. 5. P. 3610–3616. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.12.3610-3616.1985>
61. Tollis S., Singh J., Palou R., Thattikota Y., Ghazal G., Coulombe-Huntington J., Tang X., Moore S., Blake D., Bonneil E., Royer C.A., Thibault P., Tyers M. // *PLoS Biol.* 2022. V. 20. P. e3001548. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001548>
62. Magny E.G., Platero A.I., Bishop S.A., Pueyo J.I., Aguilar-Hidalgo D., Couso J.P. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 5660. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25785-z>
63. Fu H., Wang T., Kong X., Yan K., Yang Y., Cao J., Yuan Y., Wang N., Kee K., Lu Z.J., Xi Q. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 3984. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31762-x>
64. Feng S., Sekine S., Pessino V., Li H., Leonetti M.D., Huang B. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 370. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00494-8>
65. Young D.D., Schultz P.G. // *ACS Chem. Biol.* 2018. V. 13. P. 854–870. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00974>
66. Koh M., Ahmad I., Ko Y., Zhang Y., Martinez T.F., Diedrich J.K., Chu Q., Moresco J.J., Erb M.A., Saghatelian A., Schultz P.G., Bollong M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2021. V. 118. P. e2021943118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021943118>
67. Lafranchi L., Schlesinger D., Kimler K.J., Elsässer S.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2020. V. 142. P. 20080–20087. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c09574>
68. Richards A.L., Eckhardt M., Krogan N.J. // *Mol. Syst. Biol.* 2021. V. 17. P. e8792. <https://doi.org/10.15252/msb.20188792>
69. Bosch J.A., Chen C.-L., Perrimon N. // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2021. V. 10. P. e392. <https://doi.org/10.1002/wdev.392>
70. Hung V., Zou P., Rhee H.-W., Udeshi N.D., Cracan V., Svinkina T., Carr S.A., Mootha V.K., Ting A.Y. // *Mol. Cell.* 2014. V. 55. P. 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.003>
71. Rhee H.-W., Zou P., Udeshi N.D., Martell J.D., Mootha V.K., Carr S.A., Ting A.Y. // *Science.* 2013. V. 339. P. 1328–1331. <https://doi.org/10.1126/science.1230593>
72. Trinkle-Mulcahy L. // *F1000Res.* 2019. V. 8. P. F1000 Faculty Rev-135. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16903.1>
73. Hopkins C., Gibson A., Stinchcombe J., Futter C. // *Methods Enzymol.* 2000. V. 327. P. 35–45. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)27265-0](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)27265-0)

74. Chu Q., Martinez T.F., Novak S.W., Donaldson C.J., Tan D., Vaughan J.M., Chang T., Diedrich J.K., Andrade L., Kim A., Zhang T., Manor U., Saghatelian A. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 4883.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12816-z>
75. Chu Q., Rathore A., Diedrich J.K., Donaldson C.J., Yates J.R., 3rd, Saghatelian A. // *Biochemistry*. 2017. V. 56. P. 3299–3306.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00265>
76. Rathore A., Chu Q., Tan D., Martinez T.F., Donaldson C.J., Diedrich J.K., Yates J.R., 3rd, Saghatelian A. // *Biochemistry*. 2018. V. 57. P. 5564–5575.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00726>
77. Zhang Q., Vashisht A.A., O'Rourke J., Corbel S.Y., Moran R., Romero A., Miraglia L., Zhang J., Durrant E., Schmedt C., Sampath S.C., Sampath S.C. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 15664.
<https://doi.org/10.1038/ncomms15664>
78. Boix O., Martinez M., Vidal S., Giménez-Alejandro M., Palenzuela L., Lorenzo-Sanz L., Quevedo L., Moscoso O., Ruiz-Orera J., Ximénez-Embún P., Ciriaco N., Nuciforo P., Stephan-Otto Attolini C., Albà M.M., Muñoz J., Tian T.V., Varela I., Vivancos A., Ramón Y Cajal S., Muñoz P., Rivas C., Abad M. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 6840.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-34529-6>

Methods for Interactome Analysis of Microproteins Encoded by Small Open Reading Frames

I. A. Sedlov* and I. A. Fesenko*, #

#Phone: +7 (495) 335-01-00; e-mail: feigor@yandex.ru

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

Recent studies have shown that small open reading frames (sORFs, <100 codons) can encode peptides or microproteins that perform important functions in prokaryotic and eukaryotic cells. It has been established that sORF translation products are involved in the regulation of many processes, for example, they modulate the activity of the mitochondrial respiratory chain or the functions of muscle cells in mammals. However, the identification and subsequent functional analysis of peptides or microproteins encoded by sORFs is a non-trivial task and requires the use of special approaches. One of the critical steps in functional analysis is identification of protein partners of the peptide under study. This review considers the features of the interactome analysis of short protein molecules and describes the approaches currently used for studies in the field.

Keywords: small open reading frame, long non-coding RNA, interactome, functional peptides, mass-spectrometry



УДК 577.124.5;577.151.4

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КЕТОЗО-3-ЭПИМЕРАЗ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА D-АЛЛЮЛОЗЫ

© 2023 г. Н. С. Иванова*, А. А. Кульминская*, **, С. В. Швецова*, **, ***, #

*Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Россия, 188300 Гатчина, Орлова Роща, 1

**Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального
исследовательского центра “Курчатовский институт”, Россия, 188300 Гатчина, Орлова Роща, 1

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

Поступила в редакцию 13.10.2022 г.

После доработки 05.12.2022 г.

Принята к публикации 10.12.2022 г.

Редкие сахара привлекают все больше внимания в качестве безопасных для здоровья низкокалорийных подсластителей и функциональных соединений в пищевой, фармацевтической и медицинской промышленности. D-Аллюлоза, впервые обнаруженная в пшенице более 70 лет назад, обладает значительным потенциалом применения, однако ее широкое использование лимитируется высокой стоимостью получения. Реакции эпимеризации доступных сахаров, приводящие к получению D-аллюлозы, катализируют ферменты группы эпимераз, а именно кетозо-3-эпимеразы. Ключевыми задачами исследований ферментов семейства кетозо-3-эпимераз выступают установление точных механизмов их работы, повышение ферментативной активности и стабильности для достижения высокой эффективности ферментативного производства D-аллюлозы. В обзоре обобщены и представлены последние инновационные разработки по использованию кетозо-3-эпимераз, а также оптимизации процессов для получения D-аллюлозы; рассмотрены структурные особенности основных ферментов, используемых в производстве редкого сахара, варианты молекулярных модификаций биокатализаторов и перспективы практического использования обсуждаемых в работе ферментных путей.

Ключевые слова: редкие сахара, D-аллюлоза, D-фруктоза, D-кетозо-3-эпимераза, D-тагатозо-3-эпимераза, активный центр, структурные особенности ферментов

DOI: 10.31857/S0132342323040346, EDN: ODGVQI

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	348
D-АЛЛЮЛОЗА: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И СВОЙСТВА	349
ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ D-АЛЛЮЛОЗЫ	350
ОБЩИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ СЕМЕЙСТВА D-КЕТОЗО-3-ЭПИМЕРАЗ	350
МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КЕТОЗО-3-ЭПИМЕРАЗ	352
БИОИНЖЕНЕРИЯ КЕТОЗО-3- ЭПИМЕРАЗ	354
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	356
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	357

ВВЕДЕНИЕ

К редким сахарам относятся моносахариды с ограниченной доступностью в природе и, как правило, с почти неизвестными или плохо изученными биологическими функциями. Однако некоторые из них, в частности D-аллюлоза, зарекомендовали себя как безопасные для здоровья человека соединения и уже используются в качестве альтернативы обычному сахару в виде пищевой добавки, обладая подходящими для этих целей вкусовыми качествами, низкой калорийностью и рядом других характеристик. Возрастающий интерес пищевых производств к редким сахарам как потенциальным подсластителям или новым функциональным соединениям стимулирует поиск и разработку доступных и экономически выгодных способов их получения.

Один из подходов к получению редких сахаров – разработка индивидуальных ферментов, комплексных ферментных препаратов, а также мик-

Сокращения: CEP2 – семейство углеводов-эпимераз 2 (carbohydrate epimerases); DAE – D-аллюлозо-3-эпимераза; DFE – D-фруктозо-3-эпимераза; DTE – D-тагатозо-3-эпимераза.

Автор для связи: (эл. почта: shvetsova_sv@pnpi.nrcki.ru).

робных цельноклеточных систем. Для получения D-аллюлозы используют ферменты семейства кетозо-3-эпимераз, которые катализируют реакции эпимеризации различных сахаров (в основном D-фруктозы). Актуальность исследований этих ферментов обусловлена потребностью в высокоактивных, стабильных ферментных препаратах с узкой субстратной специфичностью. Детализированная информация о субстратной специфичности и особенностях ферментов семейства кетозо-3-эпимераз позволяет совершенствовать методики производства функциональных редких сахаров для эффективного и экологически чистого производства. Структурные исследования этих ферментов необходимы для понимания взаимосвязи между их структурной организацией и каталитическим механизмом, дают неоценимую информацию для разработки дальнейших стратегий модификации ферментов с целью улучшения их каталитической эффективности, а также позволяют понять точные механизмы синтеза редких сахаров.

В представленной обзорной статье суммированы современные достижения в области исследований структурно-функциональных особенностей кетозо-3-эпимераз для получения редкого сахара D-аллюлозы, проведена оценка актуальности развития исследовательских и промышленных процессов производства и внедрения этого редкого сахара в широкое потребление.

D-АЛЛЮЛОЗА: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И СВОЙСТВА

D-Аллюлоза (синоним — D-псикоза) представляет собой моносахарид, кетогексозу, эпимер D-фруктозы, химическая структура которого отличается от структуры D-фруктозы положением гидроксильной группы при C3 [1]. Международное общество редких сахаров на симпозиуме в 2014 г. постановило отменить использование термина “псикоза” в отношении D-аллюлозы, поскольку D-аллюлоза служит изомеризованным и окисленным продуктом D-аллозы и D-аллита. Многие исследователи называют D-аллюлозу идеальным заменителем сахарозы из-за ее уникальных свойств: сладости, высокой растворимости, чрезвычайно низкой калорийности, а также способности вызывать низкий гликемический ответ [2, 3]. Добавление D-аллюлозы к продуктам питания улучшает желирующие свойства ингредиентов пищевых продуктов, их цвет и текстуру, а также усиливает антиоксидантные свойства [4]. В 2016 г. D-аллюлоза была одобрена в качестве безопасной пищевой добавки и пищевого ингредиента [5]. Согласно рейтингу токсичности, этот сахар занимает категорию “относительно безвредных”, что соотносится с самой низкой степенью токсичности [6]. В результате проведенных токсикологических исследований на животных не

было обнаружено каких-либо токсических эффектов D-аллюлозы, которые можно было бы противопоставить ее преимуществам [7, 8]. Кроме того, в 2012 г. Harada et al. продемонстрировали усиление действия известного антибактериального препарата метронидазола при совместном приеме с D-аллюлозой [9]. В обзоре Chung et al., посвященном гипогликемическим эффектам D-аллюлозы, рассмотрены эксперименты, демонстрирующие повышение уровня поглощения активных форм кислорода и внутриклеточного глутатиона *in vitro* [10, 11].

Наиболее хорошо изученная биологическая функция D-аллюлозы — ее способность подавлять гипергликемию. Проведенные клинические исследования показали, что употребление в день более 5 г D-аллюлозы при одновременном приеме 75 г мальтодекстрина снижает уровень глюкозы и инсулина в плазме крови у здоровых людей [12]. Hayashi et al. [13] продемонстрировали, что при длительном употреблении D-аллюлозы уровень глюкозы после стандартного приема пищи у пациентов с пограничным диабетом значительно снижался. Влияние D-аллюлозы на снижение уровней глюкозы и инсулина в крови, приводящее к замедлению увеличения массы тела, было подтверждено на животных моделях диабета 2-го типа [14, 15]. Так, было установлено, что 5%-ный раствор D-аллюлозы (в виде напитка) способен защищать от хронической недостаточности β -клеток поджелудочной железы, вызванной гипергликемией страдающих ожирением животных с диабетом 2-го типа [14]. Itoh et al. обнаружили, что добавление 5% аллюлозы в рацион мышам с дефицитом лептина в течение 15 недель снижало массу тела на 20%, а печени — на 15% [16]. Chen et al. сравнили эффект 4-недельного употребления крысами линии Wistar 5%-ного раствора D-аллюлозы с эффектом приема 5%-ных растворов глюкозы, фруктозы и целлюлозы. При употреблении D-аллюлозы профиль липидов в крови улучшился, а уровень антиоксидантов увеличился [17]. На уровне экспрессии генов D-аллюлоза ингибировала гены липогенеза и увеличивала экспрессию генов, участвующих в окислении жиров [17–19]. Тем не менее точный механизм, лежащий в основе антигиперлипидемии, до сих пор не ясен и требует дальнейших клинических исследований.

В 2002 г. Matsuo et al. выявили низкую калорийность D-аллюлозы в сравнительном исследовании, в котором самцы крыс Wistar в течение 20 дней получали с пищей по 0.5–2.0 г сахарозы, фруктозы или D-аллюлозы. Крысы набирали вес при приеме сахарозы и фруктозы, но не D-аллюлозы [20]. В последующих экспериментах Matsuo et al. [21] исследовали метаболизм и секрецию D-аллюлозы. Было обнаружено, что D-аллюлоза частично абсорбируется и обнаруживается в моче и кале крыс через 24 ч после приема, а ее деструк-

ция происходит в толстой кишке. Диеты, содержащие 0–30% D-аллюлозы, приводили к зависимому от концентрации снижению прироста массы тела и увеличению уровней уксусной, пропионовой и масляной кислот [21]. Iida et al. представили доказательства очень низкой калорийности D-аллюлозы, измеряя расход энергии при переваривании углеводов у людей. Было показано, что расход энергии на углеводы не увеличивался при приеме D-аллюлозы в дозе 0.35 г/кг массы тела, а сбраживаемость сахара составляла лишь часть сбраживаемости фруктозоолигосахаридов [22].

Присутствие D-аллюлозы в ежедневном рационе оказывает положительное влияние на здоровье как животных, так и людей [12, 14, 17, 23]. Выявлены многочисленные преимущества D-аллюлозы по сравнению с обычными сахарами, сахарными спиртами и искусственными подсластителями [2–5]. Был опубликован ряд всеобъемлющих обзоров, посвященных безопасности D-аллюлозы [23–26]. Таким образом, учитывая разнообразие полезного действия D-аллюлозы, как *in vitro*, так и *in vivo*, и отсутствие негативных эффектов в метаболических и токсикологических исследованиях, D-аллюлоза в настоящее время по праву считается наиболее перспективным редким сахаром. Однако из-за высоких отпускных цен на D-аллюлозу ее использование в качестве подсластителя ограничено.

ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ D-АЛЛЮЛОЗЫ

В связи с неоспоримыми преимуществами D-аллюлозы в качестве подсластителя, разработка эффективного промышленного способа производства этого редкого сахара – весьма важная задача. Известно несколько химических способов получения D-аллюлозы: первый заключается в эпимеризации глюкозы или 1,2:4,5-ди-O-изопропилиден-β-D-фруктопиранозы с использованием молибдата в качестве катализатора в высокотемпературных условиях [27, 28]; второй метод – это изомеризация фруктозы в ходе многостадийных химических превращений [29]. Недавно был описан способ изомеризации D-глюкозы в D-фруктозу с использованием спермина, где в качестве побочного продукта получали D-аллюлозу [30]. Существенными недостатками упомянутых способов считаются многостадийность процессов очистки целевого продукта D-аллюлозы, синтез множества побочных токсичных продуктов, загрязняющих окружающую среду, высокая итоговая стоимость процессов, что затрудняет их использование в промышленных масштабах.

В качестве альтернативы химическим методам получения D-аллюлозы в настоящее время рассматривается использование ферментов, катализирующих реакции эпимеризации различных са-

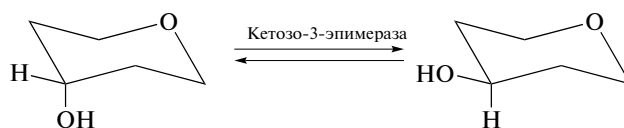


Рис. 1. Реакция эпимеризации, катализируемая кетозо-3-эпимеразой: обращение гидроксильной группы в хиральном центре (при C3). Гидроксильные группы в других положениях не показаны для ясности.

харов, приводящих к получению D-аллюлозы (рис. 1). Эти ферменты составляют группу эпимераз под общим названием кетозо-3-эпимеразы.

Первая такая кетозо-3-эпимераза была обнаружена и охарактеризована в 1993 г. у грамотрицательной почвенной бактерии *Pseudomonas cichorii* [31]. Отметим, что названия кетозо-3-эпимераз отражают тот субстрат, к которому фермент демонстрирует оптимальную специфичность. Поскольку оптимальным субстратом для кетозо-3-эпимеразы из *P. cichorii* была D-тагатоza, она была названа D-тагато-3-эпимераза (DTE, К.Ф. 5.1.3.31) [32]. В 2006 г. появилась публикация о второй кетозо-3-эпимеразе, D-аллюлозо-3-эпимеразе, из *Agrobacterium tumefaciens* (DAE, К.Ф. 5.1.3.30), для которой наиболее предпочтительным субстратом была D-аллюлоза [33], а в 2009 г. была охарактеризована третья кетозо-3-эпимераза, из *Rhodobacter sphaeroides*, продемонстрировавшая наивысшую активность по отношению к D-фруктозе и, соответственно, названная D-фруктозо-3-эпимеразой (DFE, К.Ф. 5.1.3.-) [34]. Позднее были обнаружены и охарактеризованы другие кетозо-3-эпимеразы из различных микроорганизмов, большинство из которых были D-аллюлозо-3-эпимеразами, за исключением L-рибулозо-3-эпимеразы (LRE, К.Ф. 5.1.3.-) из *Mesorhizobium loti*, для которой оптимальным субстратом была L-рибулоза [35].

ОБЩИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ СЕМЕЙСТВА D-КЕТОЗО-3-ЭПИМЕРАЗ

В настоящее время исследовано значительное количество ферментов, принадлежащих к семейству D-кетозо-3-эпимераз. Большинство ферментов этого семейства – бактериальные белки. Доступные данные об основных физико-химических и биохимических свойствах ферментов обобщены в табл. 1.

Ферменты семейства D-кетозо-3-эпимераз представляют собой, в большинстве случаев, тетрамеры, реже это димеры, молекулярная масса мономера которых составляет ~33–35 кДа. Большинство представленных в табл. 1 ферментов для проявления каталитической активности необходимы двухвалентные ионы Co^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} . Стоит отметить, что единственный фермент, не

Таблица 1. Свойства ферментов семейства кетозо-3-эпимераз

Организм	Молекулярный вес, кДа	$T_{опт}$, °C	pH _{опт}	Ионы	$T_{1/2}$, мин	K_m , мМ	k_{cat}^* , мин ⁻¹	k_{cat}/K_m	Соотношение равновесных концентраций	Удельная активность, ед./мг	Ссылки
<i>Agrobacterium</i> sp. ATCC 31749	132 (тетрамер)	55–60	7.5–8.0	Co ²⁺	267 (55°C, 0.1 мМ Co ²⁺) 64 (50°C)	110	6450	58.6	30 : 70 (55°C)	90.5 (50 мМ D-фруктоза)	[46]
<i>A. tumefaciens</i> ^a	132 (тетрамер)	50	8.0	Mg ²⁺		24	2068	85	33 : 67 (40°C)	8.89 (55.5 мМ D-фруктоза)	[33]
<i>Arthrobacter globiformis</i> M30	128 (тетрамер)	70	7.5–8.0	Mg ²⁺	н.д.	37.5	2509	66.9	27 : 73 (70°C)	н.д.	[47]
<i>Bacillus</i> sp. КСТС 13219	66 (димер)	55	8.0	Mn ²⁺	36000 (50°C)	130	22070	169.4	28.5 : 71.5	127.2	[41]
Метагеном из горячего источника	136 (тетрамер)	80	7.0	Co ²⁺	9900 (60°C)	141.4	2519	17.8	31 : 69	7	[42]
<i>Caballeronia fortuita</i>	132 (тетрамер)	65	7.5	Co ²⁺	63 (60°C)	81.9	9433	78.5	29.4 : 70.6	270	[48]
<i>Clostridium</i> sp.	130 (тетрамер)	65	8.0	Co ²⁺	15 (60°C)	279	16372	58.7	28 : 72 (65°C)	250	[44]
<i>C. botetiae</i>	139 (тетрамер)	55	7.0	Co ²⁺	156 (55°C, 0.4 мМ Co ²⁺) 408 (60°C)	59.8	3540	59	32 : 68 (60°C)	150.7	[36, 49]
<i>C. cellulolyticum</i> H10 ^b	132 (тетрамер)	55	8.0	Co ²⁺	0.1 мМ Co ²⁺) 108 (50°C)	53.5	3354.5	62.7	32 : 68 (55°C)	287	[37]
<i>C. scindens</i> 35704	139 (тетрамер)	60	7.5	Mn ²⁺	~120 (50°C, 1 мМ Co ²⁺)	40.1	350	8.7	28 : 72 (50°C)	171	[36, 50]
<i>Desmospora</i> sp. 8437	132 (тетрамер)	60	7.5	Co ²⁺	130 (без ионов, 60°C)	549	63573	116	30 : 70 (60°C)	252.1	[36, 51]
<i>Dorea</i> sp. CAG317	128 (тетрамер)	70	6.0	Co ²⁺	~30 (60°C)	153	30447	199	30 : 70 (70°C)	803.5	[36]
<i>Flavonifractor plautii</i>	132 (тетрамер)	65	7.0	Co ²⁺	130 (60°C)	323	20520	64	31 : 69	8.22 ^в	[45]
<i>Halanaerobium congolense</i>	138 (тетрамер)	70	8.0	Mg ²⁺	96 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	33 : 67	183.54 ^г	[43]
<i>Novibacillus thermophilus</i>	130 (тетрамер)	70	7.0	Co ²⁺	47.8 (60°C)	29.7	9275	312.3	28.3 : 71.7	н.д.	[52]
<i>Pirellula</i> sp.	69 (димер)	60	7.5	Co ²⁺	360 (60°C)	74.7	2832	37.9	30 : 70	н.д.	[38]
<i>Paenibacillus senegalensis</i>	33.5 (мономер)	55	8.0	Co ²⁺	140 (60°C)	366.7	2455.2	6.7	30 : 70	25.2	[53]
<i>Pseudomonas</i> sp. ST-24	68 (димер)	60	7.5	Не требуются	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	20 : 80 (30°C)	н.д.	[32]
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> SK011	64 (димер)	40	9.0		н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	23 : 77 (40°C)	н.д.	[34]
<i>Rhodopirellula ballica</i>	60 (димер)	60	8.0		52.3 (60°C)	78.13	894.29	11.45	23.1 : 76.9	11.7	[54]
<i>Ruminococcus</i> sp.	132 (тетрамер)	60	7.5–8.0	Mn ²⁺	96 (60°C)	216	3562	16	28 : 72 (60°C)	8.95 (без ионов)	[55]
<i>Sinorhizobium</i> sp.	68 (димер)	50	8.0	Mn ²⁺	934 (40°C)	54.7	3000	54.6	30.1 : 69.9	н.д.	[39, 56]
<i>Staphylococcus aureus</i>	134 (тетрамер)	70	8.0	Mg ²⁺	120 (70°C)	59.3	1374	23.2	28.3 : 71.7 (60°C)	н.д.	[57]
<i>Thermoclostridium caenicola</i>	66 (димер)	65	7.5	Co ²⁺	816 (50°C)	94.5	12270	130	29.2 : 70.8 (50°C)	н.д.	[40]
<i>Treponema primitia</i> ZAS-1	33 (мономер)	70	8.0	Co ²⁺	~30 (50°C)	279	17573	63	28 : 72 (70°C)	227.5 (278 мМ D-фруктоза)	[58]

Примечание: н.д. — нет данных.
* k_{cat} [мин⁻¹] = k_{cat} [с⁻¹] × 60.

^a В статье Patel et al. [59] описан химерный белок D-аллүлозо-3-эпимераза + N-конец дрожжевого гомолога SUMO (Smt3), обладающий большей термостабильностью, лучшей каталитической эффективностью и продуктивностью в сравнении с диким типом.

^б Кристаллическая структура и механизм катализа описаны в статье Chan et al. [60].

^в Относительная активность D-фруктозы составляет 44,1% от активности в отношении D-аллүлозы (20 ед./мг).

^г Относительная активность D-фруктозы составляет ~60% от активности в отношении D-аллүлозы (305.9 ед./мг).

требующий кофактора для проявления активности — это D-тагатозо-3-эпимераза из *Pseudomonas* sp. ST-24 [32]. В основном pH-оптимум лежит в нейтрально-слабощелочной области — pH 7.0–9.0. Однако pH-оптимум у D-аллюлозо-3-эпимеразы из *Dorea* sp. CAG317 находится в слабокислой области (pH 6.0), что способствует подавлению неферментативных реакций, приводящих к образованию побочных продуктов [36].

В основном эти ферменты действуют в достаточно широком диапазоне температур 40–80°C, но высокой температурной стабильностью отличается ограниченное число ферментов: D-тагатозо-3-эпимеразы из *Clostridium cellulolyticum* H10 (время полужизни 408 мин при 60°C, оптимум 55°C) [37], *Pirellula* sp. (360 мин при 60°C, оптимум 60°C) [38], *Sinorhizobium* sp. (934 мин при 40°C, оптимум 50°C) [39], *Thermoclostridium caenicola* (816 мин при 50°C, оптимум 65°C) [40], а также ферменты D-аллюлозо-3-эпимеразы из *Bacillus* sp. (600 ч при 50°C, оптимум 55°C) [41] и D-аллюлозо-3-эпимеразы из метабенома горячего источника в Татапани (DaeM, 165 ч при 60°C, оптимум 80°C) [42]. Для остальных ферментов время полужизни находится в диапазоне 15–267 мин; для 12 из 16 ферментов внутри диапазона этот показатель не превышает 120 мин.

Поскольку реакции эпимеризации, катализируемые кетозо-3-эпимеразами, обратимы, для преимущественного получения конечного продукта необходимо учитывать равновесные концентрации исходного субстрата и продукта. Так, оптимальное соотношение равновесных концентраций D-аллюлозы к D-фруктозе у ферментов из *A. tumefaciens* составляет 33 : 67 [33], *Halanaerobium congolense* — 33 : 67 [43], *Clostridium bolteae* — 32 : 68 [44], *C. cellulolyticum* — 32 : 68 [37], DaeM — 31 : 69 [42] и *Flavonifractor plautii* — 31 : 69 [45]. В целом равновесные концентрации D-аллюлозы к D-фруктозе для D-аллюлозо-3-эпимераз находятся в диапазоне 20–33%, примерно в половине представленных в табл. 1 случаев — менее 30%.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КЕТОЗО-3-ЭПИМЕРАЗ

Согласно классификации углеводов-эпимераз, предложенной в 2015 г. Van Overtveldt et al. [61] на основе анализа свойств, гомологий первичных последовательностей, идентичности третичных структур и механизмов действия, кетозо-3-эпимеразы относятся к семейству CEP2 (carbohydrate epimerases, К.Ф. 5.1.3), которые действуют по механизму протонирования/депротонирования. Семейство CEP2 включает такие ферменты, как D-тагатозо-3-эпимераза (К.Ф. 5.1.3.31), D-психозо-3-эпимераза (К.Ф. 5.1.3.30), L-рибулозо-5-фосфат-3-эпимераза (К.Ф. 5.1.3.22), L-рибулозо-3-эпимераза, D-тагатуронат-3-эпимераза.

На сегодняшний день существуют убедительные структурные доказательства того, что кетозо-3-эпимеразы действуют по механизму депротонирования/репротонирования в положении C3, что подразумевает наличие кетогруппы в положении C2 после раскрытия кольца кетозы и иона двухвалентного металла в активном центре фермента для стабилизации промежуточного соединения *цис*-эндиолата. Решены кристаллические структуры L-рибулозо-3-эпимеразы из *Mesorhizobium loti* (PDB: 3VYL) [62], D-тагатозо-3-эпимеразы из *Pseudomonas cichorii* (PcDTE; PDB: 2QUL) [63], D-аллюлозо-3-эпимеразы из *Agrobacterium tumefaciens* (PDB: 2HK0, 2HK1) [64], D-аллюлозо-3-эпимеразы из *Clostridium cellulolyticum* (PDB: 3VNI, 3VNJ, 3VNI, 3VNL, 3VNM) [60], D-тагатозо-3-эпимеразы из *Rhodobacter sphaeroides* (RsDTE) [65], D-аллюлозо-3-эпимеразы из *Arthrobacter globiformis* [66] и др. В деталях возможный механизм реакции депротонирования/репротонирования, катализируемой углеводов-эпимеразами семейства CEP2, представлен на рис. 2 и обсуждается ниже. Депротонирование и репротонирование происходят при участии двух консервативных каталитических остатков глутаминовой кислоты. Рентгеновские структуры других углеводов-эпимераз в комплексах с моносахаридами в кольцевой форме способствовали уточнению механизмов раскрытия сахарных колец, катализируемых ферментами [67–78].

Наиболее подробно молекулярный механизм катализа эпимеризации D-фруктозы в D-аллюлозу исследован для используемой в промышленности D-тагатозо-3-эпимеразы из *P. cichorii* (PcDTE, PDB: 2QUL) [63, 79] (рис. 2). D-Тагатозо-3-эпимераза из *P. cichorii* (PcDTE), обладающая широкой субстратной специфичностью, эффективно катализирует эпимеризацию не только D-тагатозы до D-сорбозы, но и D-фруктозы до D-аллюлозы. Субстрат (D-фруктоза) располагается в каталитическом центре фермента, который содержит ион металла, координируемый четырьмя аминокислотными остатками (Glu152, Asp185, His211 и Glu246) [63, 79] (рис. 2а и 2б). Еще три остатка (Glu158, His188 и Arg217) образуют водородные связи с молекулами воды вблизи сайта связывания металла. В процессе связывания D-фруктозы субстрат заменяет молекулу воды в активном центре фермента, при этом остаток His188 отдает протон атому O2, а остатки Glu152 и Glu256 удаляют протоны из O3 и C3 соответственно с образованием промежуточного эндиолата-*цис*-эндиолата, имеющего плоскую структуру O2–C2–C3–O3, стабилизированную остатками His188, Arg217 и ионом металла (рис. 2а и 2б). Затем происходит перенос протона от остатка Glu246 к кислородному атому O3 и от Glu152 к C3 с образованием D-аллюлозы (рис. 2а и 2б).

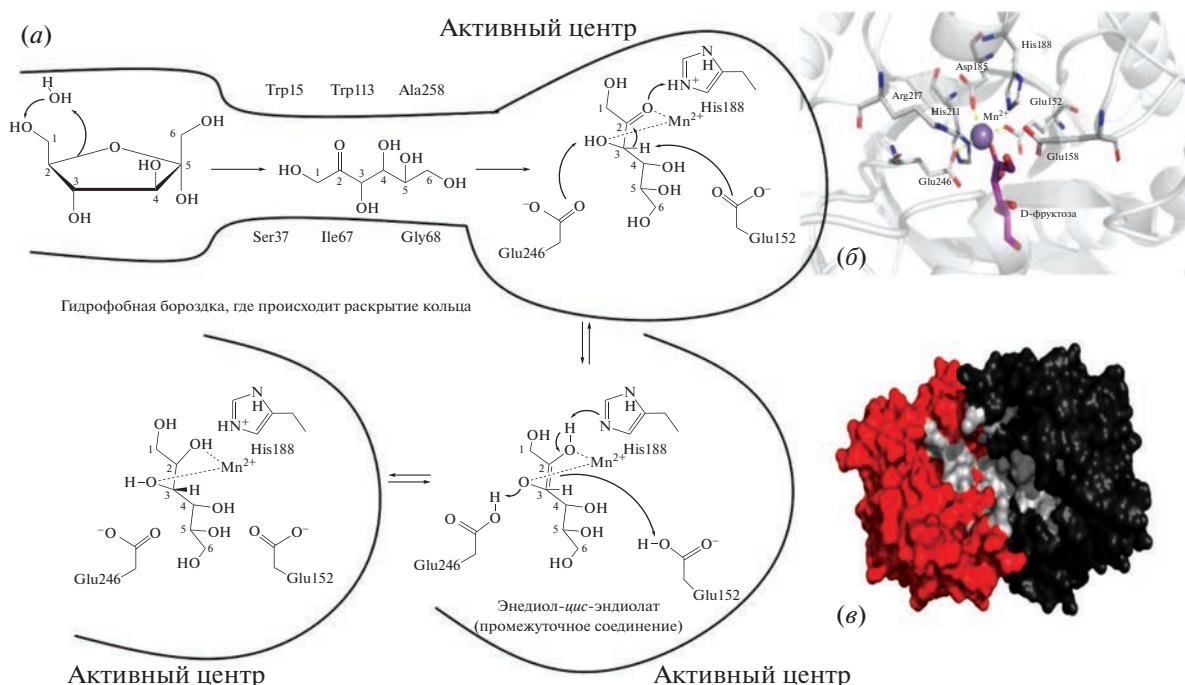


Рис. 2. Молекулярный механизм катализа реакции эпимеризации и структурные особенности D-тагато-3-эпимеразы из *P. cichorii*. (а) – Схема молекулярного механизма катализа реакции эпимеризации D-фруктозы в D-аллюлозу; (б) – структура D-тагато-3-эпимеразы из *P. cichorii* (PDB ID: 2qun), визуализированная в программе PyMol. Каталитические остатки и остатки, координирующие ион Mn^{2+} (Glu152, Glu158, Asp185, His188, His211, Arg217, Glu246), показаны в скелетном отображении (серый цвет); ион металла, Mn^{2+} , изображен в виде сиреневой сферы; субстрат (D-фруктоза) обозначен фиолетовым цветом. Взаимодействие атомов аминокислотных остатков с ионом металла указано желтой пунктирной линией; (в) – D-тагато-3-эпимераза из *P. cichorii* (PDB ID: 2qun), димерная структура, образованная цепью А (красный цвет) и цепью В (черный цвет). Аминокислотные остатки, составляющие гидрофобную бороздку на доступной растворителю поверхности в интерфейсе субъединиц, выделены серым (Trp15, Ile67, Trp113, Pro114, Pro117, Leu119, Phe157, Trp160, Ala258 и Trp262 обеих цепей).

Более поздние структурные исследования этого же фермента с различными лигандами [80] выявили дополнительные особенности молекулярного механизма, а именно катализ кетозо-3-эпимеразой раскрытия фуранозного и/или пиранозного кольца исходного сахарного остатка для прохождения последующей реакции эпимеризации. Исследователи предположили, что субстрат в кольцевой форме связывается с каталитическим центром фермента, в котором аминокислотные остатки или молекула воды действуют как кислотно-основной катализатор раскрытия кольца. Субстрат в форме фуранозного кольца приближается к гидрофобной бороздке димерного фермента, образованной остатками Trp15, Ser37, Ile67, Gly68, Trp113 и Ala258 (рис. 2а и 2в). Молекула воды в ней переносит протон от О3 к О6, способствуя раскрытию фуранозного кольца и смещая положение равновесия между линейной и кольцевой формами к линейной, после чего молекула сахара в линейной форме перемещается к активному центру (рис. 2а).

Ранее было показано, что ферменты D-тагато-3-эпимераза из *P. cichorii* и D-аллюлозо-3-эпимераза из *A. tumefaciens* имеют похожую организа-

цию активного центра белка (рис. 3). Ферменты представляют собой гомотетрамеры, каждая мономерная субъединица которых характеризуется α/β -бочкообразной структурой (TIM-barrel fold). Активный центр белка расположен в гидрофобной бороздке между двумя субъединицами тетрамера. Оба фермента металлозависимы и содержат в активном центре ион металла, который координируется четырьмя аминокислотными остатками (Glu152, Asp185, His211 и Glu246 в случае D-тагато-3-эпимеразы из *P. cichorii*; Glu150, Asp183, His209 и Glu244 в случае D-аллюлозо-3-эпимеразы из *A. tumefaciens*) [63, 79]. Еще три остатка (Glu158/156, His188/185 и Arg217/215) образуют водородные связи с молекулами воды вблизи сайта связывания металла.

Другие известные кетозо-3-эпимеразы демонстрируют 25–80% гомологии аминокислотных последовательностей между собой и обладают очень похожими трехмерными структурами. Остатки, расположенные в каталитических центрах и взаимодействующие с О1, О2 и О3 кетозы, строго консервативны, что указывает на один и тот же каталитический механизм. Однако хорошо заметно, что в структурах есть неконсервативные

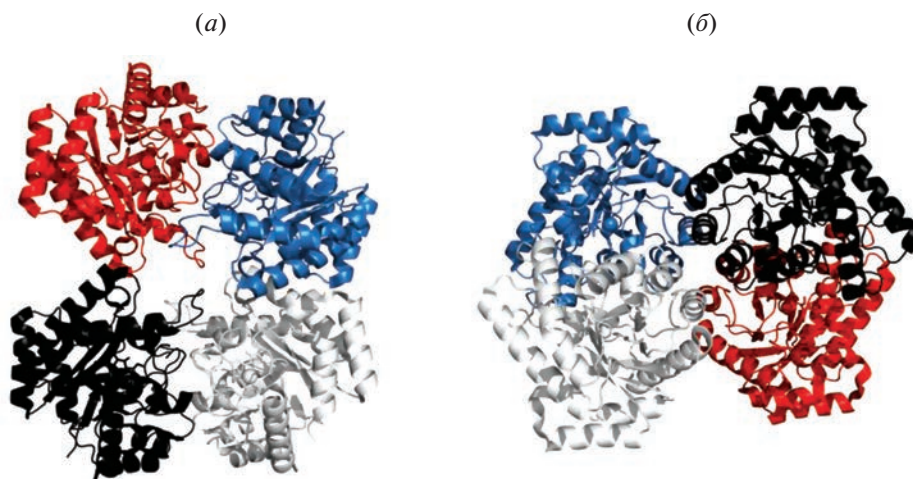


Рис. 3. Общий вид на тетрамерные структуры D-тагатозо-3-эпимераз: (а) – D-тагатозо-3-эпимераза из *P. cichorii* (PDB ID: 2qun); (б) – D-тагатозо-3-эпимераза из *A. tumefaciens* (PDB ID: 2hk1). Цепь А выделена красным цветом, цепь В – белым, цепь С – голубым, цепь D – черным.

аминокислотные остатки, образующие гидрофобную полость, которая охватывает О4, О5 и О6 кетозы, что и указывает на различную субстратную специфичность [81].

БИОИНЖЕНЕРИЯ КЕТОЗО-3-ЭПИМЕРАЗ

Как было показано ранее, большинство ферментов семейства кетозо-3-эпимераз отличается сравнительно низким диапазоном температурной стабильности, что наряду с относительно невысокими выходами целевого продукта препятствует широкому использованию нативных форм кетозо-3-эпимераз в промышленном производстве D-аллюлозы. В поисках решения этих проблем исследователи активно ищут модификации, которые, будучи введены в структуры ферментов, смогут привести к улучшению их термостабильности и каталитической активности. Условно такие изменения в структурах кетозо-3-эпимераз можно разделить на две группы по локализации вносимых замен: аминокислотные остатки, составляющие интерфейс, и остатки, находящиеся вблизи активного центра. К первой группе чаще всего относятся мутации, стабилизирующие структуру и повышающие термостабильность ферментов за счет образования новых водородных связей между отдельными субъединицами; ко второй – мутации, влияющие на каталитическую активность и аффинность к субстрату. Обобщенные данные об известных модификациях ряда кетозо-3-эпимераз приведены в табл. 2.

В 2013 г. Bosshart et al. предложили внесение замен аминокислотных остатков, расположенных в интерфейсе субъединиц мультимерных ферментов, для повышения их термостабильности [82]. В дальнейшем эта стратегия часто ис-

пользовалась для улучшения свойств ферментов семейства D-тагатозо-3-эпимераз. Bosshart et al. в работе 2015 г. применили к D-тагатозо-3-эпимеразе из *P. cichorii* метод итеративного насыщающего мутагенеза: 50 а.о. в радиусе 10 Å от С3-атома D-фруктозы были отобраны для дальнейшего скрининга и мутагенеза. Полученная мутантная форма продемонстрировала в 8.6 раз более высокую каталитическую активность. Однако такое улучшение сопровождалось ухудшением термостабильности фермента: снижение температуры, при которой происходит 50%-ное падение активности, составило 11.8°C. Соотношение k_{cat}/K_m осталось практически неизменным по сравнению с таковым у нативной формы фермента, т.к. вместе с ростом значения числа оборотов в секунду росло и значение K_m [83]. Zhang et al. в работе 2018 г. сконструировали мутантную форму F154Y/E191D/I193F фермента из *Dorea* sp. схожим методом, заменив остатки, находящиеся в интерфейсе субъединиц. За счет появления новых водородных связей и повышения стабильности структуры гидрофобной полости на поверхности субъединиц время полужизни фермента было увеличено в 5 раз, а температура плавления – на 17.5°C [84].

Другой рациональный подход к внесению замен – отбор вблизи каталитического центра неконсервативных аминокислотных остатков, потенциально участвующих в распознавании субстрата. Так, в D-аллюлозо-3-эпимеразе из *Clostridium bolteae* внесение замен Y68I/G109P позволило сократить расстояние между активным центром и D-фруктозой, а также способствовало формированию новой водородной связи, что значительно увеличило время полужизни фермента и его каталитическую активность. Отметим, что по отдельности замены обладали про-

Таблица 2. Мутантные формы ферментов семейства кетозо-3-эпимераз

Организм	Внесенные замены	$T_{\text{опт}}, ^\circ\text{C}$	pH _{опт}	$T_{\text{пл}}, ^\circ\text{C}$	$T_{1/2}, \text{мин}$	$K_m, \text{мМ}$	$k_{\text{cat}}, \text{мин}^{-1}$	k_{cat}/K_m	Соотношение равновесных концентраций	Относительная активность, %	Ссылка
<i>Staphylococcus aureus</i>	Дикий тип	70	8.0	67	120 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	28.3 : 71.7 (60°C)	100	[57]
	V105A	70	8.0	н.д.	н.д.	37.8	3296	87.2	38.9 : 61.1 (60°C)	168	
	S209C	70	8.0	70	195 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	[86]
	S188D/M190F	70	8.0	71.5	222 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	
	S209C/S188D/M190F	70	8.0	74.2	274 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	V105A/S209C/S188D/M190F	70	8.0	74.6	280 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	[86]
	Дикий тип	50	8.0	60.5	62 (50°C)	44	4300	99	н.д.	100	
	I33L	52.5	8.0	64.8	202 (50°C)	42	4200	101	н.д.	н.д.	
	S213C	55	8.0	63.6	445 (50°C)	40	4200	105	н.д.	н.д.	
	I33L/S213C	57.5	8.0	68.1	1853 (50°C)	31	4100	134	н.д.	н.д.	
<i>Rhodopirellula baltica</i>	Дикий тип	60	8.0	45.7	52.3 (60°C)	78.1	894.3	11.45	23.1 : 76.9	100	[54]
	L144F	60	8.0	58.3	102.7 (60°C)	72.1	1251.7	17.36	28.6 : 71.4	156	
	Дикий тип	70	6.0	56.64	36 (60°C)	н.д.	н.д.	н.д.	22.8 : 77.2	100	[84]
<i>Dorea</i> sp. CAG317	F154Y/E191D/I193F	75	6.0	74.18	185.4 (60°C)	164.4–186.5	н.д.	134.2–172.1	29.6 : 70.4	98.3	
<i>Halanaerobium congolense</i>	Дикий тип	70	8.0	73	66 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	33 : 67*	100	[43]
	Y7H/C66L/I108A	70	8.0	74.5	228 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	345	
	Y7H/C66L/I108A/R156C/K260C	70	8.0	79.5	312 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	33 : 67*	н.д.	
<i>Clostridium botteae</i>	Дикий тип	55	7.0	61.1	156 (55°C)	59.8	3543	59.2	н.д.	100	[85]
	Y68I	60	7.0	60.3	122.8 (55°C)	46	3764	81.7	н.д.	153.8	
	G109P	60	7.0	66.7	327.4 (55°C)	86.1	2656	30.9	н.д.	72.8	
	Y68I/G109P	60	7.0	63.5	264 (55°C)	49.1	3620	73.7	н.д.	100	

Примечание: н.д. – нет данных.

* Время достижения плато для дикого типа составляет 5 ч, для мутантной формы Y7H/C66L/I108A/R156C/K260C – 3 ч.

тивоположным эффектом: активность мутантной формы Y68I составляла 168% от нативной, но и время ее полужизни в сравнении с диким типом уменьшалось почти в 1.3 раза; активность G109P составляла лишь ~73% от активности нативного фермента, а время полужизни возрастало более чем в 2 раза. Одновременное внесение этих замен позволило компенсировать нежелательные эффекты и получить мутантную форму, улучшенную по обоим показателям [85]. При проведении структурного анализа фермента из *Staphylococcus aureus* было установлено, что остаток V105 входит в группу остатков, составляющих гидрофобное окружение субстрата и отвечающих за его распознавание. Исследователи выбрали этот остаток в качестве стартовой точки для рационального редизайна белка. Одна из полученных мутантных форм, V105A, проявила каталитическую активность по отношению к D-фруктозе, превышающую активность фермента дикого типа на 68%. Далее были внесены группы замен S209C, S188D/M190F и S188D/M190F/S209C — все эти остатки располагаются у поверхности активного центра фермента. Внесение этих замен улучшило термостабильность фермента [57].

Некоторые исследователи скомбинировали два подхода, выбрав в качестве мишеней для мутаций остатки, как входящие в интерфейс (либо служащие повышению структурной стабильности иным образом), так и приближенные к активному центру. Zhu et al. внесли в D-аллюлозо-3-эпимеразу из *Halanaerobium congolense* одновременно две группы замен: Y7H/C66L/I108A — остатки, отвечающие за распознавание субстрата, и R156C/K260C — остатки, способные формировать дисульфидный мостик. Замены первой группы позволили увеличить активность фермента на 245%, а замены второй группы повысили время его полужизни в 5.7 раз по сравнению с диким типом (в ~1.7 раз в сравнении с мутантной формой Y7H/C66L/I108A) [43].

Кроме того, для изменения свойств кетозо-3-эпимераз были применены такие методы, как случайный мутагенез и анализ В-факторов. В 2020 г. Mao et al. выделили группу подвижных остатков с высоким значением В-фактора. Несмотря на то что многие полученные мутантные формы продемонстрировали более высокое время полужизни по сравнению с диким типом, прирост в каталитической активности большинства из них был достаточно скромным; форма L144F, однако, продемонстрировала улучшение и термостабильности, и активности фермента за счет увеличения интенсивности гидрофобных взаимодействий [54]. Choi et al. в результате случайного мутагенеза *A. tumefaciens* выявили мутантные формы S213C и I33L с повышенной термостабильностью. Этот эффект они объяснили увеличением количества водородных связей и появлением

стэкинг-взаимодействий в молекулярном окружении внесенных замен [86].

Известно, что в слабощелочной среде помехой производству D-аллюлозы могут служить побочные неферментативные реакции, продукты которых необходимо удалять по окончании процесса [36]. Однако в литературе мы не нашли задокументированных попыток изменить оптимальный pH для проведения реакций катализа ферментами данного семейства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что промышленные производства D-аллюлозы уже существуют в разных странах, описано и используется немало ферментов для синтеза этого редкого сахара, вопросы по повышению эффективности этих производств, увеличению выходов, стабильности и каталитической активности кетозо-3-эпимераз по-прежнему остаются открытыми и требующими неординарных решений. С одной стороны, существующая детализированная информация о структуре и молекулярном механизме действия кетозо-3-эпимераз активно используется при попытках повысить термостабильность и каталитическую активность этих ферментов. С другой стороны, все еще не преодолена проблема высокой себестоимости ферментативного производства целевой D-аллюлозы, которую пытаются решать путем иммобилизации ферментов, использования микробных целлюлозных систем синтеза, а также дешевых источников доступных сахаров, подвергающихся эпимеризации. Расширение потенциала кетозо-3-эпимераз для производства D-аллюлозы на коммерческом уровне требует дополнительных усилий, касающихся как разработки методов конечной очистки целевого моносахарида, так и способов улучшения ферментов на молекулярном уровне. Для успешной модификации кетозо-3-эпимераз необходимо применение передовых научных методов на стыке биофизики, биохимии, молекулярной биологии, химии и генетики.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме “Функциональная и структурная организация сложных, мультикомпонентных систем и их динамика” (регистрационный номер 121060200127-6).

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. Karabinos J.V. // Adv. Carbohydr. Chem. 1952. V. 7. P. 99–136.
[https://doi.org/10.1016/s0096-5332\(08\)60083-1](https://doi.org/10.1016/s0096-5332(08)60083-1)
2. Oshima H., Kimura I., Izumori K. // Food Sci. Technol. Res. 2006. V. 12. P. 137–143.
<https://doi.org/10.3136/fstr.12.137>
3. Fukada K., Ishii T., Tanaka K., Yamaji M., Yamaoka Y., Kobashi K., Izumori K. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 2010. V. 83. P. 1193–1197.
<https://doi.org/10.1246/bcsj.20100148>
4. O'Charoen S., Hayakawa S., Ogawa M. // Int. J. Food Sci. Technol. 2014. V. 50. P. 194–202.
<https://doi.org/10.1111/ijfs.12607>
5. Zhang W., Yu S., Zhang T., Jiang B., Mu W. // Trends Food Sci. Technol. 2016. V. 54. P. 127–137.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.06.004>
6. Mu W., Zhang W., Feng Y., Jiang B., Zhou L. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 94. P. 1461–1467.
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4093-1>
7. Nishii N., Nomizo T., Takashima S., Matsubara T., Tokuda M., Kitagawa H. // J. Vet. Med. Sci. 2016. V. 78. P. 1079–1083.
<https://doi.org/10.1292/jvms.15-0676>
8. Yagi K., Matsuo T. // J. Clin. Biochem. Nutr. 2009. V. 45. P. 271–277.
<https://doi.org/10.3164/jcbrn.08-191>
9. Harada M., Kondo E., Hayashi H., Suezawa C., Suguri S., Arai M. // Parasitol. Res. 2012. V. 110. P. 1565–1567.
<https://doi.org/10.1007/s00436-011-2660-5>
10. Chung M.-Y., Oh D.-K., Lee K.W. // J. Agric. Food Chem. 2012. V. 60. P. 863–869.
<https://doi.org/10.1021/jf204050w>
11. Murao K., Yu X., Cao W.M., Imachi H., Chen K., Muraoka T., Kitanaka N., Li J., Ahmed R.A.M., Matsumoto K., Nishiuchi T., Tokuda M., Ishida T. // Life Sci. 2007. V. 81. P. 592–599.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.06.019>
12. Iida T., Kishimoto Y., Yoshikawa Y., Hayashi N., Okuma K., Tohi M., Yagi K., Matsuo T., Izumori K. // J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo). 2008. V. 54. P. 511–514.
<https://doi.org/10.3177/jnsv.54.511>
13. Hayashi N., Iida T., Yamada T., Okuma K., Takehara I., Yamamoto T., Yamada K., Tokuda M. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2010. V. 74. P. 510–519.
<https://doi.org/10.1271/bbb.90707>
14. Hossain M.A., Kitagaki S., Nakano D., Nishiyama A., Funamoto Y., Matsunaga T., Tsukamoto I., Yamaguchi F., Kamitori K., Dong Y., Hirata Y., Murao K., Toyoda Y., Tokuda M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. V. 405. P. 7–12.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.091>
15. Baek S.H., Park S.J., Lee H.G. // J. Food Sci. 2010. V. 75. P. H49–H53.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01434.x>
16. Itoh K., Mizuno S., Hama S., Oshima W., Kawamata M., Hossain A., Ishihara Y., Tokuda M. // J. Food Sci. 2015. V. 80. P. H1619–H1626.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12908>
17. Chen J., Huang W., Jiang B. // FASEB J. 2017. V. 31. P. 798.1.
https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1_supplement.798.1
18. Ochiai M., Onishi K., Yamada T., Iida T., Matsuo T. // Int. J. Food Sci. Nutr. 2014. V. 65. P. 245–250.
<https://doi.org/10.3109/09637486.2013.845653>
19. Iwasaki Y., Sendo M., Dezaki K., Hira T., Sato T., Nakata M., Goswami C., Aoki R., Arai T., Kumari P., Hayakawa M., Masuda C., Okada T., Hara H., Drucker D.J., Yamada Y., Tokuda M., Yada T. // Nat. Commun. 2018. V. 9. P. 113.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02488-y>
20. Matsuo T., Suzuki H., Hashiguchi M., Izumori K. // J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo). 2002. V. 48. P. 77–80.
<https://doi.org/10.3177/jnsv.48.77>
21. Matsuo T., Tanaka T., Hashiguchi M., Izumori K., Suzuki H. // Asia Pac. J. Clin. Nutr. 2003. V. 12. P. 225–231.
22. Iida T., Hayashi N., Yamada T., Yoshikawa Y., Miyazato S., Kishimoto Y., Okuma K., Tokuda M., Izumori K. // Metabolism. 2010. V. 59. P. 206–214.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.07.018>
23. Kimura T., Kanasaki A., Hayashi N., Yamada T., Iida T., Nagata Y., Okuma K. // Nutrition. 2017. V. 43–44. P. 16–20.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.06.007>
24. Hofer S.J., Davinelli S., Bergmann M., Scapagnini G., Madeo F. // Front. Nutr. 2021. V. 8. P. 717343.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2021.717343>
25. Mooradian A.D., Smith M., Tokuda M. // Clin. Nutr. ESPEN. 2017. V. 18. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2017.01.004>
26. Lê K.A., Robin F., Roger O. // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2016. V. 19. P. 310–315.
<https://doi.org/10.1097/mco.0000000000000288>
27. Bilik V., Tihlarik K. // Chem. Pap. 1973. V. 28. P. 106–109.
https://chempap.org/file_access.php?file=281a106.pdf
28. McDonald E.J. // Carbohydr. Res. 1967. V. 5. P. 106–108.
[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(67\)85014-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(67)85014-6)
29. Doner L.W. // Carbohydr. Res. 1979. V. 70. P. 209–216.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)87101-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)87101-3)
30. Kumar S., Sharma S., Kansal S.K., Elumalai S. // ACS Omega. 2020. V. 5. P. 2406–2418.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03918>
31. Izumori K., Khan A.R., Okaya H., Tsumura T. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1993. V. 57. P. 1037–1039.
<https://doi.org/10.1271/bbb.57.1037>
32. Itoh H., Okaya H., Khan A.R., Tajima S., Hayakawa S., Izumori K. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1994. V. 58. P. 2168–2171.
<https://doi.org/10.1271/bbb.58.2168>
33. Kim H.-J., Hyun E.-K., Kim Y.-S., Lee Y.-J., Oh D.-K. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 981–985.
<https://doi.org/10.1128/aem.72.2.981-985.2006>

34. Zhang L., Mu W., Jiang B., Zhang T. // *Biotechnol. Lett.* 2009. V. 31. P. 857–862.
<https://doi.org/10.1007/s10529-009-9942-3>
35. Uechi K., Takata G., Fukai Y., Yoshihara A., Morimoto K. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013. V. 77. P. 511–515.
<https://doi.org/10.1271/bbb.120745>
36. Zhang W., Li H., Zhang T., Jiang B., Zhou L., Mu W. // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2015. V. 120. P. 68–74.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.05.018>
37. Mu W., Chu F., Xing Q., Yu S., Zhou L., Jiang B. // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 7785–7792.
<https://doi.org/10.1021/jf201356q>
38. Li C., Li L., Feng Z., Guan L., Lu F., Qin H.-M. // *Food Chem.* 2021. V. 357. P. 129746.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129746>
39. Zhu Z., Li C., Liu X., Gao D., Wang X., Tanokura M., Qin H.-M., Lu F. // *RSC Adv.* 2019. V. 9. P. 2919–2927.
<https://doi.org/10.1039/c8ra10029b>
40. Chen J., Chen D., Ke M., Ye S., Wang X., Zhang W., Mu W. // *Mol. Biotechnol.* 2021. V. 63. P. 534–543.
<https://doi.org/10.1007/s12033-021-00320-z>
41. Patel S.N., Kaushal G., Singh S.P. // *Microb. Cell Fact.* 2021. V. 20. P. 60.
<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01550-1>
42. Patel S.N., Kaushal G., Singh S.P. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2020. V. 86. P. e02605-19.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02605-19>
43. Zhu Z., Li L., Zhang W., Li C., Mao S., Lu F., Qin H.-M. // *Enzyme Microb. Technol.* 2021. V. 149. P. 109850.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109850>
44. Mu W., Zhang W., Fang D., Zhou L., Jiang B., Zhang T. // *Biotechnol. Lett.* 2013. V. 35. P. 1481–1486.
<https://doi.org/10.1007/s10529-013-1230-6>
45. Park C.-S., Kim T., Hong S.-H., Shin K.-C., Kim K.-R., Oh D.-K. // *PLoS One.* 2016. V. 11. P. e0160044.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160044>
46. Tseng W.-C., Chen C.-N., Hsu C.-T., Lee H.-C., Fang H.-Y., Wang M.-J., Wu Y.-H., Fang T.-Y. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 112. P. 767–774.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.036>
47. Yoshihara A., Kozakai T., Shintani T., Matsutani R., Ohtani K., Iida T., Akimitsu K., Izumori K., Gullapalli P.K. // *J. Biosci. Bioeng.* 2017. V. 123. P. 170–176.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.004>
48. Li S., Chen Z., Zhang W., Guang C., Mu W. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 138. P. 536–545.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.112>
49. Jia M., Mu W., Chu F., Zhang X., Jiang B., Zhou L.L., Zhang T. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. P. 717–725.
<https://doi.org/10.1007/s00253-013-4924-8>
50. Zhang W., Fang D., Xing Q., Zhou L., Jiang B., Mu W. // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. e62987.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062987>
51. Zhang W., Fang D., Zhang T., Zhou L., Jiang B., Mu W. // *J. Agric. Food Chem.* 2013. V. 61. P. 11468–11476.
<https://doi.org/10.1021/jf4035817>
52. Jia D.-X., Sun C.-Y., Jin Y.-T., Liu Z.-Q., Zheng Y.-G., Li M., Wang H.-Y., Chen D.-S. // *Enzyme Microb. Technol.* 2021. V. 148. P. 109816.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109816>
53. Yang J., Tian C., Zhang T., Ren C., Zhu Y., Zeng Y., Men Y., Sun Y., Ma Y. // *Biotechnol. Bioeng.* 2019. V. 116. P. 745–756.
<https://doi.org/10.1002/bit.26909>
54. Mao S., Cheng X., Zhu Z., Chen Y., Li C., Zhu M., Liu X., Lu F., Qin H.-M. // *Enzyme Microb. Technol.* 2020. V. 132. P. 109441.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109441>
55. Zhu Y., Men Y., Bai W., Li X., Zhang L., Sun Y., Ma Y. // *Biotechnol. Lett.* 2012. V. 34. P. 1901–1906.
<https://doi.org/10.1007/s10529-012-0986-4>
56. Oh D.-K., Kim N.-H., Kim H.-J., Park C.-S., Kim S.-W., Ko M., Park B., Jung M., Yoon K.-H. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 23. P. 559–563.
<https://doi.org/10.1007/s11274-006-9265-7>
57. Zhu Z., Gao D., Li C., Chen Y., Zhu M., Liu X., Tanokura M., Qin H.-M., Lu F. // *Microb. Cell Fact.* 2019. V. 18. P. 59.
<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1107-z>
58. Zhang W., Zhang T., Jiang B., Mu W. // *J. Sci. Food Agric.* 2016. V. 96. P. 49–56.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.7187>
59. Patel S.N., Sharma M., Lata K., Singh U., Kumar V., Sangwan R.S., Singh S.P. // *Bioresour. Technol.* 2016. V. 216. P. 121–127.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.053>
60. Chan H.-C., Zhu Y., Hu Y., Ko T.-P., Huang C.-H., Ren F., Chen C.-C., Ma Y., Guo R.-T., Sun Y. // *Protein Cell.* 2012. V. 3. P. 123–131.
<https://doi.org/10.1007/s13238-012-2026-5>
61. Van Overtveldt S., Verhaeghe T., Joosten H.-J., van den Bergh T., Beerens K., Desmet T. // *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. P. 1814–1828.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.010>
62. Uechi K., Sakuraba H., Yoshihara A., Morimoto K., Takata G. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2013. V. 69. P. 2330–2339.
<https://doi.org/10.1107/s0907444913021665>
63. Yoshida H., Yamada M., Nishitani T., Takada G., Izumori K., Kamitori S. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 374. P. 443–453.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.09.033>
64. Kim K., Kim H.-J., Oh D.-K., Cha S.-S., Rhee S. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 361. P. 920–931.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.069>
65. Qi Z., Zhu Z., Wang J., Li S., Guo Q., Xu P., Lu F., Qin H.-M. // *Microb. Cell Fact.* 2017. V. 16. P. 193.
<https://doi.org/10.1186/s12934-017-0808-4>
66. Yoshida H., Yoshihara A., Gullapalli P.K., Ohtani K., Akimitsu K., Izumori K., Kamitori S. // *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* 2018. V. 74. P. 669–676.
<https://doi.org/10.1107/s2053230x18011706>
67. Carrell H.L., Glusker J.P., Burger V., Manfre E., Tritsch D., Biellmann J.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 4440–4444.
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.12.4440>
68. Carrell H.L., Hoier H., Glusker J.P. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 1994. V. 50. P. 113–123.
<https://doi.org/10.1107/s0907444993009345>
69. Collyer C.A., Henrick K., Blow D.M. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 212. P. 211–235.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90316-e](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90316-e)

70. Whitlow M., Howard A.J., Finzel B.C., Poulos T.L., Winborne E., Gilliland G.L. // *Proteins*. 1991. V. 9. P. 153–173.
<https://doi.org/10.1002/prot.340090302>
71. Fenn T.D., Ringe D., Petsko G.A. // *Biochemistry*. 2004. V. 43. P. 6464–6474.
<https://doi.org/10.1021/bi049812o>
72. Kovalevsky A.Y., Hanson L., Fisher S.Z., Mustyakimov M., Mason S.A., Forsyth V.T., Blakeley M.P., Keen D.A., Wagner T., Carrell H.L., Katz A.K., Glusker J.P., Langan P. // *Structure*. 2010. V. 18. P. 688–699.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2010.03.011>
73. Yoshida H., Yamaji M., Ishii T., Izumori K., Kamitori S. // *FEBS J.* 2010. V. 277. P. 1045–1057.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07548.x>
74. Yoshida H., Yoshihara A., Teraoka M., Terami Y., Takata G., Izumori K., Kamitori S. // *FEBS J.* 2014. V. 281. P. 3150–3164.
<https://doi.org/10.1111/febs.12850>
75. Yoshida H., Yoshihara A., Teraoka M., Yamashita S., Izumori K., Kamitori S. // *FEBS Open Bio*. 2012. V. 3. P. 35–40.
<https://doi.org/10.1016/j.fob.2012.11.008>
76. Munshi P., Snell E.H., van der Woerd M.J., Judge R.A., Myles D.A.A., Ren Z., Meilleur F. // *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* 2014. V. 70. P. 414–420.
<https://doi.org/10.1107/s1399004713029684>
77. Langan P., Sangha A.K., Wymore T., Parks J.M., Yang Z.K., Hanson B.L., Fisher Z., Mason S.A., Blakeley M.P., Forsyth V.T., Glusker J.P., Carrell H.L., Smith J.C., Keen D.A., Graham D.E., Kovalevsky A. // *Structure*. 2014. V. 22. P. 1287–1300.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2014.07.002>
78. Terami Y., Yoshida H., Uechi K., Morimoto K., Takata G., Kamitori S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. P. 6303–6313.
<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6417-4>
79. Yoshida H., Yamada M., Nishitani T., Takada G., Izumori K., Kamitori S. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2007. V. 63. P. 123–125.
<https://doi.org/10.1107/s1744309107001169>
80. Yoshida H., Yoshihara A., Ishii T., Izumori K., Kamitori S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. P. 10403–10415.
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7673-7>
81. Okada G., Hehre E.J. // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 126–135.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43100-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43100-1)
82. Bosshart A., Panke S., Bechtold M. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2013. V. 52. P. 9673–9676.
<https://doi.org/10.1002/anie.201304141>
83. Bosshart A., Hee C.S., Bechtold M., Schirmer T., Panke S. // *Chembiochem.* 2015. V. 16. P. 592–601.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201402620>
84. Zhang W., Zhang Y., Huang J., Chen Z., Zhang T., Guang C., Mu W. // *J. Agric. Food Chem.* 2018. V. 66. P. 5593–5601.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01200>
85. Zhang W., Jia M., Yu S., Zhang T., Zhou L., Jiang B., Mu W. // *J. Agric. Food Chem.* 2016. V. 64. P. 3386–3393.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01058>
86. Choi J.-G., Ju Y.-H., Yeom S.-J., Oh D.-K. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 7316–7320.
<https://doi.org/10.1128/aem.05566-11>

Structural and Functional Features of Ketoso-3-Epimerases and Their Use in Production of D-Allulose

N. S. Ivanova*, A. A. Kulminskaya*, **, and S. V. Shvetsova*, **, ***, #

#E-mail: shvetsova_sv@pnpi.nrcki.ru

*Kurchatov Genomic Center – PNPI, mkr. Orlova Roshcha 1, Gatchina, 188300 Russia

**Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC “Kurchatov Institute”, mkr. Orlova Roshcha 1, Gatchina, 188300 Russia

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

Rare sugars attract more and more attention as safe, low-calorie sweeteners and functional compounds in the food, pharmaceutical and medical industries. The potential of the rare sugar D-allulose has been proven in a large number of theoretical and applied works but the high cost of its production is a limitation factor for its large-scale production. Epimerization reactions of available sugars leading to the production of D-allulose are catalyzed by enzymes consisting the epimerase group, namely, ketose-3-epimerases. The key goals of ongoing studies on the ketose-3-epimerase family enzymes are focused on the exact mechanisms of their work, improvement of the enzymatic activity and stability in order to achieve high efficiency in the production of D-allulose. The present review summarizes the latest innovative developments in use of ketose-3-epimerases, as well as optimization of the enzymatic processes of D-allulose production. The structural features of the main enzymes used in the production of this rare sugar, variants of molecular modifications of biocatalysts and prospects for the practical use of the enzyme pathways discussed in this work are considered.

Keywords: rare sugars, D-allulose, D-fructose, D-ketose-3-epimerase, D-tagatose-3-epimerase, active site, structural features of enzymes



РОЛЬ RIG-I-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В АКТИВАЦИИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ¹

© 2023 г. Ю. В. Скворцова*, #, О. С. Быченко*, Т. Л. Ажикина*

*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 19.12.2022 г.

После доработки 24.12.2022 г.

Принята к публикации 25.12.2022 г.

Несмотря на усилия по разработке стратегий борьбы с туберкулезом, это заболевание по-прежнему уносит более миллиона жизней ежегодно. Развитие туберкулезной инфекции можно рассматривать как нарушение баланса между иммунным ответом организма-хозяина и ростом бактерий *Mycobacterium tuberculosis*. Чтобы успешно закрепиться в инфицированном организме, *M. tuberculosis* должна преодолеть механизмы врожденного иммунитета, в том числе те, которые нацелены на распознавание чужеродных нуклеиновых кислот. RIG-I-подобные рецепторы (RLR) – система внутриклеточных рецепторов – сенсоров чужеродной РНК, которая участвует в распознавании вирусов и бактериальных патогенов. Рецепторы RIG-I, MDA5 и LGP2 взаимодействуют напрямую с РНК в клеточной цитоплазме и запускают каскад взаимодействий, приводящий к синтезу интерферонов I типа и провоспалительных цитокинов. На сегодняшний день доказано, что активация RLR при туберкулезной инфекции – важнейшая составляющая врожденного иммунитета. Продемонстрирована их несомненная роль в активации интерферонов I типа, которая, однако, может носить не только защитный, но и негативный для иммунной системы характер. В обзоре рассматриваются последние данные о функционировании RLR при туберкулезе на примере модельных организмов и человека.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, туберкулез, врожденный иммунитет, RIG-I-подобные рецепторы (RLR), *IFN I* типа

DOI: 10.31857/S0132342323040413, EDN: OECZCE

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	360
СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА RLR И СПОСОБ ИХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ	361
RLR – СЕНСОРЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК ...	362
СЕМЕЙСТВО ИНТЕРФЕРОНОВ I ТИПА И БАКТЕРИАЛЬНАЯ ИНФЕКЦИЯ	362
РОЛЬ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК В ИММУННОМ ОТВЕТЕ ХОЗЯИНА	365
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	365
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	366

ВВЕДЕНИЕ

Активация врожденного иммунитета в ответ на бактериальную инфекцию начинается с процесса распознавания специальных микробных структур, называемых патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), среди которых секретирующиеся факторы вирулентности, компоненты клеточной стенки, а также бактериальные нуклеиновые кислоты, в последнее время рассматриваемые как важнейшие PAMP [1].

За распознавание патогенной РНК ответственно несколько клеточных систем. Многообразие паттерн-распознающих рецепторов (pattern recognition receptors, PRRs) обеспечивает надежность идентификации патогена и специфичность иммунного ответа. Среди них рецепторы с одним трансмембранным доменом семейства Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLR) и система цитоплазматических сенсорных факторов, состоящая из белков RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1), MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) и LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2) – семейства RIG-подобных рецепторов

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Вадима Тихоновича Иванова.

Сокращения: дцРНК – двухцепочечная РНК; BMDM – костномозговые макрофаги; CARD – домен активации и рекрутирования каспазы; CTD – C-концевой домен; IFN – интерферон; MDA5 – белок, ассоциированный с дифференцировкой меланомы; МТб – *Mycobacterium tuberculosis*; RIG-I – ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой; RLR – RIG-I-подобные рецепторы; IFNAR – рецептор IFN-α.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-69-92; эл. почта: ju.skvortsova@gmail.com).

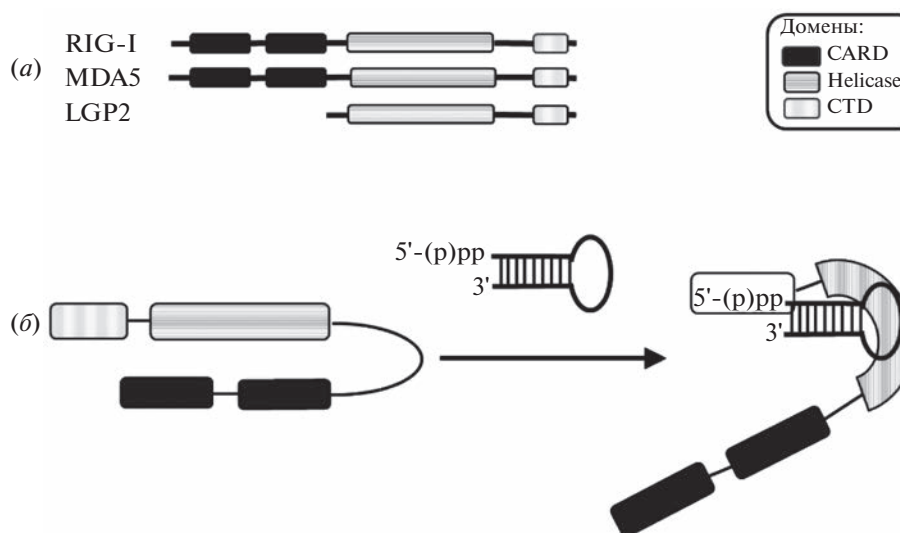


Рис. 1. (а) – Доменная организация RLR. Белки RIG-I, MDA5 и LGP2 содержат центральный хеликазный домен и С-концевой домен CTD. N-Концевые тандемные домены CARD, которые имеют решающее значение для нисходящей передачи сигналов, присутствуют только в RIG-I и MDA5; (б) – активация RIG-I. Связывание чужеродной РНК приводит к изменению конформации белка и высвобождению доменов CARD.

(RLR). Оба типа детектирующих систем способны индуцировать продукцию интерферонов (IFN) I типа и провоспалительных цитокинов [2–5]. Также в последние годы появились данные о других системах клеточных сенсоров РНК – семействе NLRs (NOD-like receptor, nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors) [6, 7] и рецепторах внеклеточных РНК SRas (скэвенджер-рецепторы класса А) [8].

TLR экспрессируются в основном в антиген-презентирующих клетках – в макрофагах и плазматическом дендритных клетках. Эти рецепторы обращены внутрь эндосом, поэтому могут активироваться при деградации патогена в результате эндоцитоза либо фагоцитоза.

RLR представлены практически во всех типах клеток и, в отличие от TLR, узнают РНК не в эндосомах, а непосредственно в цитоплазме. Активированные RLR регулируют активность одного из ключевых белков системы противовирусного ответа MAVS через ряд адаптерных белков (TMEM173, TBK1, TRAF3), что приводит к активации факторов IRF3, IRF7 и стимуляции продукции IFN I типа. Также активированные рецепторы RLR запускают сигнальный путь, приводящий к высвобождению цитохрома с из митохондрий и Вах-зависимому апоптозу инфицированной клетки [9]. Изначально белки этих семейств были открыты как участники врожденного иммунитета против вирусной РНК. Позже стало появляться много данных о том, что RLR-сигнальные пути запускаются и при бактериальных инфекциях.

СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА RLR И СПОСОБ ИХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ

RIG-I и MDA5 имеют схожее расположение доменов и демонстрируют высокую степень гомологии (рис. 1а). Оба рецептора содержат основной РНК-хеликазный домен, обладающий АТПазной активностью, два N-концевых тандемных домена активации и рекрутирования каспазы (CARD) и регуляторный С-концевой домен (CTD). Основной домен содержит два хеликазных домена Hel1, Hel2 и домен вставки в Hel2 (Hel2i). CTD играет решающую роль в распознавании нуклеиновых кислот патогена, в то время как основной домен хеликазы усиливает специфичность лиганда посредством конформационных изменений. Домены CARD принадлежат подклассу белковых мотивов, известных как DExD/H-домены, и взаимодействуют с адаптерными белками для инициирования нижестоящих сигнальных путей, включающих активацию транскрипции IFN-регуляторных факторов 3 и 7 (IRF3, IRF7) и ядерного фактора κB (NF-κB). RIG-I при отсутствии РНК-лиганда находится в неактивной, закрытой конформации, которая обеспечивается взаимодействием доменов CARD с Hel2i, что блокирует дальнейшую передачу сигналов в отсутствие стимула. При обнаружении лиганда хеликазный домен “оборачивается” вокруг РНК, тем самым “раскрывает” закрытые домены CARD для их связывания с адаптерным белком MAVS, что инициирует последующую передачу сигналов [2] (рис. 1б).

В отличие от RIG-I и MDA5, LGP2 содержит основной РНК-хеликазный домен и CTD, но не

имеет CARD. Хеликазный домен LGP2 также распознает чужеродные молекулы РНК и способен к гидролизу АТФ, но не может инициировать дальнейшую передачу сигналов. CTD обеспечивает специфичность механизма распознавания и связывания РНК. LGP2 служит регулятором сигнального механизма RLRs [10].

RIG-I и MDA5 активируются различными группами патогенов и связываются с разными по свойствам РНК [11, 12]. Кроме того, длина и тип нуклеиновых кислот, а также 5'-фосфорилирование имеют решающее значение для RLR-опосредованной врожденной иммунной сигнализации [13–16].

RIG-I распознает и связывается с одноцепочечной РНК (оцРНК), двуцепочечной (дцРНК) и короткой дцРНК. Специфический сигнал (эпитоп) для RIG-I – трифосфат на “тупом” 5'-конце РНК. Также RIG-I предпочтительнее связывается с короткими РНК длиной ~20 нт [17, 18]. RIG-I связывается с отрицательно заряженным 5'-ppp-фрагментом через щель, присутствующую в CTD-домене, в то время как соседние нуклеотидные фрагменты дцРНК с тупым концом помогают стабилизировать это связывание. Кроме того, RIG-I может обнаруживать РНК, содержащую дифосфатную группу [13, 19]. Связывание 5'-р дцРНК, однако, затруднено из-за образующейся петли в Hel2-домене [20]. Удивительно, но монофосфатные дцРНК обладают более сильным ингибиторным действием на RIG-I, чем лишенные каких-либо фосфатов 5'-ОН дцРНК [20]. Показано, что для распознавания RIG-I и его оптимальной активации в РНК требуются поли-U/UC-специфические мотивы. После связывания РНК RIG-I группируется в димеры, затем в тетрамеры [21, 22].

MDA5 активируется более длинной дцРНК, часто мРНК, у которой отсутствует 2'-O-метилирование и кэп-структура на 5'-конце [23, 24]. MDA5 распознает дцРНК различных размеров (0.5–7.0 т.п.н.) и связывается с ними в неконцевых участках РНК [25–27]. MDA5 активируется короткой дцРНК (длиной ~100 нт) лишь в тех случаях, если она присутствует в больших количествах. Процесс активации MDA5 более длинной молекулой РНК (1–2 т.п.н.) опосредован образованием нитевидных олигомеров в результате совместной сборки хеликазных доменов на молекуле дцРНК [25, 28]. MDA5 узнает фрагменты РНК с монофосфатами на концах, образованные в результате гидролиза РНКзой L [16, 29], что впервые было продемонстрировано в модели инфекции вирусом PIV5 (parainfluenza virus 5) [30].

В процессе распознавания РНК RLR проходят через АТФ-зависимые конформационные изменения, которые инициируют запуск MAVS-опосредованных сигнальных каскадов [31]. MAVS об-

разует огромные олигомеры путем агрегации, что служит стимулом для активации IRF3 и дальнейшей передачи сигналов в инфицированных клетках [32]. Весь этот процесс приводит к образованию сигнасомы IPS-1, которая запускает активацию киназ TBK1 (TANK-binding kinase 1) и IKKε (IκB kinase ε) [33]. Фосфорилированные формы IRF3 и IRF7 образуют гомо- и гетеродимеры, которые транслоцируются в ядро и впоследствии активируют транскрипцию генов IFN I типа [34] (рис. 2).

RLR – СЕНСОРЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК

Активация RLR бактериальной РНК была впервые показана для макрофагов мыши, дифференцированных из клеток костного мозга (BMDM – bone marrow derived macrophage) при инфекции *Legionella pneumophila* [35] и *Listeria monocytogenes* [36], а также при заражении дендритных клеток мыши бактериями *Helicobacter pylori* [37]. Активация продукции IFN I типа при инфекции *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) впервые была показана Manzanillo et al. [38], но в этой работе был описан ДНК-индуцированный сигнал. Индукция IFN I типа при туберкулезной инфекции, вызванная патогенной РНК, была показана при инфекции MTb BMDM мыши и клеточной линии макрофагов J774 в работе Andreu et al. [39]. Была доказана активация транскрипции генов рецепторов RIG-I (*Ddx58*), LGP2 (*Dhx58*) и MDA5 (*Ifih1*), а также опосредованных ими транскрипционных факторов NF-κB, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, эффекторов IFN-β и IL-1β. В работе Ranjbar et al. [40] продемонстрировано, что при инфекции MTb макрофагов человека, дифференцированных из мононуклеаров периферической крови (клеточная линия THP-1), бактериальная РНК активирует в цитоплазме RLR/MAVS-сигнал, приводящий к экспрессии IFN I типа.

СЕМЕЙСТВО ИНТЕРФЕРОНОВ I ТИПА И БАКТЕРИАЛЬНАЯ ИНФЕКЦИЯ

Семейство интерферонов I типа (IFN I типа) – это мультигенное семейство цитокинов, активирующихся в ответ на вирусную и бактериальную инфекцию [41]. Оно включает в себя 14 подтипов IFN-α с 75–100%-ной идентичностью аминокислотной последовательности, IFN-β, имеющий 30%-ную идентичность с консенсусной последовательностью IFN-α, а также менее изученные IFN-ε, IFN-ω и некоторые другие [42]. Если в случае вирусной инфекции эта активация имеет протективный эффект [43], то при бактериальной инфекции эффект может быть не только защитным, но и негативным для иммунной системы.

Например, мыши линии IFNAR1^{-/-} живут дольше и имеют меньшую бактериальную нагруз-

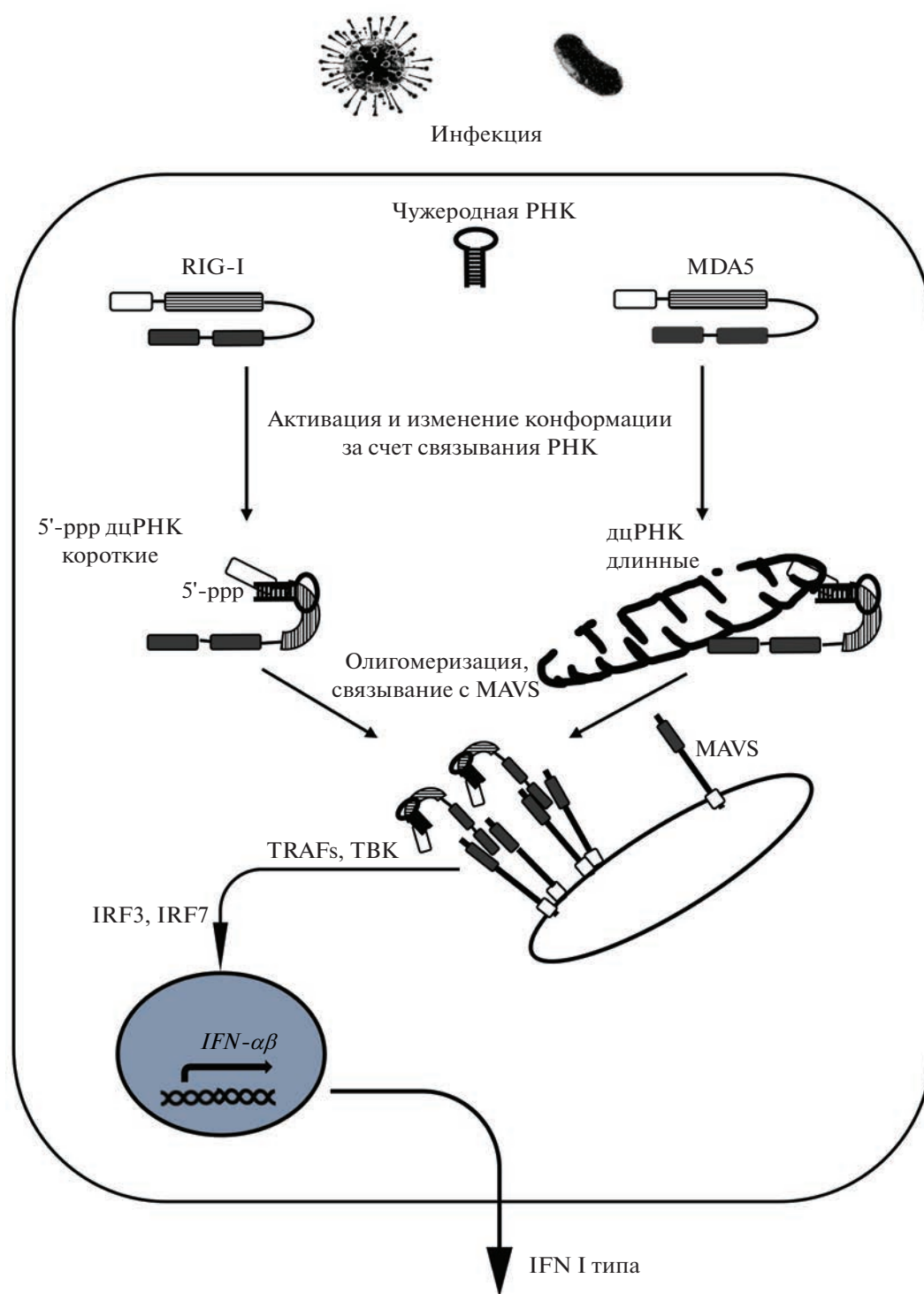


Рис. 2. Сигнальный путь RLR. В результате инфекции в цитоплазме клетки присутствуют чужеродные РНК, которые узнаются белками-сенсорами RIG-I и MDA5. Связывание РНК приводит к изменению конформации и высвобождению доменов CARD, которые взаимодействуют с CARD-доменами митохондриального белка MAVS. Олигомеризация CARD способствует передаче сигнала в ядро, что приводит к транскрипции генов IFN I типа.

ку по сравнению с мышами дикого типа при заражении патогенной *Chlamydia muridarum* [44], аналогичный эффект наблюдался при инфекции

Listeria monocytogenes [45]. IFN I типа не ограничивали репликацию в макрофагах *Legionella pneumophila* [46]. При инфекции мышей *Salmonella typhi-*

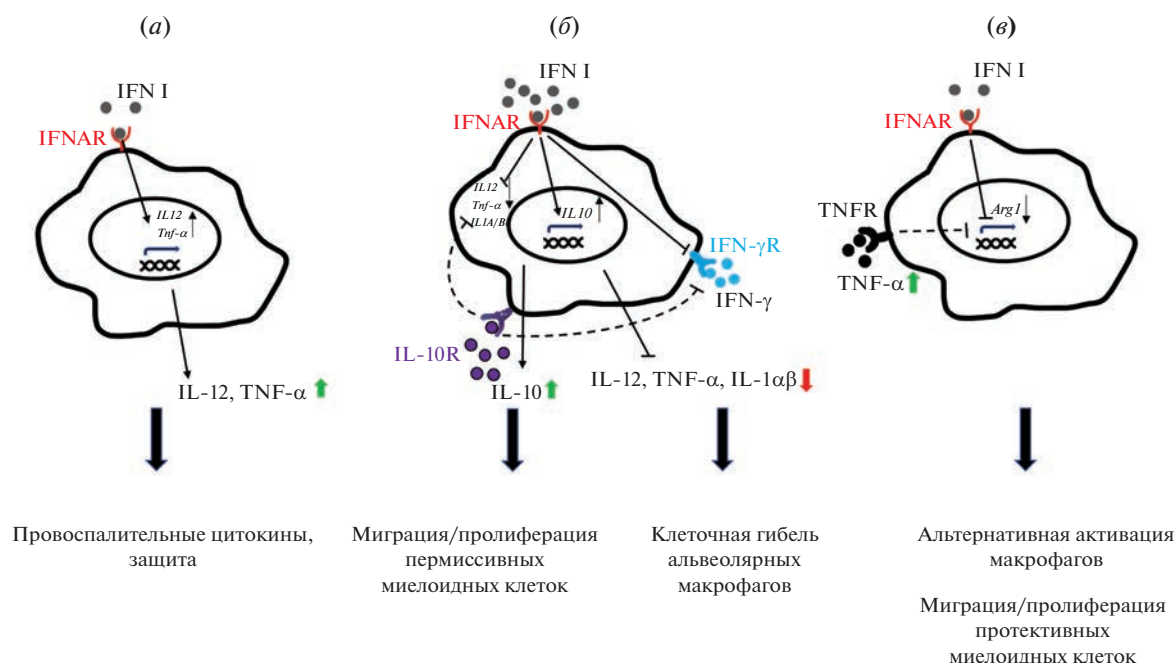


Рис. 3. Влияние экспрессии IFN I типа на инфицированный организм при туберкулезе. (a) — Низкий уровень экспрессии IFN I типа стимулирует выработку защитных цитокинов IL-12 и TNF- α ; (б) — устойчиво высокий уровень экспрессии IFN I типа способствует выработке IL-10 и подавляет выработку защитных цитокинов IL-12, TNF- α , IL-1 α и IL-1 β . Также IL-10 опосредует петлю обратной связи, способствуя снижению продукции IL-12 и TNF- α , что приводит к подавлению защитных иммунных процессов; (в) — при отсутствии рецептора IFN- γ , IFN I типа ингибирует экспрессию Arg1, повышая уровень TNF- α и тем самым регулируя M2-активацию макрофагов. Передача сигналов IFN I типа может также способствовать привлечению, дифференцировке и/или выживанию защитных миелоидных клеток, которые контролируют патологию в месте заражения. Arg1 — аргиназа 1, IFN γ R — рецептор IFN- γ , IL-10R — рецептор IL-10, TNFR — рецептор TNF- α . Адаптировано по [49].

murium индуцировалась экспрессия IFN I типа, что запускало процесс некроптоза в макрофагах и позволяло патогенам уклоняться от иммунного ответа [47].

Роль IFN I типа при туберкулезе также неоднозначна. IFN I типа, особенно IFN- β , участвуют в развитии туберкулезной инфекции, что подтверждено во многих работах [48–54].

При этом многочисленны экспериментальные свидетельства пагубного воздействия IFN I типа на ход болезни. При инфекции мышей IFN I типа действуют губительно на макроорганизм, тяжесть этого воздействия зависит от генотипа хозяина [55, 56]. Повышенный уровень IFN I типа вызывается более вирулентными штаммами MTb [57] и связан с большей чувствительностью к инфекции [58]. Анализ транскриптомов клеток крови пациентов с активной фазой туберкулеза показал корреляцию между активацией IFN I типа и тяжестью болезни, а также пониженной чувствительностью к терапии [59, 60]. В другом исследовании показано, что активация интерферонового ответа по I типу предшествует переходу инфекции из латентной в активную стадию и регистрируется уже за 18 месяцев до постановки диагноза [61]. Схожие данные обобщены в обзоре Moreira-Teixeira et al. [49].

Тем не менее описаны факты успешного использования IFN- α в терапии пациентов с активным туберкулезом [62]. Показана роль IFN I типа, особенно IFN- β , в элиминации туберкулезной инфекции на мышинных моделях [48]. Zhang et al. показали, что блокирование активации синтеза IFN I типа было эффективным в лечении туберкулеза (на мышинных моделях) на любых стадиях болезни [63]. Показана роль RIG-I, MDA5, MAVS и РНК-зависимой киназы PKR в снижении бактериальной нагрузки при туберкулезе [64]. Некоторые белки, активируемые действием IFN I типа, такие как GBP1, STAT1 и TAP1, могут играть протективную роль при туберкулезе [60].

В настоящий момент высказано следующее представление о роли IFN I типа при туберкулезе [49] (рис. 3): на начальной стадии инфекции или при невысоких уровнях экспрессии IFN I типа активируют синтез IL-12 и TNF- α , что носит протективный характер. Однако устойчиво высокий уровень экспрессии IFN I типа способствует активации синтеза IL-10 и подавляет выработку защитных цитокинов IL-12, TNF- α , IL-1 α и IL-1 β . IL-10 опосредует подавляющую петлю обратной связи, способствуя снижению выработки IL-12 и TNF- α . IFN I типа также подавляет чувствитель-

ность миелоидных клеток к IFN- γ за счет как IL-10-зависимых, так и независимых механизмов, подавляя IFN- γ -зависимые иммунные ответы, защищающие хозяина. Кроме того, IFN I типа могут способствовать гибели клеток в альвеолярных макрофагах и накоплению пермиссивных миелоидных клеток в месте инфекции [55].

Таким образом, в зависимости от стадии заболевания, активация RLR бактериальной РНК приводит к модуляции иммунного ответа хозяина, причем может оказывать негативное воздействие на него. Исходя из этого, данные о функционировании RLR при туберкулезной инфекции могут иметь практическое применение, поскольку открывают новые возможные мишени для действия лекарственных препаратов.

РОЛЬ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК В ИММУННОМ ОТВЕТЕ ХОЗЯИНА

Таким образом, в последние годы стало очевидно, что микобактериальные РНК в цитозоле инфицированных макрофагов активно влияют на иммунный ответ. В 2012 г. впервые было показано, что микобактерии секретируют в цитоплазму макрофагов помимо белков также и нуклеиновые кислоты, а именно низкомолекулярную фрагментированную РНК. Эта РНК воздействует на каспаза-8-зависимый, каспаза-1- и TNF- α -независимые пути апоптоза, тем самым ослабляя антибактериальную защиту. Это первая работа, в которой была показана принципиальная возможность секреции микобактериальной РНК и ее влияния на инфекционный процесс [65]. Вопрос о том, как в цитозоле инфицированных макрофагов появляется микобактериальная РНК, до последнего времени оставался открытым. Sing et al. [66] предположили, что РНК Mtb высвобождается во время активной макрофагальной инфекции, поскольку некоторые транскрипты были обнаружены в экзосомах, высвобождаемых из инфицированных макрофагов мыши.

Cheng и Schorey показали, что РНК появляется в цитозоле только при наличии функциональных систем секреции SecA2 и Esx-1, при этом SecA2 отвечает за выход РНК из бактерии, а ESX-1 — за выход в цитозоль [67]. Известно, что система секреции SecA2 вовлечена в процесс остановки созревания фагосом посредством секреции белков [68]. Каким образом SecA2 осуществляет транспорт РНК через бактериальную клеточную стенку и какова специфичность этого процесса — на настоящий момент неизвестно. Авторы предполагают существование РНК-связывающих белков с шапероноподобными функциями, которые помогают транспортировать бактериальную РНК через аппарат секреции SecA2 [69], и указывают, что секреции ДНК через SecA2 не наблюдалось [67].

В последнее время активно обсуждается роль внеклеточных везикул в передаче иммуностимулирующего сигнала от инфицированных клеток к неинфицированным и иммунным клеткам. Появляются данные, что такие везикулы содержат помимо белковых также нуклеиновые факторы. Cheng et al. показали, что инфицированные Mtb макрофаги высвобождают везикулы, которые содержат патогенную РНК. Представленность этой туберкулезной РНК в везикулах зависит от активности бактериальной системы секреции SecA2. Такие везикулы индуцируют экспрессию IFN I типа в неинфицированных макрофагах путем запуска каскада RIG-I/MAVS/TBK1/IRF3 [70].

Ранее было известно, что инфекция *Listeria monocytogenes* вызывает интерфероновый ответ I типа [71], при этом RIG-I активируется нуклеиновыми кислотами [36]. Позже выяснилось, что при инфекции *L. monocytogenes* РНК патогена секретируется в везикулах, и в основном там представлены некодирующие РНК [72]. Одна из них, rli32, инициирует продукцию IFN- β и усиливает внутриклеточный рост бактерий [73].

Какие именно РНК выступают лигандами RIG-1 при туберкулезе — неизвестно. Cheng и Schorey показали, что РНК генов *ppe11* и *pol2A* связываются с RIG-1, но не с MDA5-рецептором. Больше информации о РНК-интерактоме рецептора RIG-1 нет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Туберкулез по-прежнему остается одной из основных причин смертности вследствие бактериальной инфекции [74]. Эпидемия усугубляется отсутствием эффективной вакцинации и распространением новых штаммов *M. tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью. Альтернативными традиционным антибактериальным способам лечения становятся терапевтические подходы, направленные на коррекцию иммунного ответа организма-хозяина на инфекцию (host directed therapy). Роль RLR как компонентов системы врожденного иммунитета при туберкулезе активно изучается в последние годы [75]. Хотя еще многие аспекты воздействия на РНК-связывающие рецепторы недостаточно ясны, уже предложены первые кандидаты: так, показано, что для лечения туберкулеза может быть использован препарат нитазоксанид (nitazoxanide), усиливающий сигналы, активирующиеся рецепторами RLR [40].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00235, <https://rscf.ru/project/22-14-00235/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной статьи, с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yamashiro L.H., Oliveira S.C., Báfica A. // *Microbes Infect.* 2014. V. 16. P. 991–997. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.09.006>
2. Batool M., Kim M.S., Choi S. // *Med. Res. Rev.* 2022. V. 42. P. 399–425. <https://doi.org/10.1002/med.21845>
3. Chattopadhyay S., Sen G.C. // *J. Interferon Cytokine Res.* 2014. V. 34. P. 427–436. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0034>
4. Liu H.M. // *IUBMB Life.* 2021. V. 74. P. 180–189. <https://doi.org/10.1002/iub.2551>
5. Meylan E., Tschopp J., Karin M. // *Nature.* 2006. V. 442. P. 39–44. <https://doi.org/10.1038/nature04946>
6. Martínez I., Oliveros J.C., Cuesta I., de la Barrera J., Ausina V., Casals C., de Lorenzo A., García E., García-Fojeda B., Garmendia J. // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 276. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00276>
7. Platnich J.M., Muruve D.A. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2019. V. 670. P. 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.02.008>
8. Semple S.L., Vo N.T., Poynter S.J., Li M., Heath D.D., DeWitte-Orr S.J., Dixon B. // *Dev. Comp. Immunol.* 2018. V. 89. P. 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.08.010>
9. Mehrbod P., Ande S.R., Alizadeh J., Rahimizadeh S., Shariati A., Malek H., Hashemi M., Glover K.K., Sher A.A., Coombs K.M. // *Virulence.* 2019. V. 10. P. 376–413. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1605803>
10. Bruns A.M., Pollpeter D., Hadizadeh N., Myong S., Marko J.F., Horvath C.M. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 938–946. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.424416>
11. Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii K.J., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh C.S., Reis e Sousa C., Matsuura Y., Fujita T., Akira S. // *Nature.* 2006. V. 441. P. 101–105. <https://doi.org/nature04734>
12. Loo Y.M., Fornek J., Crochet N., Bajwa G., Perwitasari O., Martinez-Sobrido L., Akira S., Gill M.A., Garcia-Sastre A., Katze M.G., Gale M., Jr. // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 335–345. <https://doi.org/JVI.01080-07>
13. Goubau D., Schlee M., Deddouche S., Puijssers A.J., Zillinger T., Goldeck M., Schuberth C., Van der Veen A.G., Fujimura T., Rehwinkel J., Iskarpatyoti J.A., Barchet W., Ludwig J., Dermody T.S., Hartmann G., Reis e Sousa C. // *Nature.* 2014. V. 514. P. 372–375. <https://doi.org/10.1038/nature13590>
14. Kowalinski E., Lunardi T., McCarthy A.A., Loubser J., Brunel J., Grigorov B., Gerlier D., Cusack S. // *Cell.* 2011. V. 147. P. 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.039>
15. Chiu Y.H., Macmillan J.B., Chen Z.J. // *Cell.* 2009. V. 138. P. 576–591. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.015>
16. Malathi K., Dong B., Gale M., Jr., Silverman R.H. // *Nature.* 2007. V. 448. P. 816–819. <https://doi.org/nature06042>
17. Schlee M. // *Immunobiology.* 2013. V. 218. P. 1322–1335. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.007>
18. Zust R., Cervantes-Barragan L., Habjan M., Maier R., Neuman B.W., Ziebuhr J., Szretter K.J., Baker S.C., Barchet W., Diamond M.S., Siddell S.G., Ludwig B., Thiel V. // *Nat. Immunol.* 2011. V. 12. P. 137–143. <https://doi.org/10.1038/ni.1979>
19. Linehan M.M., Dickey T.H., Molinari E.S., Fitzgerald M.E., Potapova O., Iwasaki A., Pyle A.M. // *Sci. Adv.* 2018. V. 4. P. e1701854. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1701854>
20. Ren X., Linehan M.M., Iwasaki A., Pyle A.M. // *Cell Rep.* 2019. V. 26. P. 2019–2027. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.107>
21. Peisley A., Wu B., Yao H., Walz T., Hur S. // *Mol. Cell.* 2013. V. 51. P. 573–583. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.024>
22. Peisley A., Wu B., Xu H., Chen Z.J., Hur S. // *Nature.* 2014. V. 509. P. 110–114. <https://doi.org/10.1038/nature13140>
23. Pichlmair A., Schulz O., Tan C.P., Rehwinkel J., Kato H., Takeuchi O., Akira S., Way M., Schiavo G., Reis e Sousa C. // *J. Virol.* 2009. V. 83. P. 10761–10769. <https://doi.org/10.1128/JVI.00770-09>
24. Kato H., Takeuchi O., Mikamo-Satoh E., Hirai R., Kawai T., Matsushita K., Hiiragi A., Dermody T.S., Fujita T., Akira S. // *J. Exp. Med.* 2008. V. 205. P. 1601–1610. <https://doi.org/10.1084/jem.20080091>
25. Berke I.C., Modis Y. // *EMBO J.* 2012. V. 31. P. 1714–1726. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.19>
26. Peisley A., Lin C., Orme-Johnson M., Liu M., Walz T., Hur S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 21010–21015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113651108>
27. Wu B., Peisley A., Richards C., Yao H., Zeng X., Lin C., Chu F., Walz T., Hur S. // *Cell.* 2013. V. 152. P. 276–289. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.048>
28. Huang Y.H., Liu X.Y., Du X.X., Jiang Z.F., Su X.D. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. V. 19. P. 728–730. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2333>
29. Manivannan P., Siddiqui M.A., Malathi K. // *J. Virol.* 2020. V. 94. P. e00205-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00205-20>

30. Luthra P., Sun D., Silverman R.H., He B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 2118–2123. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012409108>
31. Chiang J.J., Davis M.E., Gack M.U. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014. V. 25. P. 491–505. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.06.005>
32. Hou F., Sun L., Zheng H., Skaug B., Jiang Q.X., Chen Z.J. // *Cell*. 2011. V. 146. P. 448–461. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.041>
33. Liu Y., Olagner D., Lin R. // *Front. Immunol.* 2016. V. 7. P. 662. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00662>
34. Panne D. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008. V. 18. P. 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.12.002>
35. Monroe K.M., McWhirter S.M., Vance R.E. // *PLoS Pathog.* 2009. V. 5. P. e1000665. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000665>
36. Abdullah Z., Schlee M., Roth S., Mraheil M.A., Barchet W., Bottcher J., Hain T., Geiger S., Hayakawa Y., Fritz J.H., Civril F., Hopfner K.P., Kurts C., Ruland J., Hartmann G., Chakraborty T., Knolle P.A. // *EMBO J.* 2012. V. 31. P. 4153–4164. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.274>
37. Rad R., Ballhorn W., Volland P., Eisenacher K., Mages J., Rad L., Ferstl R., Lang R., Wagner H., Schmid R.M., Bauer S., Prinz C., Kirschning C.J., Krug A. // *Gastroenterology*. 2009. V. 136. P. 2247–2257. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.066>
38. Manzanillo P.S., Shiloh M.U., Portnoy D.A., Cox J.S. // *Cell Host Microbe*. 2012. V. 11. P. 469–480. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.03.007>
39. Andreu N., Phelan J., de Sessions P.F., Cliff J.M., Clark T.G., Hibberd M.L. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 42225. <https://doi.org/10.1038/srep42225>
40. Ranjbar S., Haridas V., Nambu A., Jasenosky L.D., Sadhukhan S., Ebert T.S., Hornung V., Cassell G.H., Falvo J.V., Goldfeld A.E. // *iScience*. 2019. V. 22. P. 299–313. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.11.001>
41. Ivashkiv L.B., Donlin L.T. // *Nat. Rev. Immunol.* 2014. V. 14. P. 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
42. Hertzog P.J., Williams B.R. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013. V. 24. P. 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.04.002>
43. Crouse J., Kalin U., Oxenius A. // *Nat. Rev. Immunol.* 2015. V. 15. P. 231–242. <https://doi.org/10.1038/nri3806>
44. Qiu H., Fan Y., Joyee A.G., Wang S., Han X., Bai H., Jiao L., Van Rooijen N., Yang X. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. P. 2092–2102. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2092>
45. Auerbuch V., Brockstedt D.G., Meyer-Morse N., O'Riordan M., Portnoy D.A. // *J. Exp. Med.* 2004. V. 200. P. 527–533. <https://doi.org/10.1084/jem.20040976>
46. Opitz B., Vinzinger M., van Laak V., Schmeck B., Heine G., Gunther S., Preissner R., Slevogt H., N'Guessan P.D., Eitel J., Goldmann T., Flieger A., Suttrop N., Hippenstiel S. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 36173–36179. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604638200>
47. Robinson N., McComb S., Mulligan R., Dudani R., Krishnan L., Sad S. // *Nat. Immunol.* 2012. V. 13. P. 954–962. <https://doi.org/10.1038/ni.2397>
48. Kaufmann S.H., Dorhoi A. // *Curr. Opin. Immunol.* 2013. V. 25. P. 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.05.005>
49. Moreira-Teixeira L., Mayer-Barber K., Sher A., O'Garra A. // *J. Exp. Med.* 2018. V. 215. P. 1273–1285. <https://doi.org/10.1084/jem.20180325>
50. Manca C., Tsenova L., Freeman S., Barczak A.K., Tovey M., Murray P.J., Barry C., Kaplan G. // *J. Interferon Cytokine Res.* 2005. V. 25. P. 694–701. <https://doi.org/10.1089/jir.2005.25.694>
51. Mayer-Barber K.D., Andrade B.B., Oland S.D., Amaral E.P., Barber D.L., Gonzales J., Derrick S.C., Shi R., Kumar N.P., Wei W., Yuan X., Zhang G., Cai Y., Babu S., Catalfamo M., Salazar A.M., Via L.E., Barry C.E., 3rd, Sher A. // *Nature*. 2014. V. 511. P. 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature13489>
52. Robinson C.M., Jung J.Y., Nau G.J. // *Cytokine*. 2012. V. 60. P. 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.06.012>
53. Stanley S.A., Johndrow J.E., Manzanillo P., Cox J.S. // *J. Immunol.* 2007. V. 178. P. 3143–3152. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.3143>
54. Teles R.M., Graeber T.G., Krutzik S.R., Montoya D., Schenk M., Lee D.J., Komisopoulou E., Kelly-Scumpia K., Chun R., Iyer S.S., Sarno E.N., Rea T.H., Hewison M., Adams J.S., Popper S.J., Relman D.A., Stenger S., Bloom B.R., Cheng G., Modlin R.L. // *Science*. 2013. V. 339. P. 1448–1453. <https://doi.org/10.1126/science.1233665>
55. Dorhoi A., Yermeev V., Nouailles G., Weiner J., 3rd, Jorg S., Heinemann E., Oberbeck-Muller D., Knaul J.K., Vogelzang A., Reece S.T., Hahnke K., Mollenkopf H.J., Brinkmann V., Kaufmann S.H. // *Eur. J. Immunol.* 2014. V. 44. P. 2380–2393. <https://doi.org/10.1002/eji.201344219>
56. Moreira-Teixeira L., Stimpson P.J., Stavropoulos E., Hadebe S., Chakravarty P., Ioannou M., Aramburu I.V., Herbert E., Priestnall S.L., Suarez-Bonnet A., Sousa J., Fonseca K.L., Wang Q., Vashakidze S., Rodriguez-Martinez P., Vilaplana C., Saraiva M., Papayannopoulos V., O'Garra A. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 5566. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19412-6>
57. Wiens K.E., Ernst J.D. // *PLoS Pathog.* 2016. V. 12. P. e1005809. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005809>
58. Manca C., Tsenova L., Bergtold A., Freeman S., Tovey M., Musser J.M., Barry C.E., 3rd, Freedman V.H., Kaplan G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 5752–5757. <https://doi.org/10.1073/pnas.091096998>
59. Berry M.P., Graham C.M., McNab F.W., Xu Z., Bloch S.A., Oni T., Wilkinson K.A., Banichereau R., Skinner J., Wilkinson R.J., Quinn C., Blankenship D., Dhawan R., Cush J.J., Mejias A., Ramilo O., Kon O.M., Pascual V., Banichereau J., Chaussabel D., O'Garra A. // *Nature*. 2010. V. 466. P. 973–977. <https://doi.org/10.1038/nature09247>

60. Zak D.E., Penn-Nicholson A., Scriba T.J., Thompson E., Suliman S., Amon L.M., Mahomed H., Erasmus M., Whatney W., Hussey G.D., Abrahams D., Kafaar F., Hawkrige T., Verver S., Hughes E.J., Ota M., Sutherland J., Howe R., Dockrell H.M., Boom W.H., Thiel B., Ottenhoff T.H.M., Mayanja-Kizza H., Crampin A.C., Downing K., Hatherill M., Valvo J., Shankar S., Parida S.K., Kaufmann S.H.E., Walzl G., Aderem A., Hanekom W.A. // *Lancet*. 2016. V. 387. P. 2312–2322. [https://doi.org/S0140-6736\(15\)01316-1](https://doi.org/S0140-6736(15)01316-1)
61. Scriba T.J., Fiore-Garland A., Penn-Nicholson A., Mulenga H., Kimbung Mbandi S., Borate B., Mendelsohn S.C., Hadley K., Hikuam C., Kaskar M., Musvosvi M., Bilek N., Self S., Sumner T., White R.G., Erasmus M., Jaxa L., Raphela R., Innes C., Brumskine W., Hiemstra A., Malherbe S.T., Hassan-Moosa R., Tameris M., Walzl G., Naidoo K., Churchyard G., Hatherill M. // *Lancet Infect. Dis.* 2021. V. 21. P. 354–365. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30914-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30914-2)
62. Zarogoulidis P., Kioumis I., Papanas N., Manika K., Kontakiotis T., Papagianis A., Zarogoulidis K. // *J. Chemother.* 2012. V. 24. P. 173–177. <https://doi.org/10.1179/1973947812Y.0000000005>
63. Zhang L., Jiang X., Pfau D., Ling Y., Nathan C.F. // *J. Exp. Med.* 2021. V. 218. P. e20200887. <https://doi.org/10.1084/jem.20200887>
64. Ranjbar S., Haridas V., Jasenosky L.D., Falvo J.V., Goldfeld A.E. // *Cell Rep.* 2015. V. 13. P. 874–883. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.048>
65. Obregon-Henao A., Duque-Correa M.A., Rojas M., Garcia L.F., Brennan P.J., Ortiz B.L., Belisle J.T. // *PLoS One*. 2012. V. 7. P. e29970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029970>
66. Singh P.P., Li L., Schorey J.S. // *Traffic*. 2015. V. 16. P. 555–571. <https://doi.org/10.1111/tra.12278>
67. Cheng Y., Schorey J.S. // *J. Exp. Med.* 2018. V. 215. P. 2919–2935. <https://doi.org/10.1084/jem.20180508>
68. Sullivan J.T., Young E.F., McCann J.R., Braunstein M. // *Infect. Immun.* 2012. V. 80. P. 996–1006. <https://doi.org/10.1128/IAI.05987-11>
69. Miller B.K., Zulauf K.E., Braunstein M. // *Microbiol. Spectr.* 2017. V. 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TB2-0013-2016>
70. Cheng Y., Schorey J.S. // *EMBO Rep.* 2019. V. 20. P. e46613. <https://doi.org/10.15252/embr.201846613>
71. O'Connell R.M., Saha S.K., Vaidya S.A., Bruhn K.W., Miranda G.A., Zarnegar B., Perry A.K., Nguyen B.O., Lane T.F., Taniguchi T., Miller J.F., Cheng G. // *J. Exp. Med.* 2004. V. 200. P. 437–445. <https://doi.org/10.1084/jem.20040712>
72. Vdovikova S., Luhr M., Szalai P., Nygard Skalmann L., Francis M.K., Lundmark R., Engedal N., Johansson J., Wai S.N. // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2017. V. 7. P. 154. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00154>
73. Frantz R., Teubner L., Schultze T., La Pietra L., Muller C., Gwozdinski K., Pillich H., Hain T., Weber-Gerlach M., Panagiotidis G.D., Mostafa A., Weber F., Rohde M., Pleschka S., Chakraborty T., Abu Mraheil M. // *mBio*. 2019. V. 10. P. e01223-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01223-19>
74. Harding E. // *Lancet Respir Med.* 2020. V. 8. P. 19. [https://doi.org/S2213-2600\(19\)30418-7](https://doi.org/S2213-2600(19)30418-7)
75. Burkert S., Schumann R.R. // *Vaccines (Basel)*. 2020. V. 8. P. 67. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010067>

The Role of RIG-I-Like Receptors in the Activation of Innate Immune in Tuberculosis

Y. V. Skvortsova*, #, O. S. Bychenko*, and T. L. Azhikina*

#Phone: +7 (495) 330-69-92; e-mail: ju.skvortsova@gmail.com

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

Tuberculosis still claims over a million lives every year. The infection process can be regarded as an imbalance between the immune response and *Mycobacterium tuberculosis* growth. To successfully survive in an infected organism, *M. tuberculosis* must overcome the mechanisms of innate immunity, including those aimed at recognition of pathogen nucleic acids. RIG-I-like receptors (RLRs) is a system of intracellular sensors of foreign RNA, which is involved in the recognition of viruses and bacterial pathogens. RIG-I, MDA5, and LGP2 receptors interact directly with RNA in the cell cytoplasm and trigger a cascade of interactions leading to the synthesis of type I interferons and pro-inflammatory cytokines. To date, it has been proven that RLR activation during tuberculosis is among the most important components of innate immunity. Their role in the activation of type I interferons is undoubted, however, can be not only protective, but also detrimental. The review considers the latest data on the RLRs functioning in *M. tuberculosis* infection.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, innate immunity, RIG-I-like receptors (RLR), type I IFNs



УДК 577.322.5

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ И ФОРМИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПОДХОДОВ К ИЗМЕНЕНИЮ СТРУКТУРЫ ГИАЛУРОНИДАЗЫ НА ОСНОВЕ ЕЕ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫМИ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ

© 2023 г. А. В. Максименко*, #, Р. Ш. Бибилашвили*

**Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова
Минздрава России, Россия, 121552 Москва, 3-я Черепковская улица, 15А*

Поступила в редакцию 13.07.2022 г.

После доработки 26.07.2022 г.

Принята к публикации 28.07.2022 г.

На основе данных теоретического изучения в обзоре обосновываются экспериментальные подходы к получению и последующему исследованию модифицированных форм гиалуронидазы. Исследовательское вычислительное рассмотрение взаимодействия 3D-модели бычьей тестикулярной гиалуронидазы (БТГ) с короткоцепочечными гликозаминогликановыми лигандами продемонстрировало разнообразие и значимость их воздействия на структуру фермента. Отмеченное воздействие осуществлялось благодаря электростатическим нековалентным взаимодействиям (без специфического связывания с активным центром), вызывая заметные конформационные изменения молекулы биокатализатора/фермента. В результате таких изменений наблюдались инактивация и стабилизация глобулы фермента, изменение его ингибирования гепарином. Присоединение к молекулярной поверхности гиалуронидазы тримеров хондроитина по центрам sp_6 , sp_3 и sp_1 повышало ее стабильность, а связывание по центрам cs_2 , cs_4 , cs_7 , cs_8 или cs_1 , cs_2 , cs_4 , cs_7 и cs_8 тримеров хондроитинсульфата способствовало снижению ингибирования фермента тетрамером гепарина. К молекуле свободной гиалуронидазы (без лигандов) присоединяются по центрам связывания гликозаминогликановые лиганды с наибольшей энергией связывания. Отмечена важность их связывания для регуляции функционирования фермента, а также наличия многообразного и многокомпонентного микроокружения биокатализатора. Выявленная в теоретическом изучении последовательность предпочтительного связывания лигандов с гиалуронидазой позволяет оценить реальность достижения ее экспериментальной селективной модификации (которая может осуществляться нековалентно и ковалентно, например, с тримерами хондроитинсульфата по центрам cs_7 , cs_1 , cs_5) для потенциального экспериментального получения стабилизированных форм фермента. Перспективными подходами представляются нековалентные воздействия на гиалуронидазу тримеров хондроитина или хондроитинсульфата, как и ковалентная модификация биокатализатора тримером хондроитинсульфата или получение генно-инженерных производных фермента. Упомянутые изменения структуры гиалуронидазы могут способствовать выполнению ее направленного экспериментального дизайна для последующего биомедицинского исследования и практического клинического испытания.

Ключевые слова: бычья тестикулярная гиалуронидаза, пространственная структура фермента, гликозаминогликановые лиганды, нековалентная и ковалентная модификация гиалуронидазы, получение новых лекарственных форм гиалуронидазы

DOI: 10.31857/S0132342323020161, EDN: ZLYRWA

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....370

Сокращения: БТГ — бычья тестикулярная гиалуронидаза; ГАГ — гликозаминогликан; ГН — гиалуронан; ГП — гепарин; ХН — хондроитин; ХС — хондроитинсульфат; β_1AR — адренергический рецептор β_1 ; 3D — пространственная (третичная) структура фермента.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 414-60-25; эл. почта: alex.v.maks@mail.ru).

ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГИАЛУРО- НИДАЗЫ С ГЛИКОЗАМИНОГЛИКА- НОВЫМИ ЛИГАНДАМИ.....371

ОГРАНИЧЕНИЯ И ЗАТРУДНЕНИЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО ТЕОРЕТИЧЕСКОГО ПОДХОДА.....372

ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЕ СИЛЫ В ДОКИНГЕ ГИАЛУРОНИДАЗЫ С КОРОТКОЦЕПочечными лигандами.....	372
ВАЖНОСТЬ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ СТРУКТУРЫ ГИАЛУРОНИДАЗЫ СЕЛЕКТИВНОЙ ЗАНЯТОСТИ ЦЕНТРОВ ПРИСОЕДИНЕНИЯ ЛИГАНДОВ НА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ФЕРМЕНТА.....	376
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ГИАЛУРОНИДАЗОЙ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВЫХ ЛИГАНДОВ, ИХ НЕКОВАЛЕНТНЫЕ И КОВАЛЕНТНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ФЕРМЕНТОМ.....	378
РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИАЛУРОНИДАЗЫ БИОМЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ	380
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	381
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	382

ВВЕДЕНИЕ

Множественные изменения углеводных составляющих исследуемых биологических систем подчеркнули их высокую структурную изменчивость, обусловленную, в частности, воздействием ферментов, способствующих многообразным превращениям и регулирующим метаболические изменения. Количество таких биокатализаторов весьма велико. Среди них следует отметить гиалуронидазу, заметно влияющую на состояние эндотелиального гликокаликса [1]. Последний рассматривается как компонент двойного защитного слоя сосудистой стенки, поддерживающего необходимый для жизнедеятельности организма уровень кровообращения [2]. Функционирование гиалуронидазы осуществляется в различном микроокружении (зачастую из гликозаминогликанов (ГАГ)), выступающем важной частью сосудистого гликокаликса [2, 3]. Исследования метаболизма углеводов подчеркнули важность этого биокатализатора и действенность использования приемов вычислительной биохимии [4–6]. С помощью последних возможно определение на молекулярной поверхности фермента точек чувствительности (при выполнении докинга гиалуронидазы с ГАГ-лигандами) для регуляции активности биокатализатора с целью разработки новых терапевтических средств [7, 8].

Впервые последовательно осуществленное нами пионерное вычислительное изучение с гиалуронидазой позволило обзорно представить его данные в настоящем сообщении и способствовало выделению и проецированию достигнутых эффектов расчетно/теоретически исследованных

взаимодействий биокатализатора с ГАГ-лигандами для обоснования будущих экспериментальных подходов к дальнейшему получению модифицированных производных этого фермента. Материалы нашей работы демонстрируют способы и приемы перехода от теоретических методов изучения к экспериментальным. Важность лечебного сохранения (т.е. в терапевтическом режиме) надлежащего функционирования сосудистой стенки [9, 10], опирающаяся на результаты клинических исследований, подтверждается эффективным использованием ГАГ для восстановления нормальной эндотелиальной функции [11], обуславливая перспективность разработки препаратов гиалуронидазы (пригодных для регуляции размеров ГАГ-покрытия) потенциального кардиологического назначения. Актуальность развития такого исследовательского направления медицины сосудов опирается на сегодняшнее присутствие в арсенале врача в основном средств заместительной терапии, таких как сулодексид [9–11], который представляет собой смесь высокоочищенных ГАГ из высокоподвижного гепарина (80%) и дерматансульфата (20%) [12]. ГАГ способствуют реконструкции эндотелиального гликокаликса, контролируют функционирование ферментов, деградирующих гликокаликс, проявляют противовоспалительное, антиапоптотическое и антивозрастное воздействие на эндотелиальные клетки.

Вычислительное контролирование конформационных изменений ферментной молекулы при взаимодействии с ГАГ-лигандами продуктивно (т.е. с внятным информативным и надежным уровнем) способствует получению и составлению базы теоретических данных регуляции активности биокатализаторов. На основе полученной базы данных обосновывается переход к экспериментальным приемам изучения, перспективы которого раскрываются в данном обзоре. Выполненное расчетное исследование способствует не только согласованию ранее экспериментально полученных данных с вычислительно достигнутыми позднее другими исследователями (что как общий подход в основном и использовалось с иными объектами), но и позволяет обосновать новые рекомендации экспериментального модифицирования свойств изучаемой гиалуронидазы и проверки достигнутых и установленных в нашем изучении теоретических закономерностей для экспериментальной разработки производных этого биокатализатора медицинского назначения следующего поколения.

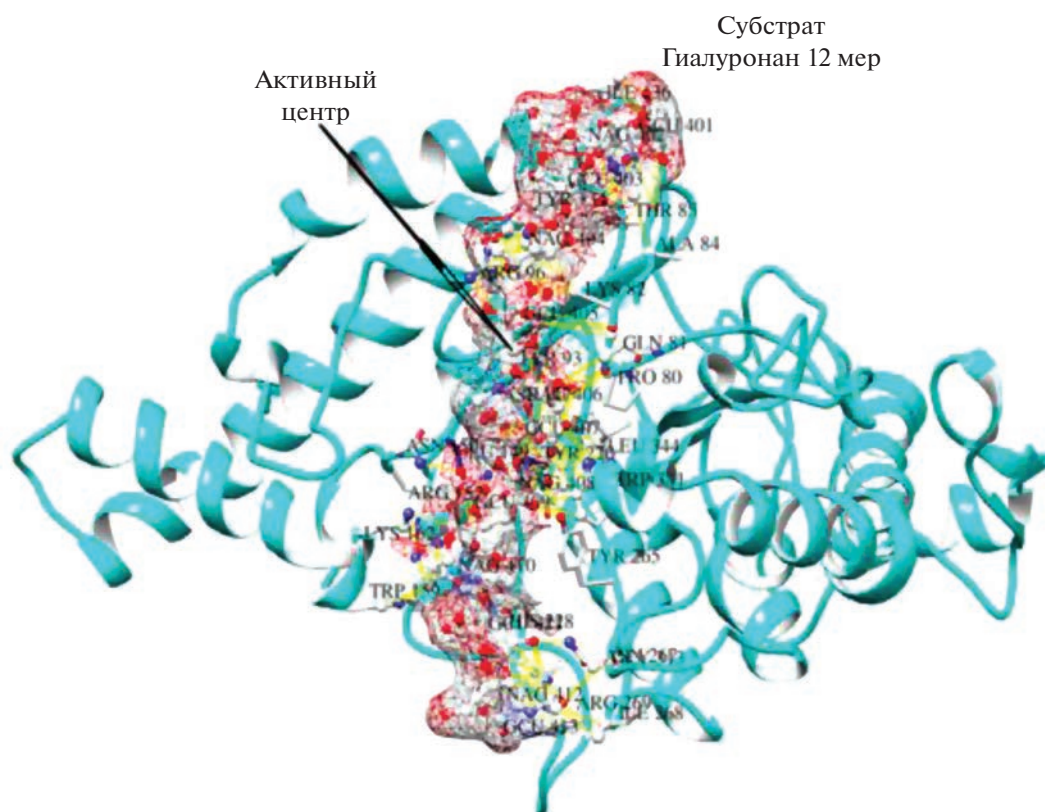


Рис. 1. 3D-модель бычьей тестикулярной гиалуронидазы (БТГ) с додекасахаридом гиалуронана (обозначен как гиалуронан 12-мер), расположенным в субстрат-связывающей “долине”. Поверхность субстрата показана сетчатой формой. Активный центр фермента и место расщепления субстрата расположены между сахаридными остатками C1 NAG408 и C4 GCU409. В формировании активного центра БТГ непосредственно участвуют остатки Tyr93, Asp147, Glu149, Arg152, Lys162, Tyr220, Tyr265, Trp341 и две молекулы воды. Остатки Pro20, Glu81, Lys82, Ala84, Thr85, Arg96, Tyr134, Ile136 и Leu334 удерживают C4-концевой продукт (401–407 а.о.), а Asn150, Arg152, Trp159, His228, Asn267, Ile268, Arg269 и Gly313 удерживают уходящий финальный C1-продукт (409–412 а.о.) [13].

ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГИАЛУРОНИДАЗЫ С ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ

Теоретическое изучение взаимодействия фермента гиалуронидазы с ГАГ-лигандами продемонстрировало заметное различие проявляющихся при этом эффектов. Для таких исследований нами методом молекулярного гомологичного моделирования была построена 3D-модель бычьей тестикулярной гиалуронидазы (БТГ, рис. 1) по прототипу установленной пространственной структуры гиалуронидазы человека [13]. Для расчетного исследования были отобраны короткоцепочечные (в целях соответствия разрешающей способности программного обеспечения используемого компьютерного оборудования) ГАГ-лиганды: тримеры хондроитина (ХН), хондроитинсульфата (ХС), гиалуронана (ГН) и тетрамеры гепарина (ГП) [1, 14]. С этими ГАГ-лигандами поэтапно был выполнен докинг и изучена моле-

кулярная динамика с 3D-моделью БТГ, данные которых представлены в настоящем обзоре.

Расчеты продемонстрировали, что воздействие тримеров ХН способствует стабилизации ферментативной активности биокатализатора. Температура термоинактивации БТГ в их присутствии возрастала на 10–15°C в сравнении с результатами вычислительного изучения инактивации нативного фермента без лигандов ХН [14]. Теоретически инактивация свободной от ГАГ-лигандов гиалуронидазы была обусловлена существенной разностью потенциалов между правой и левой сторонами субстратной “долины” активного центра фермента (рис. 2а). Под влиянием ионов Na^+ и Cl^- при низкой температуре разность потенциалов заметно снижалась, молекула фермента сохраняла свою структуру даже в отсутствие субстрата. С ростом подвижности ионов при повышении температуры происходило искажение структуры биокатализатора, приводящее к инактивации гиалуронидазы. Докинг лигандов ХН по связывающим центрам гиалуронидазы

(рис. 2б), обозначенным как $sn6$, $sn3$, $sn1$, укрепляя ее структуру, предупреждал конформационные изменения фермента без лигандов ХН, приводящие к сужению входа в активный центр биокатализатора и его денатурации, способствовал повышению термостабильности белка (ср. рис. 3а и рис. 3б) [14].

Полученные данные указывают на перспективность последовательного расчетного изучения взаимодействия фермента с ГАГ-лигандами в целях выяснения закономерностей регуляции его функционирования в биосистемах. Обзорное рассмотрение таких результатов выполненного нами теоретического исследования представлено в настоящем изложении и подтверждается данными других изучений [15]. Так, взаимодействие β -блокатора метопролола с адренергическим рецептором β_1 (β_1AR) сопровождалось образованием комплекса метопролол– β_1AR со значимыми конформационными изменениями внутриклеточного домена рецептора (аналогия с присоединением небольшого метопролола (как лиганда) к связывающему центру макромолекулярного рецептора). Такого не наблюдалось с другими β -блокаторами – атенололом и пропранололом. Отмеченные изменения опосредовали кардиопротекторный эффект метопролола через β_1AR без вовлечения во взаимодействие другого рецептора – β_2AR . Полученные *in vivo* и *in silico* данные обосновывают проведение в будущем клинических испытаний с адекватными дозами и своевременным внутривенным введением метопролола (а не других β -блокаторов) для оценки клинической эффективности предлагаемой стратегии у гемодинамически стабильных пациентов с подъемом ST-сегмента на электрокардиограмме (ЭКГ) при инфаркте миокарда (STEMI) [15].

ОГРАНИЧЕНИЯ И ЗАТРУДНЕНИЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО ТЕОРЕТИЧЕСКОГО ПОДХОДА

Имеются критические аспекты используемых нами теоретических приемов. Полученные в ходе

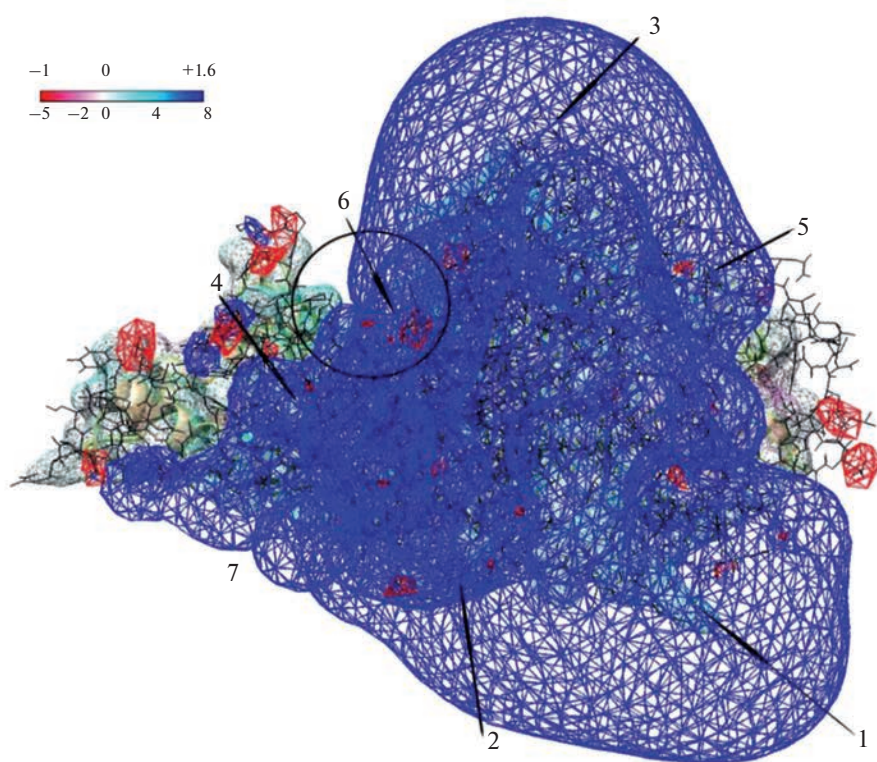
изучения результаты выявляют заметные затруднения при выполнении расчетов с большими виртуальными ячейками и большим числом лигандов из-за отсутствия компьютерных программ с более высокой разрешающей способностью и значимой зависимостью конкурентных взаимодействий исследуемых ГАГ-лигандов от конкретности их исходного распределения (внутри ячейки). Отмеченные сложности указывают лимитирующие пределы развития настоящего исследовательского подхода в его нынешнем виде и намечают направления их продуктивного преодоления (продление сроков действия имеющихся лицензий, приобретение новых бессрочных лицензий программного обеспечения (для возможной работы без обновления программ), заметное расширение высокоэффективными новыми поступлениями компьютерного парка, введение поправок и осуществление изменений российских законодательных норм, разработка отечественных продуктов нового программного обеспечения и др.).

ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЕ СИЛЫ В ДОКИНГЕ ГИАЛУРОНИДАЗЫ С КОРОТКОЦЕПОЧНЫМИ ЛИГАНДАМИ

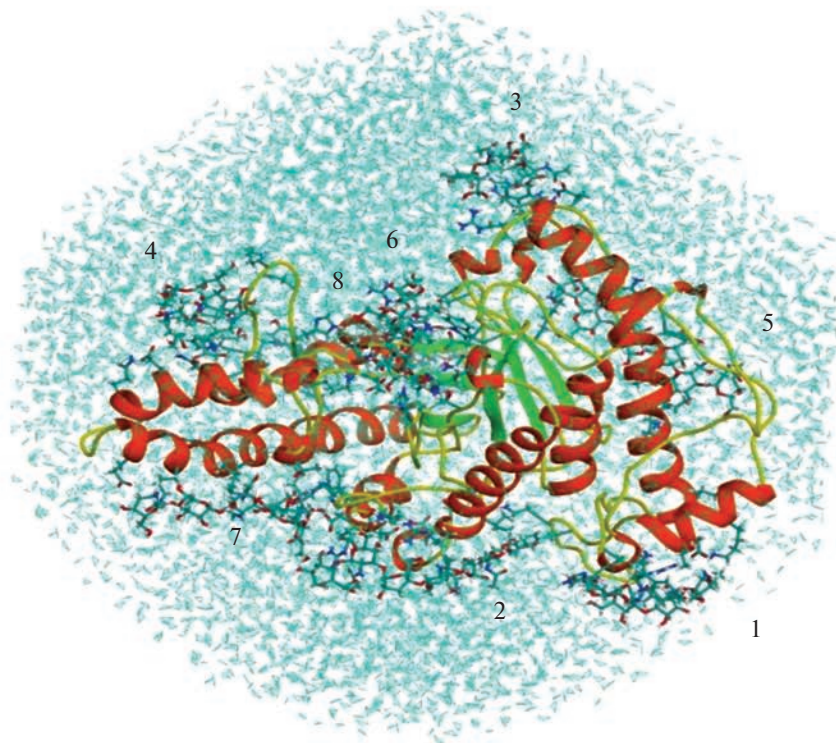
Особенностью поведения нативной гиалуронидазы *in vivo* выступает ее быстрое ингибирование и деградация, подтвержденные данными длительного (>60 лет) медицинского использования этого биокатализатора [16]. Среди множества ингибиторов фермента одним из значимых и заметных выступает гепарин. Вычислительное изучение взаимодействия гиалуронидазы с тетрамерами ГП и тримерами ХС подтвердило высокое ингибирующее действие гепарина [1]. Новым оказался обнаруженный эффект докинга 4–5 тримеров ХС, препятствующих развитию гепаринового ингибирования гиалуронидазы. Эффекторами такой стабилизации активной структуры фермента оказались электростатические взаимодействия [1, 3, 14]. Движущей силой, направляющей передвижение лиганда и приложенной к его центру масс, выступает величина градиента электрического потенциала фермента. Высокая конформа-

Рис. 2. Электростатический потенциал молекулы БТГ в воде (рН 7.5) без учета влияния ионов Na^+ и Cl^- . (а) – Изопотенциальные поверхности обозначены синим (+1.6 В) и красным цветом (–1.2 В). Между правой и левой сторонами субстратной “долины” (выделена черной окружностью) имеется существенная разность потенциалов. На заднем плане показана поверхность молекулы БТГ (выделена зеленым цветом). Цифрами обозначены центры присоединения ХН-лигандов (позиция 8 расположена с дистальной стороны молекулы белка); (б) – по указанным восьми центрам/позициям связывания тримеров ХН (обозначены цифрами) на молекулярной поверхности БТГ происходит присоединение данных лигандов [14]. При этом молекула гиалуронидазы на рисунке ориентирована параллельно главной оси инерции белка вдоль горизонтальной оси, а субстратная “долина” – так, что главная ось инерции додекамерного субстрата перпендикулярна плоскости рисунка. Молекула гиалуронидазы представлена в ленточной форме, α -спиральные участки показаны красным, β -структура – зеленым, остальные элементы структуры – желтым. ГАГ-лиганды показаны в виде мелких шариков, соединенных цилиндрами, ионы Na^+ и Cl^- – мелкими шариками, а молекулы воды – тонкими голубыми линиями. Участки 1, 2, 3 и 7 расположены в плоскости рисунка (1 и 7 посередине, 2 ближе к наблюдателю, а 3 дальше от наблюдателя), участки 4, 5 и 8 – с дистальной стороны молекулы белка, а участок 6 занимает субстратную “долину”, его позиция перпендикулярна плоскости рисунка.

(a)



(б)



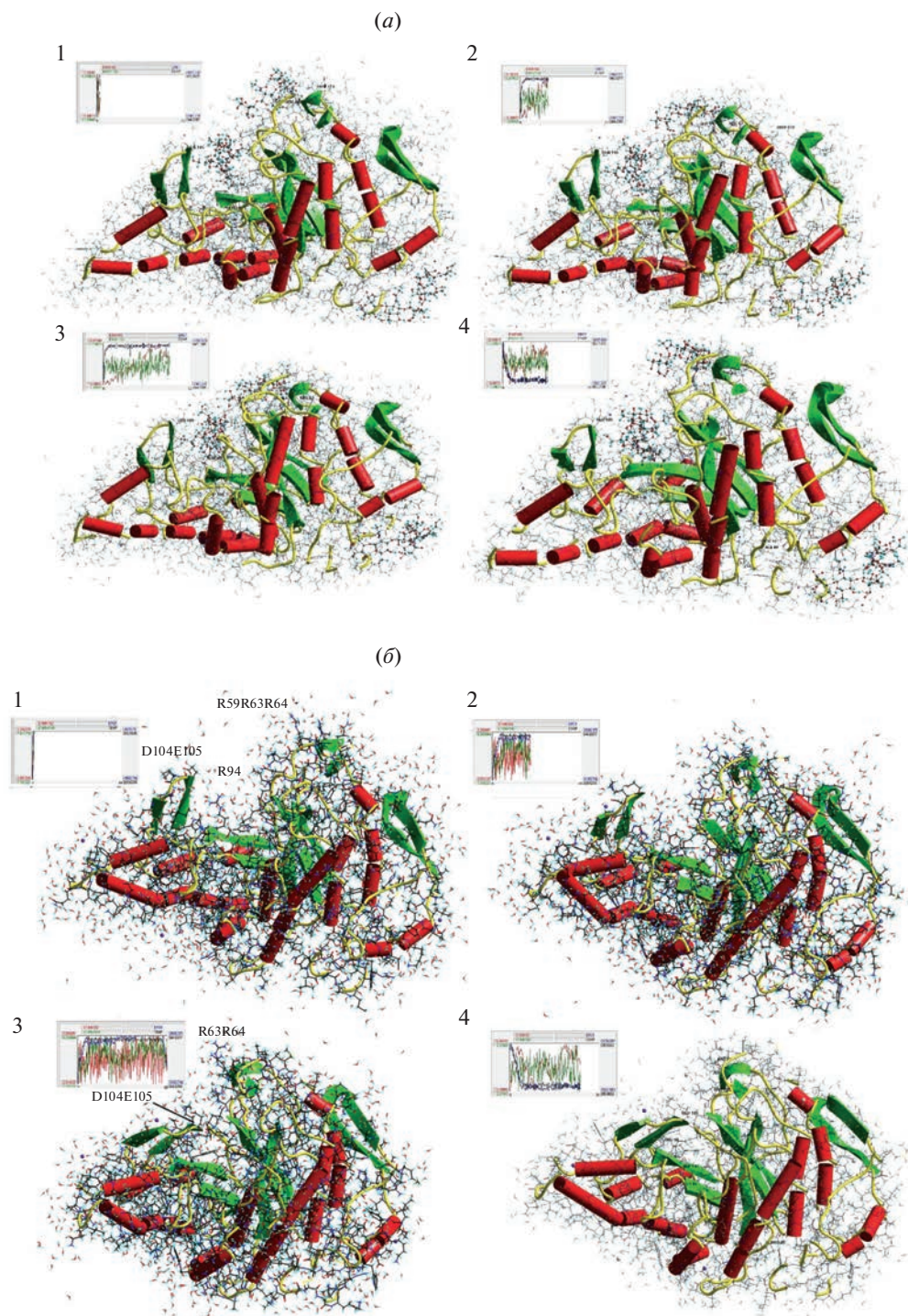


Рис. 3. (a) — Кинетика тепловой денатурации БТГ в комплексе с ХН в положениях 1, 3 и 6 при температуре 340 К со временем наблюдения 3 пс (1), 18 пс (2), 36 пс (3) и 36 + 18 пс после снижения температуры до 287 К (4). На панелях 1–3 показано противодействие термоинактивационному сужению входа в активный центр фермента благодаря взаимодействию биокатализатора с лигандами ХН. Снижение температуры с 340 до 287 К демонстрирует восстановление исходного вида/конформации молекулы фермента (вид 4 сходен с видом 1), свидетельствуя в этом случае об отсутствии ее необратимых денатурационных изменений; (б) — сужение входа в активный центр фермента ясно наблюдается для БТГ без лигандов — в этом случае вход закрывается, приводя к инактивации биокатализатора. Представлена кинетика тепловой денатурации гиалуронидазы, свободной от ГАГ-лигандов, при температуре 320 К со временем расчетного наблюдения 1 пс (1), 17 пс (2), 40 пс (3) и 20 пс после снижения температуры до 287 К (4) [14]. При снижении температуры с 320 до 287 К (4) исходный вид/конформация молекулы фермента не восстанавливается (вид 4 вовсе не похож на вид 1), что указывает на необратимые денатурационные изменения структуры нативной БТГ без лигандов ХН.

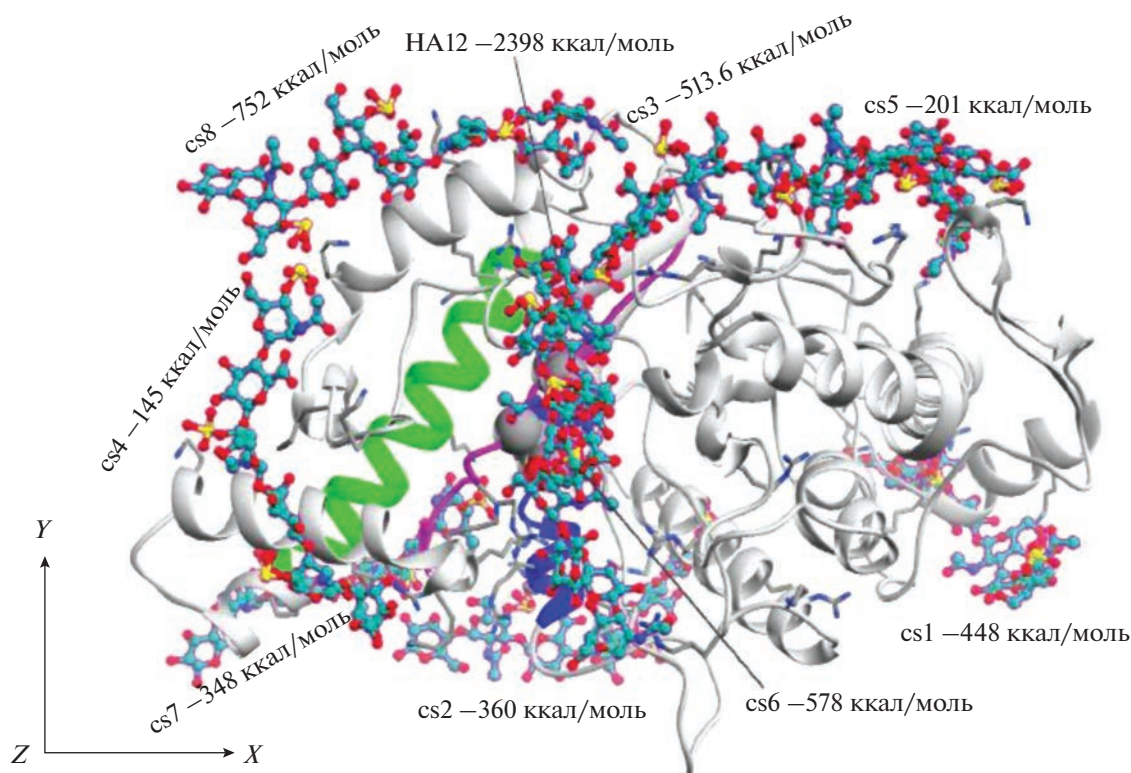


Рис. 4. Расположение восьми центров связывания лигандов ХС (обозначены как cs1–cs8) на 3D-модели БТГ с указанием величин их свободных энергий связывания при 0 К [1]. Изображение представлено в проекции, образованной главными осями инерции додекасахаридного фрагмента субстрата – гиалуронана (HA12, приведен в центре изображения) и БТГ (ось направлена по горизонтали, ось X). Главная ось инерции гиалуронана направлена по вертикали, ось Y. Петля активного центра БТГ между Asp139 и Ala156, включающая в себя Asp147 и Glu149, окрашена сиреневым цветом, протяженная α -спираль от Ala185 до Gly197 обозначена зеленым, а спираль от Glu243 до Glu256 – синим цветом.

ционная гибкость ГАГ (благодаря чему в основном пока только их короткие фрагменты (до тетрамеров) надежно вычислительно докируются) с заметным влиянием растворителя обуславливают продолжающееся совершенствование инструментов расчетного изучения (программного обеспечения) таких процессов [1, 17]. Изменение поверхностного электростатического потенциала свободной гиалуронидазы в результате докинга с восемью тримерами ХС показано нами в теоретическом изучении (рис. 4) [1].

Создаваемое ферментом и его комплексом со всеми восемью лигандами ХС электрическое поле целиком окружает белковую глобулу и примерно повторяет профиль молекулы биокатализатора (рис. 5а). Наиболее эффективными и предпочтительными участками электростатического связывания тримеров ХС предстают центры cs8, cs3, cs1 и cs2, а способствующими снижению гепаринового ингибирования фермента (в соответствии с определенной нами последовательностью предпочтительного связывания ГАГ-лигандов и экспериментально вполне достижимыми) – центры cs8, cs3, cs1, cs4, cs2 и cs7 (рис. 5б) [1]. Вместе с тем центр cs7 с невысокой аффинностью, но наиболее подходящий для ковалентной модифи-

кации (из-за наличия непосредственного контакта с лизиновыми остатками, табл. 1), после ковалентного взаимодействия с тримером ХС может оказаться достаточным для предупреждения ингибирования гиалуронидазы гепарином.

Величины энергий взаимодействия вычисляли в рамках силового поля Amber ff99. Заряды для нестандартных аминокислотных остатков обычно определяли в рамках алгоритма Gastinger. Электростатический потенциал (с проекцией на поверхность молекулы или в растворитель) вычисляли с соотношением Poisson–Boltzmann, принимая диэлектрическую константу при виртуальном растворителе за 80 (вне поверхности макромолекулы) и за 4 (внутри нее). Остатки гистидинов, непосредственно не ассоциированные с аспарагиновой или глутаминовой кислотой, как и с сернокислыми или карбоксильными фрагментами полисахаридов, считали электронейтральными. При проведении вычислений с реальной водой ее генерировали по расчету TIP4Pbox. Величину энтальпии связи определяли как разность между суммой потенциальной энергии лиганда и его связывающего центра с величиной энергии комплекса. Использовали программы NAMD 2.1.4 с VMD 2.1.4 и Amber Tools 20 для

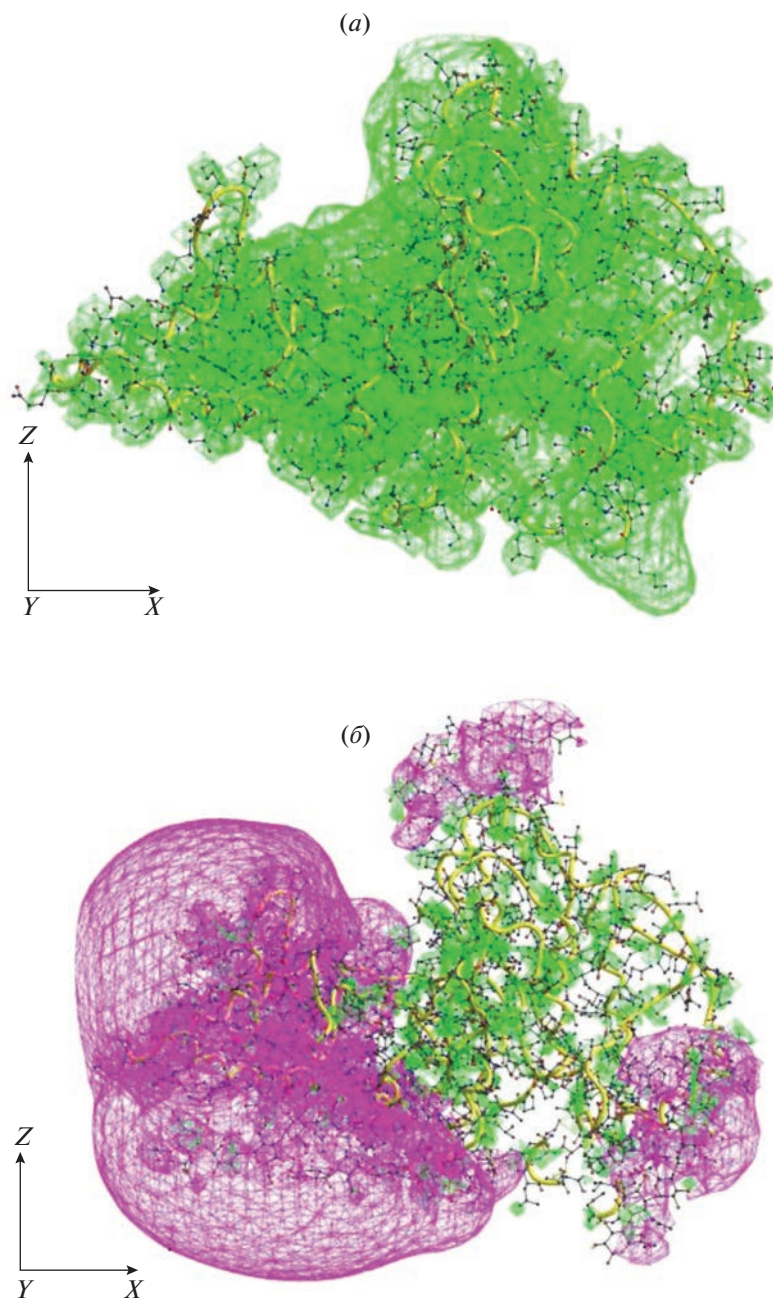


Рис. 5. Вид поверхности изоэлектрического потенциала (по уровню $0.4 e/a_0$) молекулы БТГ. Отрицательные значения электростатического потенциала окрашены в сиреневый/темно-серый цвет, положительные — в зеленый/светло-серый. (а) — Свободная БТГ; (б) — БТГ с шестью лигандами ХС по центрам cs7, cs1, cs2, cs3, cs4, cs8 и гепариновым лигандом в зоне cs6 демонстрирует действие лиганда ХС по центру cs7, стабилизирующее структуру БТГ [1].

Linux или NAMD 2.1.2 с VMD 1.9.3 и Amber Tools 18 для Windows. Для подготовки иллюстраций применяли программу UCSF Chimera 1.13.1.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности обоснования и составления рекомендаций на основе расчетных данных теоретических исследований взаимодействий гиалуронидазы с короткоцепочечными ГАГ-лигандами для экспериментального получения ее стабилизированных форм лечебного назначения.

ВАЖНОСТЬ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ СТРУКТУРЫ ГИАЛУРОНИДАЗЫ СЕЛЕКТИВНОЙ ЗАНЯТОСТИ ЦЕНТРОВ ПРИСОЕДИНЕНИЯ ЛИГАНДОВ НА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ФЕРМЕНТА

Значимой особенностью стабилизации (против термоинактивации) структуры 3D-модели гиалуронидазы в результате взаимодействия с три-

Таблица 1. Величина энергии взаимодействия ГАГ-лигандов (тримеров ХН и ХС) с 3D-моделью бычьей тестикулярной гиалуронидазы* (БТГ) в среде без H_2O и Na^+

Лиганды ХН (сн) и другие компоненты взаимодействия	Энергия взаимодействия БТГ с ХН-лигандами, ккал/моль	Лиганды ХС (сs) и другие компоненты взаимодействия	Энергия взаимодействия БТГ с ХС-лигандами, ккал/моль	Аминокислотные остатки БТГ, доступные для контакта с лигандом по соответственно указанному центру/позиции на молекуле фермента
cn1	–(280–320)	cs1	–448.5	Lys446 Lys447 Lys430
–	–	cs2	–360.2	Lys292 Lys244 Arg245 Lys255 Lys256
cn3	–(310–420)	cs3	–513.6	Нет Lys Arg59 Arg63 Arg64
–	–	cs4	–145.5	Lys109
–	–	cs5	–201.6	Lys416 Lys77
cn6	–(620–690)	cs6	–577.6	Нет Lys
–	–	cs7	–348.1	Lys187 Lys198 Arg246 Asp249 Leu250 Trp252 Glu184 Ile188 Glu194 Pro153 Thr154
–	–	cs8	–752.2	Lys129
HA ₁₂ (додекасахарид гиалуронана)	–2398	–	–	–
сн (свободный тример ХН)	–320	–	–	–
сs (свободный тример ХС)	–148	–	–	–

* Выявленные на молекулярной поверхности гиалуронидазы восемь потенциальных центров связывания тримерных лигандов ХН и ХС сходны друг с другом [14].

мерами ХН [14, 18], в сравнении с антиингибирующим эффектом тримеров ХС (в отношении тетрамеров ГП) [1, 19], оказалась селективная занятость центров связывания ГАГ-лигандов на молекулярной поверхности фермента. Согласно результатам расчетов, стабилизирующее воздействие других ГАГ-лигандов оказалось существенно менее выраженным. Теоретически показано, что три тримера ГН могут первоначально присоединиться к глобуле биокатализатора (рис. 6а), а введенный в систему тример ХС эффективно вытесняет с третьего центра связывания молекулы гиалуронидазы тример ГН (рис. 6б) [20]. Экспериментально продемонстрировано меньшее стабилизирующее действие на фермент гликозидной $\beta(1-4)$ -связи целлобиозы (рассматриваемой как структурный аналог гиалуронана) по сравнению с эффектом гликозидной $\alpha(1-4)$ -связи мальтозы [21].

Стабилизация структуры гиалуронидазы проявлялась благодаря электростатическому присоединению тримера ХН уже по одному центру связывания $ch6$ (как и по трем $ch6$, $ch3$, $ch1$ и более), а для предотвращения гепаринового ингибирования биокатализатора тримерами ХС оказалось необходимым их связывание по четырем ($cs2$, $cs4$, $cs7$ и $cs8$) или пяти ($cs1$, $cs2$, $cs4$, $cs7$ и $cs8$) позициям, теоретически достаточным для предупреждения необратимых деформаций молекулы фермента при поступлении лиганда ГП в зону активного центра. В настоящее время следует отметить интенсивное изучение полимер-белковых конъюгатов [22] для расширения на их основе арсенала лекарственных средств, предложение и использование для этого модифицированных биокатализаторов [23]. Возможно, целесообразность достижения контролируемой гетерогенности получаемого продукта, регулярно технологическое воспроизводимого по своим параметрам, требует неукоснительного использования только единственного центра присоединения модификатора на белковой молекуле [24].

Величина свободной энергии связывания на молекулярной поверхности гиалуронидазы ГАГ-лигандов оказалась по крайней мере в 2 раза выше энергии самих лигандов в свободном состоянии (табл. 1). Длина цепи ГАГ-лиганда влияет на его присоединение к ферменту. Производные лигандов с длинными цепями связываются эффективнее, чем короткоцепочечные (димеры–тетрамеры), аффинность которых снижается. Имеющиеся ограничения программ расчета (программного обеспечения) белкового докинга, влияющие на надежность получаемых результатов, определяют предпочтительность его начального изучения с достаточно короткими ГАГ-лигандами, которые с наибольшей величиной свободной энергии связывания эффективно присоединяются к молекуле нативной гиалуронидазы по ее соответствующим

центрам связывания [17]. Развитие контактов ГАГ-лигандов с гиалуронидазой, как уже отмечалось выше, обусловлено электростатическими взаимодействиями (в результате контактов с аргининами, а при проведении ковалентной модификации фермента — с лизинами) без специфического связывания с активным центром биокатализатора.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ГИАЛУРОНИДАЗОЙ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВЫХ ЛИГАНДОВ, ИХ НЕКОВАЛЕНТНЫЕ И КОВАЛЕНТНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ФЕРМЕНТОМ

Электростатический потенциал молекулы гиалуронидазы меняется при докинге с ГАГ-лигандами (рис. 2а) [1]. Положительный знак потенциала свободного фермента становится отрицательным с присоединением восьми тримеров ХС со стабилизацией структуры биокатализатора благодаря не только появлению у его молекулы отрицательных зарядов, но и формированию определенного вида его электростатического потенциала [1, 17]. Установленная в изучении последовательность предпочтительного связывания ГАГ-лигандов с гиалуронидазой реализует ее (названную последовательность) в присутствии субстрата (в нашем случае додекасахарида ГН, выбранного для упрощения иллюстрирования данных, по мере увеличения концентрации тримерного ХС-лиганда): $cs8 > cs6 > cs3 > cs1 > cs2 \gg cs7 \gg cs5$. Со свободным ферментом без субстрата последовательность меняется следующим образом: $cs8 > cs3 > cs1 > cs4 > cs2 \gg cs7 \gg cs5$; при ковалентном связывании ГАГ-лигандов (после их бензохиноновой активации) по лизиновым остаткам фермента последовательность другая: $cs7 > cs1 > cs5 \gg cs2$, $cs8$, $cs4$ [17]. Наибольший эффект стабилизации активности гиалуронидазы достигается при докинге тримера ХН по центру $sn6$ и по центрам $sn6$, $sn3$ и $sn1$ посредством электростатического нековалентного взаимодействия (рис. 3б), а с тримерами ХС — по центрам $cs2$, $cs4$, $cs7$ и $cs8$ или $cs1$, $cs2$, $cs4$, $cs7$ и $cs8$ (рис. 5б). Ковалентное присоединение тримера ХН к гиалуронидазе по центру $sn6$ (или $sn6$, $sn3$ и $sn1$) экспериментально может оказаться весьма затрудненным, поскольку около центров $sn6$ и $sn3$ нет лизиновых остатков, доступных для контакта с лигандом, а имеются три лизиновых остатка лишь по позиции $sn1$ (табл. 1). А вот ковалентная модификация гиалуронидазы тримером ХС по центру $cs7$ фермента (или $cs7$, $cs1$, $cs5$) может оказаться вполне достаточной для предотвращения ингибирования фермента гепарином [1, 17]. Возможно, множественность (с обилием ГАГ-лигандов) воздействия на гиалуронидазу ХС- или ХН-лигандов поддержит и укрепит

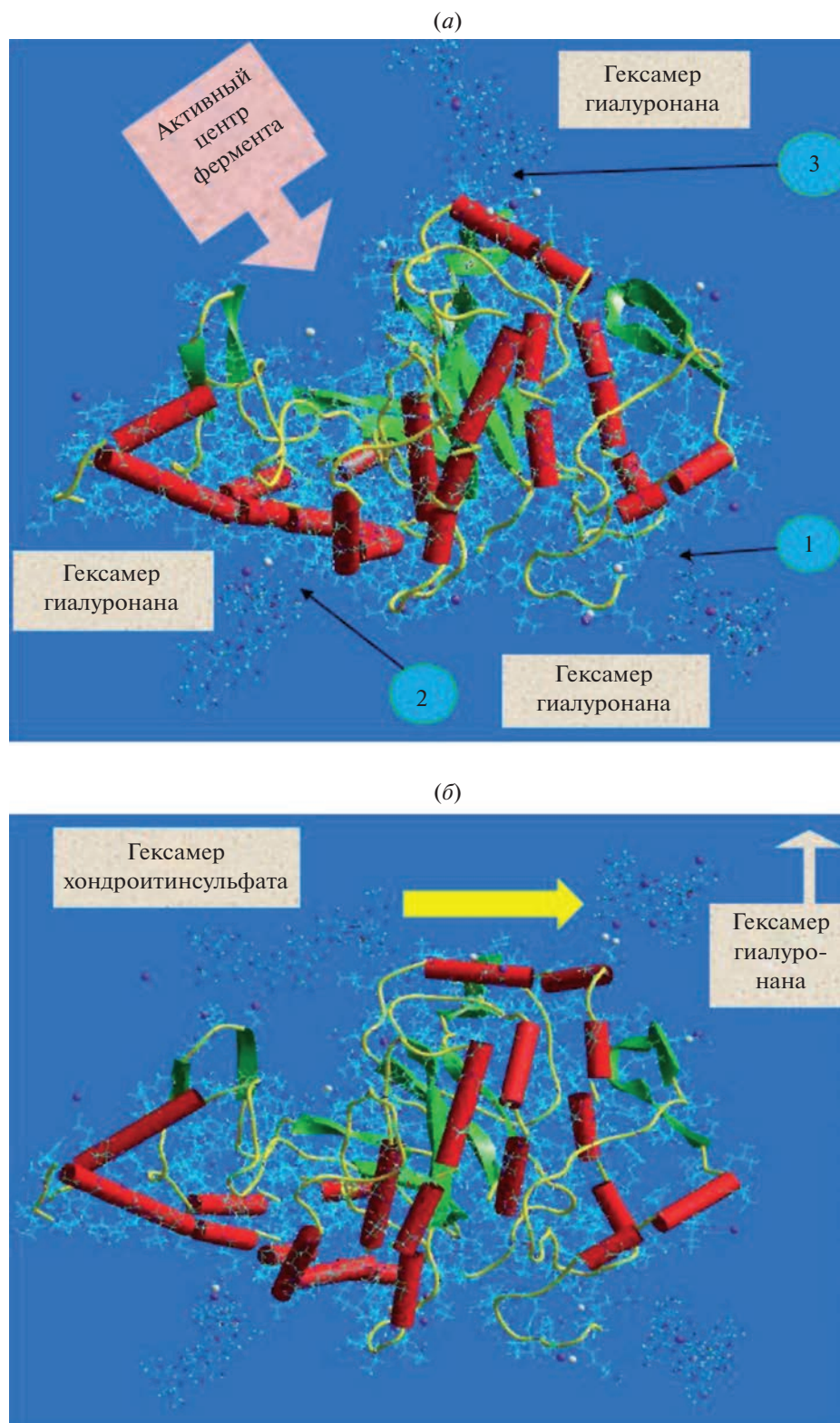


Рис. 6. Начальное/стартовое состояние расчетного наблюдения (а), когда три гексамера ГН занимают свои позиции по центрам связывания (1–3) на глобуле гиалуронидазы при 310 К (поддерживается указанная температура); (б) – вытеснение гексамера ГН (на рисунке сверху справа, уходящий лиганд) с третьего центра его связывания (показано стрелкой) на молекулярной поверхности гиалуронидазы гексамером ХС (расположенным над входом или у входа в “долину” активного центра биокатализатора, ХС-лиганд становится связывающимся с глобулой фермента новым лигандом) на 2.0 нс времени расчетного наблюдения изучаемого конкурентного взаимодействия ХС- и ГН-лигандов с ферментом [20].

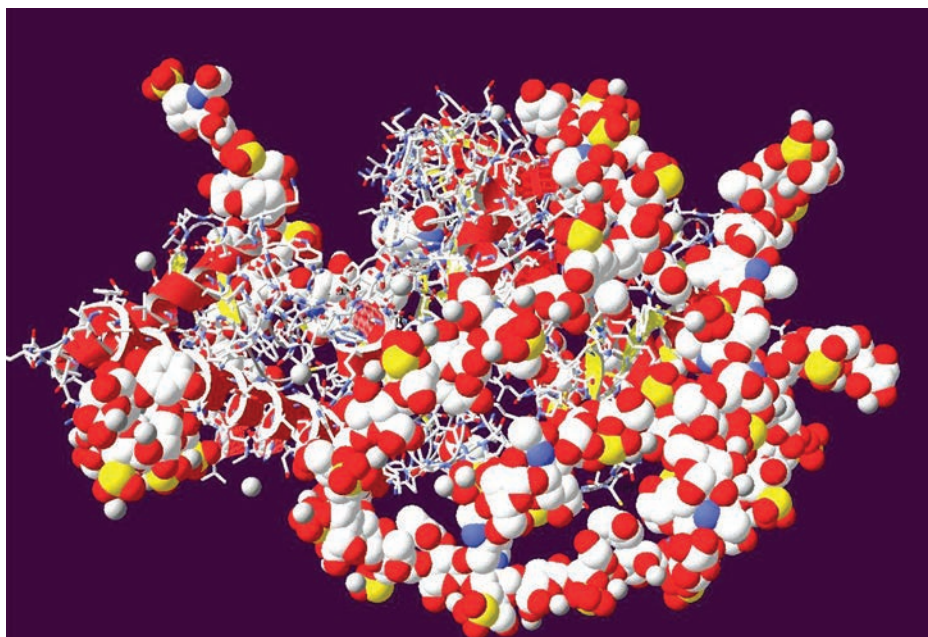


Рис. 7. Модельная структура молекулы гиалуронидазы, ковалентно связанной почти по всем лизиновым остаткам фермента с полимерной формой хондроитинсульфата [13]. Глобула биокатализатора оказывается окруженной ХС-оболочкой (представлена разноцветными фрагментами сфер, дисками, цилиндрами) с сохранением доступа к активному центру фермента.

пит значимое для функционирования биокатализатора многообразие его микроокружения [17–19]. Следует напомнить, что расчетное построение 3D-модели ковалентного конъюгата гиалуронидазы с высокомолекулярной формой ХС (120–140 кДа) при практически полном блокировании лизиновых остатков биокатализатора позволяет окружить его глобулу ХС-оболочкой с сохранением доступности к активному центру (рис. 7) [3, 13], подчеркивая эту особенность фермента при формировании его достаточно плотного микроокружения. Представленные данные обоснованно свидетельствуют о возможной стабилизации активности фермента в результате нековалентного и ковалентного взаимодействия с ГАГ-лигандами.

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИАЛУРОНИДАЗЫ БИОМЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

По величине укрепления структуры 3D-модели гиалуронидазы (благодаря нековалентным электростатическим взаимодействиям) теоретически выделяются эффективность своего докинга тримеры ХН и ХС [1, 14]. Действительно, присоединение уже одного тримера ХН по единственному центру связывания на молекулярной поверхности биокатализатора $cn6$ способствует заметному увеличению стабильности фермента.

Такой же результат обнаружен при докинге тримеров ХН по трем и более связывающим позициям $cn6$, $cn3$, $cn1$ на гиалуронидазе [14]. Отмеченные теоретические особенности докинга гиалуронидазы с тримерами ХН подчеркивают обоснованность экспериментального изучения свойств комплекса фермента с ХН-лигандами при обработке биокатализатора предположительно эквимолекулярными с ферментом концентрациями тримера ХН либо его избыточными количествами.

Докинг гиалуронидазы с тримерами ХС обнаруживает эффект, стабилизирующий структуру фермента благодаря присоединению тримеров ХС по 4–5 центрам связывания: $cs2$, $cs4$, $cs7$, $cs8$ или $cs1$, $cs2$, $cs4$, $cs7$, $cs8$ [1, 17]. С учетом влияния выявленной нами последовательности предпочтительного присоединения ГАГ-лигандов к гиалуронидазе [17], реально экспериментально достижимой оказывается занятость центров $cs8$, $cs3$, $cs1$, $cs4$, $cs2$ и $cs7$. Вероятно, приведенные данные подразумевают экспериментально рекомендуемую обработку нативной гиалуронидазы избытком тримеров ХС.

Ковалентная модификация нативной гиалуронидазы ГАГ-лигандами теоретически демонстрирует значимые затруднения для осуществления стабилизирующего структуру биокатализатора присоединения к ферменту тримеров ХН по центру $cn6$ или центрам $cn6$, $cn3$ и $cn1$ [17]. Обнаруживается недостижимость отмеченной селективной занятости указанных центров связывания

ХН-лигандов на ферментной глобуле (табл. 1), когда последовательность их ковалентного предпочтительного связывания реально демонстрирует лишь экспериментальную достижимость присоединения тримеров ХН по ограниченному набору центров, а именно $cn7$, $cn1$, $cn5$; $cn2$, $cn8$, $cn4$ (а вовсе не $cn6$, $cn3$, $cn1$). Отмеченное положение внушает заметные сомнения в эффективности развития такого направления экспериментальной ковалентной модификации гиалуронидазы. Теоретически более перспективной и реально экспериментально достижимой выступает ковалентная модификация фермента тримером ХС по центру (единственному) $cs7$, как и по трем центрам $cs7$, $cs1$, $cs5$ (с экспериментально используемыми эквимолекулярными концентрациями биокатализатора и тримеров ХС либо с избыточным присутствием последнего) [17].

Стабилизация структурной организации биокатализатора достигается также благодаря использованию методов биологического синтеза для получения модифицированных генно-инженерных ферментных производных (пригодных и для выпуска гиалуронидазы). Так, в результате замены первых 24 а.о. *N*-концевого рецептор-связывающего домена (по сравнению с природной формой белка) была получена рекомбинантная проурокиназа (пулолаза), эффективно вошедшая в отечественную клиническую практику тромболитической терапии [25]. На основе генно-инженерной технологии разработана неиммуногенная стафилокиназа (коммерческий рекомбинантный фортелизин), продемонстрировавшая эффективное и безопасное фибринолитическое действие у пациентов с инфарктом миокарда (с подъемом ST-сегмента на электрокардиограмме) [26, 27]. Заявляемая потребность и перспективность перехода от тромболитизиса только одним препаратом к комбинированному (с применением нескольких тромболитиков) фибринолізу с использованием как триггера тканевого активатора плазминогена с поддерживающим действием проурокиназы [28] или модифицированных форм урокиназы [29] указывает на неослабевающее стремление специалистов научно-клинической сферы к повышению эффективности тромболитической терапии. Этому способствует и получение новых модифицированных форм ферментов [30], в том числе гиалуронидазы [1, 3, 13, 14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе данных теоретического изучения взаимодействия гиалуронидазы с ГАГ-лигандами [1, 14, 17, 19] обосновываются приведенные выше рекомендации экспериментального получения стабилизированных медицинских форм этого фермента в результате нековалентных электростатических взаимодействий фермента с триме-

рами ХН или ХС, как и благодаря ковалентной модификации биокатализатора тримерами ХС. Экспериментальное изучение биохимических свойств названных нековалентных и ковалентных комплексов фермента с ХН- или ХС-лигандами способствует выбору для биомедицинской апробации на модельных поражениях системы кровообращения у животных наиболее предпочтительных по устойчивости и уровню ферментативной активности названных производных гиалуронидазы для их объективной критической оценки [31]. Дополнительным ресурсом стабилизации активной структуры гиалуронидазы (после взаимодействия фермента с ГАГ-лигандами на первом этапе его модификации) может оказаться последующее окружение глобулы биокатализатора ХС-оболочкой [3, 13]. Так, ковалентное связывание бычьей гиалуронидазы с высокомолекулярным носителем (сополимером *N*-оксида 1,4-этиленпиперазина и (*N*-карбоксиметил)-1,4-этиленпиперазиний бромида) способствовало коммерческому выпуску препарата Лонгидаза (ООО "НПО Петровакс Фарма", Россия) [32, 33], продемонстрировавшего выраженные антифибротические свойства. Перспективным представляется и получение медицинских генно-инженерных конструкторов гиалуронидазы разного доменного состава (с возможным удалением какого-то из доменов (например, домена эпидермального фактора роста или его части), что будет определяться по результатам предварительных экспериментов). Это подтверждается данными результатов клинического использования генно-инженерного препарата Пулолаза (НМИЦ кардиологии имени академика Е.И. Чазова, Москва, Россия), показавшего эффективность таких белковых производных тромболитического назначения для действенного применения в практике неотложной кардиологии [25].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (госзадание НМИЦ кардиологии имени академика Е.И. Чазова, тема 121031300189-3).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Представленный материал не содержит описания исследований, проведенных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максименко А.В., Бибилашвили Р.Ш. // Биорг. химия. 2018. Т. 44. С. 147–157. [Maksimenko A.V., Beablashvili R.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 165–172.] <https://doi.org/10.1134/S1068162018020048>
2. Reitsma S., Slaaf D.W., Vink Y., van Zandvoort M.A., onde Egbrink M.G. // Pflüger's Arch. 2007. V. 454. P. 345–359. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0212-8>
3. Maksimenko A. // Cardiology and Cardiovascular Res. 2020. V. 4. P. 220–230.
4. Chandel N.S. // Cold Spring Harbor Perspective Biol. 2021. V. 13. P. 1–7. <https://doi.org/10.1101/cshspect.040568>
5. Sankaranarayanan N.V., Nagarajan B., Desai U.R. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2018. V. 50. P. 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.12.004>
6. Yang J., Chi L. // Carbohydr. Res. 2017. V. 452. P. 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.10.008>
7. Nieuwdorp M., Meuwese M.C., Vink H., Hoekstra J.B., Kastelein J.J., Stroes E.G.S. // Curr. Opin. Lipidol. 2005. V. 16. P. 507–511. <https://doi.org/10.1097/01.mol.0000181325.08926.9c>
8. Broekhuizen L.N., Mooij H.L., Kastelein J.J., Stroes E.G.S., Vink H., Nieuwdorp M. // Curr. Opin. Lipidol. 2009. V. 20. P. 57–62. <https://doi.org/10.1097/mol.0b013e328321b587>
9. Andreozzi G.M. // Int. Angiol. 2014. V. 33. P. 255–262.
10. Coccheri S. // Int. Angiol. 2014. V. 33. P. 263–274.
11. Masola V., Zaza G., Onisto M., Lupo A., Gambaro G. // Int. Angiol. 2014. V. 33. P. 243–254.
12. Manello F., Ligi D., Raffetto J.D. // Int. Angiol. 2014. V. 33. P. 236–242.
13. Максименко А.В., Турашев А.Д., Бибилашвили Р.Ш. // Биохимия. 2015. Т. 80. С. 348–357. [Maksimenko A.V., Turashev A.D., Beablashvili R.S. // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 284–295.] <https://doi.org/10.1134/S0006297915030049>
14. Максименко А.В., Бибилашвили Р.Ш. // Биорг. химия. 2020. Т. 46. С. 151–157. [Maksimenko A.V., Beablashvili R.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 181–186.] <https://doi.org/10.1134/S1068162020020156>
15. Clemente-Moragon A., Gomez M., Villena-Gutierrez R., Lalama D.V., Garcia-Prieto J., Martinez F., Sanchez-Cabo F., Fuster V., Oliver E., Ibanez B. // Eur. Heart J. 2020. V. 41. P. 4425–4440. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa733>
16. Jung H. // Arch. Plast. Surg. 2020. V. 47. P. 297–300. <https://doi.org/10.5999/aps.2020.00752>
17. Максименко А.В., Бибилашвили Р.Ш. // Изв. Акад. наук. Серия хим. 2018. Т. 67. С. 636–646. <https://doi.org/10.1007/s11172-018-2117-4>
18. Максименко А.В., Сахарова Ю.С., Бибилашвили Р.Ш. // Кардиологич. вестник. 2021. Т. 16. С. 15–22. <https://doi.org/10.17116/Cardiobulletin20211603115>
19. Максименко А.В., Сахарова Ю.С., Бибилашвили Р.Ш. // Кардиологич. вестник. 2021. Т. 16. С. 17–25. <https://doi.org/10.17116/Cardiobulletin202116041157>
20. Максименко А.В., Ваваева А.В., Сахарова Ю.С., Ваваев А.В., Бибилашвили Р.Ш. // Кардиологич. вестник. 2022. Т. 17. С. 39–43. <https://doi.org/10.17116/Cardiobulletin20221703139>
21. Турашев А.Д., Тищенко Е.Г., Максименко А.В. // Мол. медицина. 2009. № 6. С. 50–55.
22. Zaghami A., Greschner A.A., Gauthier M.A. // In: Polymer-Protein Conjugates / Eds. Pasut G., Zalipsky S. Elsevier, 2020. P. 389–406. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64081-9.00017-6>
23. Maneval D.C., Caster C.L., Derunes C., Locke T.W., Muhsin M., Sauter S., Sekulovich R.E., Thompson C.B., LaBarre M.J. // In: Polymer-Protein Conjugates / Eds. Pasut G., Zalipsky S. Elsevier, 2020. P. 175–204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64081-9.00009-7>
24. Ferguson E.L., Varache M., Stokniene J., Thomas D.W. // In: Polymer-Protein Conjugates / Eds. Pasut G., Zalipsky S. Elsevier, 2020. P. 421–453. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64081-9.00019-X>
25. Миленкина С.Г., Дельвер Е.П., Белогуров А.А., Бибилашвили Р.Ш., Арзамасцев Е.В., Староверов И.И. // Кардиологич. вестник. 2019. Т. 15. С. 12–21. <https://doi.org/10.36396/MS.2019.15.4.002>
26. Марков В.А., Дуляков Д.В., Константинов С.Л., Клейн Г.В., Аксентьев С.Б., Платонов Д.Ю., Вышлов Е.В., Пономарев Е.А., Рабинович Р.М., Макаров Е.Л., Кулибаба Е.В., Юневич Д.С., Крицкая О.В., Баранов Е.А., Талибов О.Б., Герасимец Е.А. // Рос. кардиологич. журнал. 2018. Т. 23. С. 110–116. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2018-11-110-116>
27. Марков В.А., Дуляков Д.В., Константинов С.Л., Клейн Г.В., Аксентьев С.Б., Платонов Д.Ю., Вышлов Е.В., Пономарев Е.А., Рабинович Р.М., Макаров Е.Л., Кулибаба Е.В., Крицкая О.В., Баранов Е.А., Талибов О.Б., Герасимец Е.А. // Кардиологич. вестник. 2017. Т. 12. № 3. С. 52–59.
28. Gurevich V. // Cardiol. Vascular Res. 2021. V. 5. P. 1–3.
29. Maksimenko A.V., Tischenko E.G. // J. Thromb. Thrombolys. 1999. V. 7. P. 307–312. <https://doi.org/10.1023/a:1008939428688>
30. Максименко А.В. // Acta Naturae. 2012. Т. 4. С. 76–86. [Maksimenko A.V. // Acta Naturae. 2012. V. 4. P. 72–81.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23150805>
31. Maksimenko A., Turashev A., Fedorovich A., Rogoza A., Tischenko E. // J. Life Sci. 2013. V. 7. № 2. P. 171–188.
32. Trizna E., Baidamshina D., Gorshkova A., Drucker V., Bogachev M., Tikhonov A., Kayumov A. // Pharmaceutics. 2021. V. 13. P. 1740. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111740>
33. Кульчавеня Е.В., Шевченко С.Ю., Чередниченко А.Г., Бреусов А.А., Винницкий А.А. // Урология. 2020. № 3. С. 56–62. <https://doi.org/10.18565/urology.2020.3.56-62>

Theoretical Grounding and Formation of Experimental Approaches to Hyaluronidase Structure Consolidation due to Its Computational Interactions with Shortchain Glycosaminoglycan Ligands

A. V. Maksimenko*, # and R. Sh. Beabealashvili*

#Phone: +7 (495) 414-60-25; e-mail: alex.v.maks@mail.ru

**National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov,
ul. 3-ya Cherepkovskaya 15A, Moscow, 121552 Russia*

The computational study of 3D model hyaluronidase interaction with shortchain glycosaminoglycan ligands demonstrated the diversity and significance of their reaction on enzyme structure. It has been realized due to electrostatic noncovalent interactions (without specific coupling with active site) inducing the perceptible conformational alterations of biocatalyst molecule. As a result of this the inactivation and stabilization of enzyme globule are observed, change of inhibition of biocatalyst by heparin. The binding of chondroitin trimers (on centers cn6, cn3, cn1) to hyaluronidase molecular surface increased the enzyme stability, binding of chondroitin sulfate trimers (on centers cs2, cs4, cs7, cs8 or cs1, cs2, cs4, cs7, cs8) decreased the inhibition of enzyme by tetramer heparin. It should be noted the importance of ligand binding for regulation of enzyme functioning and existence of multiform and multicomponent microenvironment of enzyme. The sequence of preferable coupling of ligands with hyaluronidase is elicited in our study and with its help was evaluate reality of experimental selective modification of enzyme (possibly no covalently or covalently, for instance, with chondroitin sulfate trimers on centers cs7, cs1, cs5) for experimental obtaining of stabilized enzyme forms of medical destination. The perspective approaches for this aim may be the no covalent reaction on hyaluronidase by chondroitin or chondroitin sulfate trimers as well covalent modification of biocatalyst by chondroitin sulfate trimers.

Keywords: bovine testicular hyaluronidase, tertiary enzyme structure, glycosaminoglycan ligands, noncovalent and covalent modification of hyaluronidase, obtaining of new hyaluronidase drug



ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ БЕЛОК ХОЛОДОВОГО ШОКА YB-1 ИНДУЦИРУЕТ ТОЛЕРАНТНОСТЬ К GMDP И LPS В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ МАКРОФАГОВ МЫШИ J774¹

© 2023 г. Л. Г. Алексеева*, #, А. Г. Ламан**, Е. А. Мещерякова*, А. О. Шепеляковская**, Ф. А. Бровко**, В. Т. Иванов*

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

**ФГБУН “Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 6

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 10.12.2022 г.

Принята к публикации 11.12.2022 г.

Белок холодового шока YB-1 участвует в регуляции множества фундаментальных биологических процессов. Ранее мы показали, что YB-1 также вовлечен в процесс распознавания мурамилпептида GMDP рецептором системы врожденного иммунитета NOD2 и способен при предварительном введении защищать мышей от гибели в модели септического шока, индуцированного бактериями *Escherichia coli*. Мы предположили, что протективное действие YB-1 может быть связано с развитием состояния толерантности (“неотвечаемости”). Возможность индукции толерантности белком YB-1 мы проверяли в модельной системе на клеточной линии макрофагов мыши J774 с участием компонентов клеточной стенки бактерий *E. coli* – иммуностимуляторов GMDP (агонист рецептора NOD2) и LPS (агонист рецептора TLR4). Изменения клеточного ответа оценивали по уровню экспрессии мРНК целевых молекул методом количественного ПЦР-анализа, совмещенного с обратной транскрипцией. При предварительной обработке клеток YB-1 наблюдалось значительное снижение уровня экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов – IL-1 β , TNF- α и IL-6 – в ответ на дальнейшую стимуляцию GMDP и LPS, а также были выявлены существенные изменения в экспрессии мРНК адаптерных молекул RIP2, MyD88 и компонентов транскрипционного фактора NF- κ B. Полученные нами данные показывают, что YB-1 способен индуцировать толерантность к иммуностимуляторам, таким как GMDP и LPS, по всей видимости, за счет усиления продукции противовоспалительного цитокина IL-1Ra и ингибитора SOCS1. Более точная характеристика особенностей индуцированного YB-1 состояния толерантности требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, GMDP, LPS, фактор транскрипции YB-1, толерантность

DOI: 10.31857/S013234232303003X, **EDN:** PDIGUQ

ВВЕДЕНИЕ

Эволюционно консервативный белок холодового шока YB-1 обнаруживается практически во всех клеточных структурах и участвует в регуляции множества фундаментальных биологических процессов, таких как пролиферация и миграция клеток, репарация ДНК, транскрипция, синтез белка и др. [1].

Ранее мы показали, что белок YB-1 также вовлечен в процесс распознавания мурамилпептида GMDP рецептором системы врожденного иммунитета NOD2, и YB-1 выступал необходимым компонентом для развития полноценного иммунного ответа [2]. Была продемонстрирована совместная локализация белков NOD2 и YB-1 в клетке и способность YB-1 специфически взаи-

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: Bcl-3 – белок, кодируемый геном *BCL3* (B-cell lymphoma 3-encoded protein); B2M – β 2-микроглобулин; GMDP – *N*-ацетилглюкозаминил-*N*-ацетилмурамоил-аланил-D-изоглутамин; HPRT1 – гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase); IL – интерлейкин; IRAK – киназа, ассоциированная с рецептором IL-1 (interleukin-1 receptor-associated kinase); LPS – липополисахарид; MDP – мурамоилдипептид; MyD88 – белок, кодируемый геном *MYD88* (myeloid differentiation primary response gene); NOD – нуклеотид-связывающий олигомеризующий домен (nucleotide binding oligomerization domain); RIP – белок, взаимодействующий с рецептором receptor-interacting protein; SOCS – супрессор сигнала цитокинов (suppressor of cytokine signaling); TLR – Toll-подобный рецептор (Toll-like receptor); TNF- α – фактор некроза опухоли альфа.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 335-61-77; эл. почта: luda.alekseeva@mail.ru).

модействовать как с GMDP, так и с NOD2-рецептором [2, 3]. Полученный при иммунопреципитации с использованием антител к YB-1 белковый комплекс при анализе методом иммуноблоттинга давал четкую полосу продукта с соответствующим массе NOD2 молекулярным весом, распознаваемую также анти-NOD2-антителами. В свою очередь, анти-NOD2-антитела выявляли белок с соответствующим YB-1 размером, также реагирующий с анти-YB-1-антителами. Белок YB-1 был способен в присутствии GMDP формировать комплекс с рекомбинантным фрагментом NOD2 273–1040 а.о. ($K_d = 4 \times 10^{-8}$).

Стимуляция MDP клеток, стабильно экспрессирующих рецептор NOD2, приводит к увеличению синтеза фактора транскрипции YB-1 [4]. По нашим данным, в присутствии рекомбинантного белка YB-1 значительно снижается ответ лейкоцитарных моноцитов человека линии THP-1 на стимуляцию мурамилпептидом GMDP [5], что выражалось в уменьшении относительного содержания мРНК провоспалительного цитокина IL-1 β , рецепторов врожденного иммунитета NOD2 и TLR4, их адаптерных молекул RIP2, MyD88 и субъединиц p105/p50 (NF- κ B1) и p100/p52 (NF- κ B2) комплекса фактора транскрипции NF- κ B. В нокаутных по YB-1 клетках THP-1 при их стимуляции GMDP наблюдали повышенный по сравнению с исходными клетками уровень мРНК IL-1 β , а также всех вышеперечисленных молекул, участвующих в активации сигнального пути фактора транскрипции NF- κ B. Мы полагаем, что фактор транскрипции YB-1 может выполнять роль негативного регулятора активности NOD2-рецептора, но более точное определение его функций и механизмов действия требует дальнейших исследований.

Для изучения вопроса, может ли белок YB-1 сам по себе без участия GMDP модулировать иммунный ответ, были проведены эксперименты в модели септического шока на мышах линии Balb/c, инфицированных летальной дозой бактерий *Escherichia coli*, подобранной таким образом, чтобы вызывать гибель 90% животных в течение пяти дней после инъекции [6]. Дополнительно мышам вводили рекомбинантный белок YB-1 в дозе 1 мкг на животное либо вместе с суспензией бактерий, либо за 12 ч перед инъекцией бактерий. Введение YB-1 одновременно с бактериями усиливало действие *E. coli*, и все мыши погибали от сепсиса в течение 3–4 дней. Напротив, предварительная инъекция рекомбинантного белка YB-1 демонстрировала значительный протективный эффект против смертельного действия *E. coli*, в этом случае 9 из 18 животных (50%) выживали в течение 30 дней после заражения.

Поскольку, как уже говорилось выше, YB-1 принимает участие в работе системы врожденно-

го иммунитета и влияет на формирование сигналов от рецепторов врожденного иммунитета, мы предположили, что его протективное действие при предварительном введении может быть связано с развитием состояния толерантности (“неотвечаемости”) системы врожденного иммунитета мышей к дальнейшей стимуляции бактериями. Важно отметить, что уровень YB-1 повышается при воспалении и очень сильно увеличен у больных с сепсисом [7].

Цель настоящей работы заключалась в проверке предположения о возможности индукции толерантности белком YB-1 в модельной системе на клеточной линии макрофагов мыши J774 с участием компонентов клеточной стенки бактерий *E. coli* – GMDP (лиганд рецептора NOD2) и LPS (лиганд рецептора TLR4).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Толерантность к компонентам клеточной стенки бактерий – базовый регуляторный механизм при бактериальной инфекции. Феномен толерантности (“неотвечаемости”), когда стимулированные лигандами для рецепторов TLR и NOD макрофаги переставали отвечать на последующую стимуляцию теми же лигандами, известен для рецепторов TLR2, TLR4, TLR5, TLR9 и NOD2 [8–10]. Существует много примеров индукции перекрестной толерантности между различными семействами рецепторов врожденного иммунитета, например, предварительная обработка мурамилпептидом MDP, лигандом для NOD2, может существенно снизить продукцию провоспалительных цитокинов в культуре первичных макрофагов человека при рестимуляции их лигандами рецепторов TLR2 и TLR4 [10]. Подобно этому, предварительная (за 14 дней) инъекция мышам мурамилпептида GMDP обеспечивала протективный эффект от токсического действия LPS у 70–90% животных [11]. Толерантность, индуцированная бактериальным липопротеином, содержащим *N*-ацил-*S*-диацилглицерилцистеин (агонист TLR2), защищала не только от последующей летальной дозы липопротеина, но также от инфекций, вызываемых живыми грамположительными бактериями *Staphylococcus aureus* и грамотрицательными бактериями *Salmonella typhimurium* [12].

Состояние толерантности могут вызывать не только агонисты рецепторов врожденного иммунитета, но также провоспалительные цитокины, например, TNF- α [13], и “алармины”, такие как белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа [14] и Mrf8 [15]. Нужно отметить, что по своим иммунологическим свойствам белки теплового шока во многом схожи с белком YB-1 – они так же демонстрируют адьювантный эффект [16] и защитное действие от инфекции [17].

Таблица 1. Синтетические олигонуклеотиды, используемые для амплификации целевых молекул кДНК

Мишень	Прямой праймер (5'–3')	Обратный праймер (5'–3')
<i>HPRT1</i>	CCTGCTGGATTACATCAAAGCACTG	TCCAACACTTCGTGGGGTCCT
<i>B2M</i>	ATGAGTATGCCTGCCGTGTG	CCAAATGCGGCATCTTCAAAC
<i>IL1β</i>	ACAGTGGAATGAGGATG	TGTAGTGGTGGTCGGAGA
<i>TNF</i>	ATGAGCACTGAAAGCATGATC	TCACAGGGCAATGATCCCAAAGTAGACCTGCCC
<i>IL6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	CTCTGAAGGACTCTGGCTTTG
<i>NOD2</i>	CAATGTCACCCACAGAGTTGTAGTCC	GGCACCTCAAGTTGACATTTTGC
<i>RIP2</i>	CCATTGAGATTTTCGCATCCT	ATGCGCCACTTTGATAAACCC
<i>MYD88</i>	TTGAGGAGGATTGCCAAAAG	GGGGTCATCAAGTGTGGTG
<i>IRAK4</i>	GGTCCAGATTGAGCTGTTTGCC	GTTTGTGCCACTGTTGCCGCTT
<i>p105/p50</i>	CAGCAGATGGCCCATACCTT	TTGCAGATTTTGACCTGAGGGT
<i>p100/p52</i>	ACACGTACCGACAGACAACC	TTCCTTCACCTCTGTGCTGG
<i>RELA</i>	CGCTTCTCTTCAATCCGGT	GAGTCTCCATGCGCTACGG
<i>REL</i>	GAAGACTGCGACCTCAATGTGG	TCTTGTTACACGGCAGATCCTT
<i>IL10</i>	TATCCAGTTTGGTAGCATCCAT	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA
<i>IL1Ra</i>	CTGTTGGCTGGCCTAATCCC	GCTTTGAACAAGCACCTGCC
<i>A20</i>	TACGACACTCGGAACTGGAAT	TGACAATGATGGGTCTTCTGA
<i>IRAK3</i>	TGAGCAACGGGACGCTTT	GATTCGAACGTGCCAGGAA
<i>BCL3</i>	AGCAGTCGTCTCAGCTCCAATG	AGGCAGGTGTAGATGTTGTGGG
<i>SOCS1</i>	TGGTTGTAGCAGCTTGTGTCTTGG	CCTGGTTTGTGCAAAGATACTGGG
<i>SOCS3</i>	ATTCACCCAGGTGGCTACAG	GCCAATGTCTTCCCAGTGTT

Защитный эффект, обеспечиваемый через механизм индукции толерантности, связан с перепрограммированием фагоцитирующих клеток врожденного иммунитета, выражающемся в снижении ими продукции провоспалительных цитокинов и одновременном усилении их антимикробной активности. В целом при стимуляции рецепторов врожденного иммунитета наряду с их активацией включаются механизмы обратной регуляции иммунного ответа, такие как продукция противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF-β, а также синтез и активация ингибиторных молекул в системе сигнальных путей рецепторов врожденного иммунитета, что и обеспечивает в дальнейшем реализацию состояния “неотвечаемости” клеток. При этом в зависимости от индуктора и задействованного молекулярного сигнального пути, запускающего программу толерантности, клетки могут иметь различные характеристики и параметры данного иммунологического состояния [18].

Работа выполнена на клеточной линии макрофагов мыши J774, в качестве иммуностимуляторов были использованы компоненты бактериальной клеточной стенки – мурамилпептид GMDP (агонист NOD2) и LPS (агонист TLR4). Клетки J774 предварительно инкубировали в присутствии рекомбинантного белка YB-1 в концентрации 1 мкг/мл в течение 4 ч, затем к клеткам добавляли на 2 ч либо GMDP в концентрации

10 мкг/мл, либо LPS в концентрации 0.1 мкг/мл, либо смесь данных препаратов GMDP/LPS, которая, как известно, демонстрирует сильную синергичную реакцию [19]. В качестве контрольных использовали клетки без дополнительной инкубации с белком YB-1. Изменения клеточного ответа оценивали по уровню экспрессии мРНК целевых молекул методом количественного ПЦР-анализа, совмещенного с обратной транскрипцией. Специфические олигонуклеотиды, используемые для амплификации фрагментов целевых молекул, приведены в табл. 1.

На первоначальном этапе мы оценивали влияние предварительной инкубации с белком YB-1 на индуцированную GMDP, LPS и их смесью GMDP/LPS экспрессию мРНК провоспалительных цитокинов IL-1β, TNF-α и IL-6 (рис. 1). Как можно видеть из приведенных на рис. 1 результатов, под действием YB-1 значительно сокращался синтез мРНК всех анализируемых цитокинов, единственным исключением была почти неизменявшаяся продукция TNF-α при стимуляции смесью GMDP/LPS.

Далее нам представлялось интересным оценить влияние YB-1 на продукцию ряда молекул, связанных с сигнальными путями рецепторов врожденного иммунитета NOD2 и TLR4. В данной работе мы анализировали уровень экспрессии собственно NOD2, адаптерных молекул рецепторов врожденного иммунитета RIP2 и

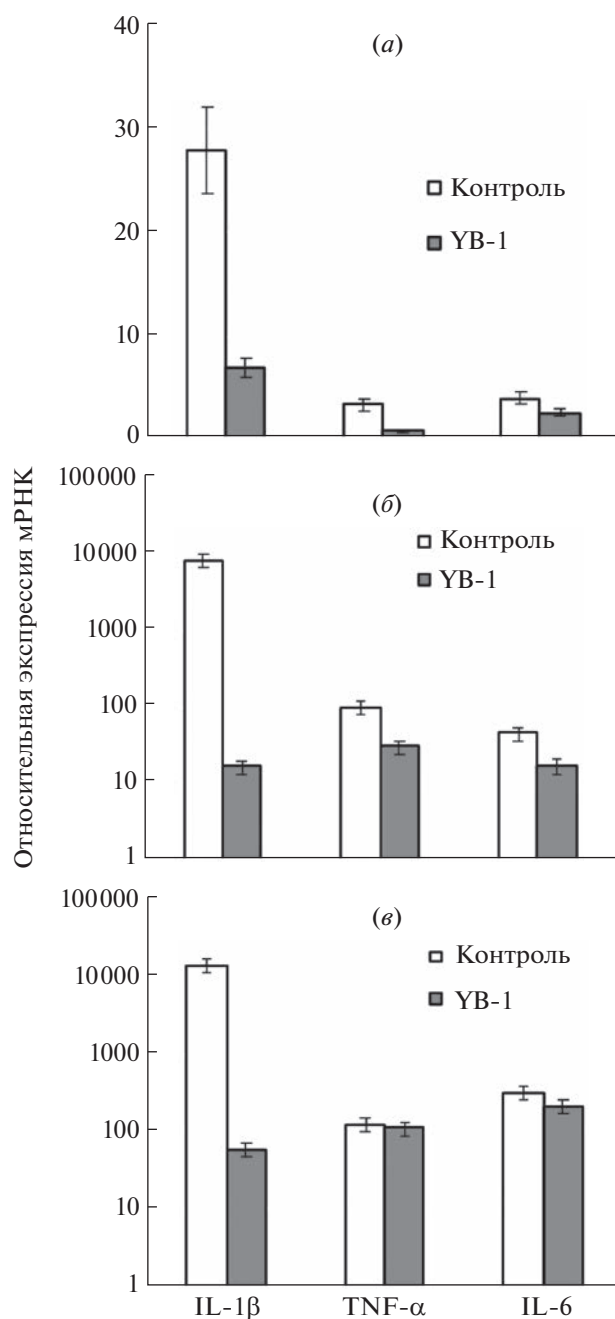


Рис. 1. Относительные уровни экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 в клетках мышей линии J774, предварительно инкубированных с белком YB-1 и стимулированных GMDP (a), LPS (б) и GMDP/LPS (в).

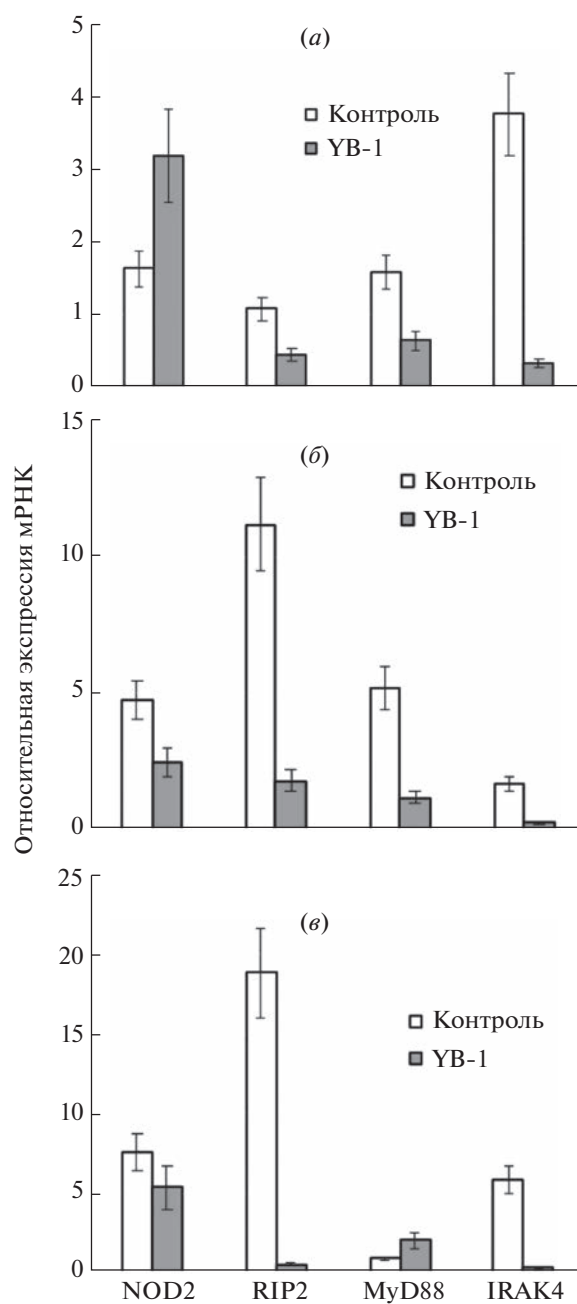


Рис. 2. Относительные уровни экспрессии мРНК рецептора NOD2, адаптерных молекул RIP2 и MyD88, а также киназы IRAK4 в клетках мышей линии J774, предварительно инкубированных с белком YB-1 и стимулированных GMDP (a), LPS (б) и GMDP/LPS (в).

MyD88, IRAK4 (interleukin-1 receptor-associated kinase) (рис. 2) и субъединиц p105/p50 (NF- κ B1), p100/p52 (NF- κ B2), RelA и c-Rel транскрипционного комплекса NF- κ B (рис. 3). Как показывают наши результаты, в присутствии YB-1 существенно менялся уровень экспрессии всех проанализированных молекул. В подавляющем большинстве случаев наблюдалось снижение синтеза их мРНК, что

действительно свидетельствует об угнетении активации иммунного ответа. Усиление экспрессии можно было видеть только для NOD2-рецептора при стимуляции GMDP и для субъединицы p100/p52 транскрипционного комплекса NF- κ B.

Далее для характеристики механизмов, ответственных за развитие состояния толерантности, мы проанализировали продукцию мРНК проти-

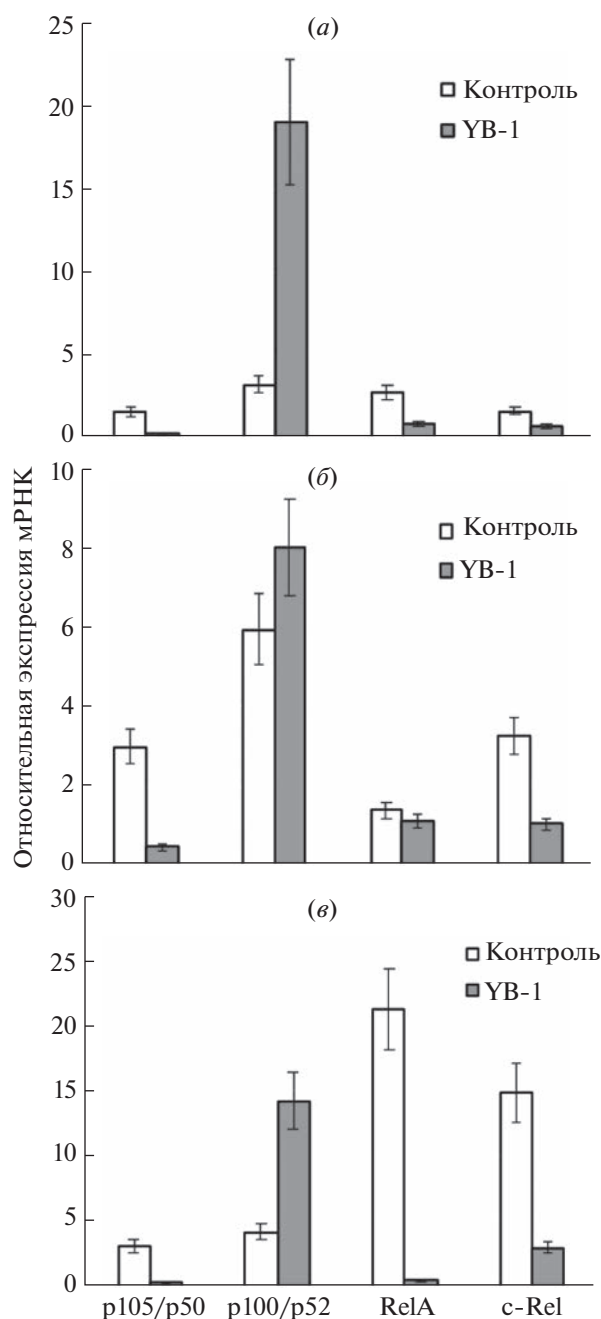


Рис. 3. Относительные уровни экспрессии мРНК субъединиц p105/p50, p100/p52, RelA и c-Rel фактора транскрипции NF-κB в клетках мышей линии J774, предварительно инкубированных с белком YB-1 и стимулированных GMDP (a), LPS (б) и GMDP/LPS (в).

вовоспалительных цитокинов IL-10, которая оставалась практически неизменной, хотя сам по себе YB-1 стимулирует синтез IL-10 [20], и IL-1Ra, уровень которой значительно возрастал при рестимуляции клеток GMDP, LPS и GMDP/LPS (рис. 4).

Как уже говорилось выше, состояние “неответственности” клеток связано с активностью ингиби-

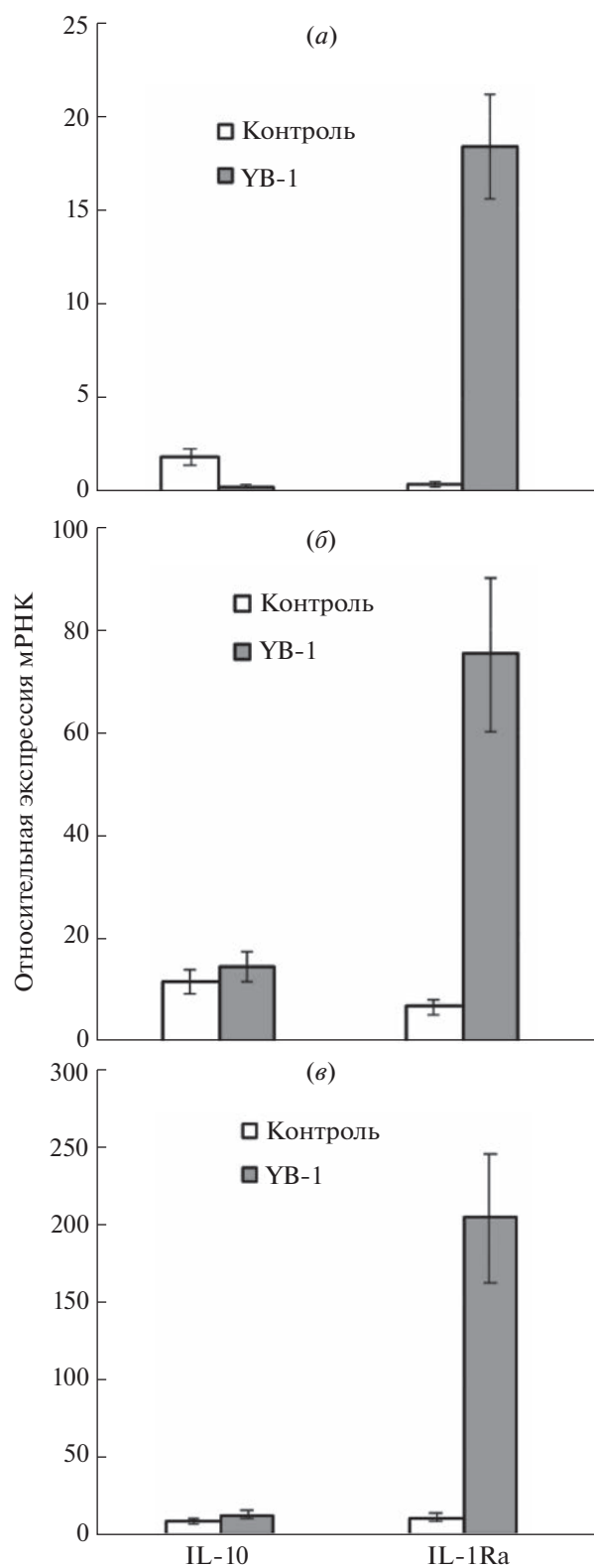


Рис. 4. Относительные уровни экспрессии мРНК противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-1Ra в клетках мышей линии J774, предварительно инкубированных с белком YB-1 и стимулированных GMDP (a), LPS (б) и GMDP/LPS (в).

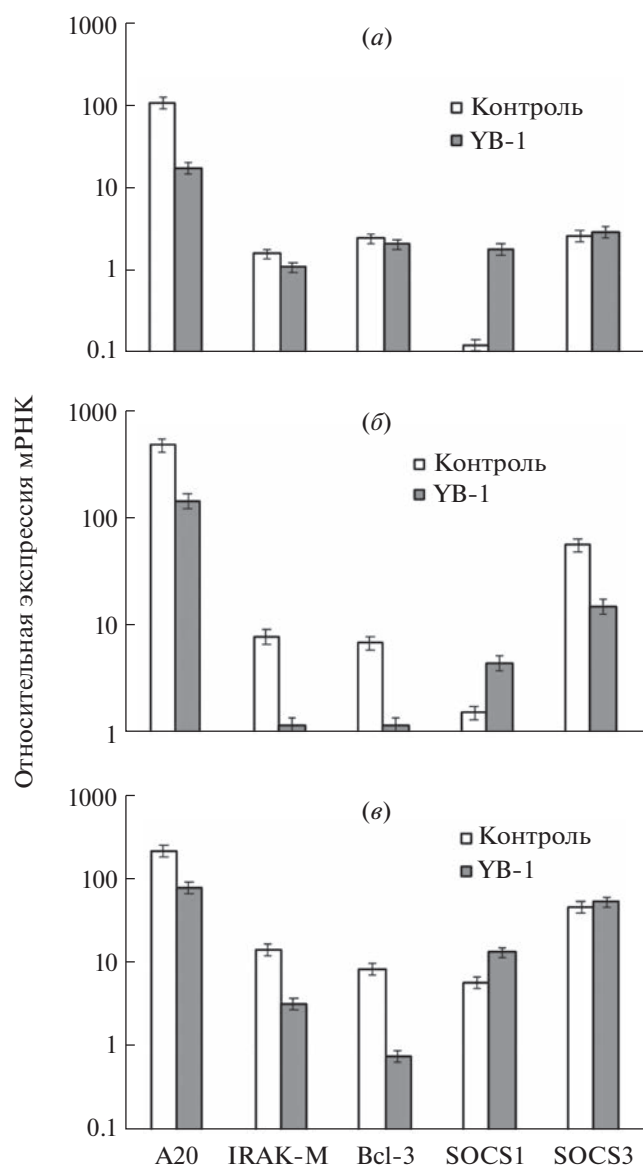


Рис. 5. Относительные уровни экспрессии мРНК ингибиторов в сигнальных путях рецепторов врожденного иммунитета A20, IRAK-M, Bcl-3, SOCS1 и SOCS3 в клетках мышей линии J774, предварительно инкубированных с белком YB-1 и стимулированных GMDP (a), LPS (б) и GMDP/LPS (в).

торных молекул клеточных сигнальных путей от рецепторов врожденного иммунитета. В данной работе мы определяли изменение экспрессии мРНК ингибиторов A20, IRAK-M, Bcl-3, SOCS1 и SOCS3, ассоциированных с развитием толерантности под действием MDP и LPS [10, 21, 22] (рис. 5). Мы обнаружили, что предварительная инкубация с YB-1 повышала только уровень мРНК ингибитора SOCS1.

В целом полученные нами результаты показывают, что фактор транскрипции YB-1 участвует в процессе формирования сигнала от рецепторов

врожденного иммунитета и способен индуцировать толерантность к иммуностимуляторам, таким как GMDP и LPS, по крайней мере частично, за счет усиления продукции IL-1Ra и SOCS1. Более точная характеристика особенностей индуцированного YB-1 иммунного ответа требует дальнейшего изучения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В работе использовали GMDP (ЗАО "Пептек", Россия) и LPS (*E. coli* serotype 055:B5; Sigma, США); рекомбинантный белок YB-1 был экспрессирован в *E. coli* и очищен, как описано ранее [23].

Клетки. Работа выполнена на клеточной линии макрофагов мыши J774, полученной из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной фетальной сыворотки, при 37°C и 5% CO₂.

Для проведения эксперимента клетки вносили в лунки 6-луночного планшета в концентрации 3×10^6 клеток в 3 мл среды на лунку. К клеткам добавляли YB-1 в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали клетки в течение 4 ч, далее к клеткам добавляли GMDP в концентрации 10 мкг/мл и/или LPS в концентрации 0.1 мкг/мл и выдерживали еще в течение 2 ч.

ПЦР. Выделение тотальной РНК из клеток J774 проводили реагентом TRIzol® (Invitrogen, США) по протоколу фирмы-производителя.

Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием фермента Mint (Евроген, Россия) и поли(Т)-праймера по стандартному протоколу фирмы-производителя.

ПЦР проводили в термоциклере CX96 (Bio-Rad, США). Реакционная смесь объемом 12.5 мкл содержала 1 мкг кДНК, 2.5 мкл готовой 5× реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), в которую входят Taq ДНК-полимераза со специфическими моноклональными антителами, краситель SYBR Green I, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов, MgCl₂, ПЦР-буфер, и по 10 пМ каждого из двух специфических олигонуклеотидов (последовательности олигонуклеотидов приведены в табл. 1).

Протокол амплификации включал следующие этапы: 1 цикл 94°C — 4 мин (денатурация); 40 циклов: 94°C — 20 с (денатурация цепей ДНК), 60°C — 20 с (отжиг праймеров с матрицей), 72°C — 40 с (синтез комплементарных цепей ДНК); 1 цикл 72°C — 3 мин (завершающий синтез).

Относительный уровень мРНК целевых генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta CT}$ [24]. Относительную концентрацию субстрата нормализовали по

усредненным данным амплификации двух эндо-
генных генов сравнения — *HPRT1* и *B2M*:

$$\Delta\Delta CT = (CT_{\text{target gene}} - CT_{\text{reference gene}})_{\text{exp}} - \\ - (CT_{\text{target gene}} - CT_{\text{reference gene}})_{\text{contr}},$$

где CT — количество циклов, требуемых для достижения порогового значения флуоресценции. Относительный уровень мРНК вычисляли как $2^{-\Delta\Delta CT}$. Все реакции проводили в трех повторностях и включали отрицательный контроль без обратной транскриптазы. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые предпринята попытка охарактеризовать иммунологические механизмы, ответственные за индукцию состояния толерантности белком холодового шока $\gamma B-1$ в макрофагальных клетках мыши. Полученные нами результаты показывают, что фактор транскрипции $\gamma B-1$ участвует в процессе формирования сигнала от рецепторов врожденного иммунитета и способен индуцировать толерантность к иммуностимуляторам, таким как GMDP и LPS, по крайней мере частично, за счет усиления продукции противовоспалительного цитокина IL-1Ra и ингибитора SOCS1. Более точная характеристика особенностей индуцированного $\gamma B-1$ состояния толерантности ответа требует дальнейшего изучения.

Знание точных молекулярных механизмов функционирования системы врожденного иммунитета будет способствовать созданию вакцин нового поколения, развитию терапевтических подходов к лечению иммунодефицитных состояний и в случаях “чрезмерного” воспаления при аутоиммунных заболеваниях и сепсисе.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-01152a).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindquist J.A., Mertens P.R. // Cell Commun. Signal. 2018. V. 16. P. 63. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0274-6>
2. Laman A.G., Lathe R., Shepelyakovskaya A.O., Gartseva A., Brovko F.A., Guryanova S.V., Alekseeva L.G., Meshcheryakova E.A., Ivanov V.T. // Innate Immun. 2016. V. 22. P. 666–673. <https://doi.org/10.1177/1753425916668982>
3. Laman A.G., Lathe R., Savinov G.V., Shepelyakovskaya A.O., Bozhev Kh.M., Baidakova L.K., Chulin A.N., Brovko F.A., Svirshcheyevskaya E.V., Kotelevtsev Y., Eliseeva I.A., Guryanov S.G., Lyabin D.N., Ovchinnikov L.P., Ivanov V.T. // FEBS Lett. 2015. V. 589. P. 1819–1824. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.028>
4. Weichart D., Gobom J., Klopffleisch S., Häslér R., Gustavsson N., Billmann S., Lehrach H., Seegert D., Schreiber S., Rosenstiel P. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 2380–2389. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505986200>
5. Алексеева Л.Г., Ламан А.Г., Шепеляковская А.О., Плеханова Н.С., Иванов В.Т. // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 404–411. [Alekseeva L.G., Plekhanova N.S., Ivanov V.T., Laman A.G., Shepelyakovskaya A.O. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 285–291.] <https://doi.org/10.1134/S1068162019040022>
6. Shepelyakovskaya A.O., Alekseeva L.G., Meshcheryakova E.A., Bozhev Kh., Tsirina A., Ivanov V.T., Brovko F.A., Kotelevtsev Y., Lathe R., Laman A.G. // bioRxiv preprint. 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.11.09.515841>
7. Hayden M.S., Ghosh S. // Cell. 2008. V. 132. P. 344–362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
8. Nomura F., Akashi S., Sakao Y., Sato S., Kawai T., Matsumoto M., Nakanishi K., Kimoto M., Miyake K., Takeda K., Akira S. // J. Immunol. 2000. V. 164. P. 3476–3479. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3476>
9. Mizel S.B., Snipes J.A. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 22414–22420. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201762200>
10. Hedl M., Li J., Cho J.H., Abraham C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 19440–19445. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706097104>
11. Meshcheryakova E., Guryanova S., Makarov E., Alekseeva L., Andronova T., Ivanov V. // Int. Immunopharmacol. 2001. V. 9–10. P. 1857–1865. [https://doi.org/10.1016/s1567-5769\(01\)00111-4](https://doi.org/10.1016/s1567-5769(01)00111-4)
12. O'Brien G.C., Wang J.H., Redmond H.P. // J. Immunol. 2005. V. 174. P. 1020–1026. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.2.1020>
13. Huber R., Bikker R., Welz B., Christmann M., Brand K. // J. Immunol. Res. 2017. P. 9570129. <https://doi.org/10.1155/2017/9570129>
14. Aneja R., Odoms K., Dunsmore K., Shanley T.P., Wong H.R. // J. Immunol. 2006. V. 177. P. 7184–7192. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7184>
15. Coveney A.P., Wang W., Kelly J., Liu J.H., Blankson S., Wu Q.D., Redmond H.P., Wang J.H. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 13694. <https://doi.org/10.1038/srep13694>

16. *Bolhassani A., Rafati S.* // *Exp. Rev. Vaccines*. 2008. V. 8. P. 1185–1199.
<https://doi.org/10.1586/14760584.7.8.1185>
17. *Hsu J.H., Yang R.C., Lin S.J., Liou S.F., Dai Z.K., Yeh J.L., Wu J.R.* // *Shock*. 2014. V. 42. P. 540–547.
<https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000254>
18. *Butcher S.K., O'Carroll C.E., Wells C.A., Carmody R.J.* // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 933.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00933>
19. *Fritz J.H., Girardin S.E., Fitting C., Werts C., Mengin-Lecreulx D., Caroff M., Cavaillon J.M., Philpott D.J., Adib-Conquy M.* // *Eur. J. Immunol.* 2005. V. 35. P. 2459–2470.
<https://doi.org/10.1002/eji.200526286>
20. *Wang J., Djudjaj S., Gibbert L., Lennartz V., Breitkopf D.M., Rauen T., Hermert D., Martin I.V., Boor P., Braun G.S., Floege J., Ostendorf T., Raffetseder U.* // *J. Cell. Mol. Med.* 2017. V. 12. P. 3494–3505.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.13260>
21. *Hu J., Wang G., Liu X., Zhou L., Jiang M., Yang L.* // *PLoS One*. 2014. V. 9. e87528.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087528>
22. *Xiong Y., Medvedev A.E.* // *J. Leukoc. Biol.* 2011. V. 90. P. 1141–1148.
<https://doi.org/10.1189/jlb.0611273>
23. *Savinov G.V., Shepelyakovskaya A.O., Boziev Kh.M., Brovko F.A., Laman A.G.* // *Biochemistry (Moscow)*. 2014. V. 79. P. 131–138.
<https://doi.org/10.1134/S0006297914020060>
24. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* // *Methods*. 2001. V. 25. P. 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Extracellular Cold Shock Protein YB-1 Induces Tolerance to GMDP and LPS in Mouse Macrophage Cell Line J774

L. G. Alekseeva^{*, #}, **A. G. Laman^{**}**, E. A. Meshcherykova^{*}, A. O. Shepelyakovskaya^{**},
F. A. Brovko^{**}, and **V. T. Ivanov^{*}**

[#]Phone: +7 (495) 335-61-77; e-mail: luda.alekseeva@mail.ru

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

^{**}*Branch of Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
prosp. Nauki 6, Pushchino, 142290 Russia*

Cold shock protein YB-1 is involved in the regulation of a huge number of fundamental biological processes. Previously, we showed that YB-1 is also involved in the process of recognition of muramylpeptide GMDP by the innate immune receptor NOD2 and is able upon preliminary administration to protect mice from death in a model of septic shock induced by *Escherichia coli* bacteria. We hypothesized that its protective effect may be associated with the development of a state of tolerance (“nonresponsiveness”). Changes in the cellular response were assessed by the level of mRNA expression of the target molecules by quantitative PCR analysis combined with reverse transcription. We tested the possibility of tolerance induction by the YB-1 protein in a model system on the J774 mouse macrophage cell line with the participation of *E. coli* bacterial cell wall components, immunostimulants GMDP (NOD2 receptor agonist) and LPS (TLR4 receptor agonist). Pre-treatment of cells with YB-1 resulted in a significant decrease in the level of mRNA expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in response to further stimulation with GMDP and LPS, as well as significant changes in the expression of mRNA of RIP2 and MyD88 adapter molecules and components of transcriptional factor NF- κ B. Our data show that YB-1 is able to induce tolerance to such as GMDP and LPS immunostimulants, apparently by increasing the production of the anti-inflammatory cytokine IL-1Ra and the SOCS1 inhibitor. A more precise characterization of the features of the YB-1-induced tolerogenic immune response requires further research.

Keywords: innate immunity, GMDP, LPS, transcription factor YB-1, tolerance



СТРОЕНИЕ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ МОРСКОГО ОГУРЦА *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea*¹

© 2023 г. М. И. Билан*, А. С. Дмитренко*, С. П. Никогосова*, Е. А. Цветкова*, Н. Е. Устюжанина*, Cao Thi Thuy Hang**, Pham Duc Thinh**, Dinh Thanh Trung**, Tran Thi Thanh Van**, А. И. Усов*, Н. Э. Нифантьев*,#

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

**NhaTrang Institute of Technology Research and Application, Vietnam Academy of Science and Technology,
02 Hung Vuong Street, Nhatrang, 650000 Socialist Republic of Vietnam

Поступила в редакцию 20.01.2023 г.

После доработки 05.02.2023 г.

Принята к публикации 09.02.2023 г.

Фукозилированный хондроитинсульфат **FCS-Hf** и препараты фукансульфатов **Hf-Fuc1** и **Hf-Fuc2** выделены из вьетнамской голотурии *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea*. Разделение полисахаридов проведено с помощью анионообменной хроматографии на DEAE-сефацелле. Строение полисахаридов установлено по данным количественного определения содержания моносахаридов и сульфата, а также по спектрам ЯМР. Показано, что молекулы **FCS-Hf** построены из повторяющихся трисахаридных фрагментов, причем чередующиеся остатки 3-связанного *N*-ацетил-β-D-галактозамина и 4-связанной β-D-глюкуроновой кислоты образуют главную цепь полимера, которая несет боковые ответвления в виде остатков α-L-фукозы, присоединенных к ОЗ глюкуроновой кислоты. Регулярная структура полимера замаскирована неравномерным распределением сульфатных групп, присоединенных к остаткам фукозы (2,4-дисульфат, 3,4-дисульфат и 4-моносудульфат в соотношении 2 : 2 : 1) и остаткам галактозамина (4,6-дисульфат и 4-моносудульфат в соотношении 3 : 1). Показано также, что фукансульфат **Hf-Fuc1** содержит преимущественно линейные молекулы, построенные из 4-связанных остатков 3-сульфата α-L-фукозы, тогда как **Hf-Fuc2** представляет собой, по всей видимости, смесь из нескольких родственных фукансульфатов, содержащих линейные и разветвленные цепи из 3-связанных и 4-связанных остатков α-L-Fuc, которые сульфатированы в различных положениях.

Ключевые слова: *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea*, голотурия (морской огурец), полисахариды, фукозилированный хондроитинсульфат, фукансульфат

DOI: 10.31857/S0132342323040309, EDN: ODDRCN

ВВЕДЕНИЕ

Голотурии (морские огурцы, *Holothuroidea*) — это класс беспозвоночных, относящийся к типу иглокожих (*Echinodermata*). Животные широко распространены в водах Мирового океана и служат объектом крупномасштабного промысла, который вносит существенный вклад в экономику ряда приморских стран, особенно в Юго-Восточной Азии, где голотурии традиционно употребляются в пищу и могут находить медицинское применение [1]. Биомасса голотурий характеризуется уникальным химическим составом, причем наи-

большой интерес представляют сульфатированные полисахариды и тритерпеновые гликозиды. Эти метаболиты интенсивно исследуются благодаря присущей им разнообразной биологической активности [2].

Массивная стенка тела голотурий содержит два типа сульфатированных полисахаридов. Наиболее известны фукозилированные хондроитинсульфаты (FCS) [3], в основе молекул которых лежит линейная регулярная цепь, построенная из чередующихся остатков 3-связанного *N*-ацетил-β-D-галактозамина и 4-связанной β-D-глюкуроновой кислоты и, следовательно, совпадающая по структуре с хондроитином наземных организмов. В отличие от хондроитина, FCS содержат ответвления от главной цепи в виде остатков α-L-фукозы, присоединенной чаще всего в положение 3 остат-

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Вадима Тихоновича Иванова.

Сокращения: FCS — фукозилированные хондроитинсульфаты; FS — фукансульфаты; SP — сульфатированные полисахариды.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 135-87-84, эл. почта: nep@ioc.ac.ru).

ков глюкуроновой кислоты, и многочисленные сульфатные группы.

Регулярная структура углеводной части с трисахаридным повторяющимся звеном некоторое время считалась общей для FCS, выделяемых из разных видов голотурий [3], но более поздние исследования показали [4], что полисахариды разного происхождения могут иметь существенные структурные различия: остатки Fuc могут нести сульфатные группы во всех возможных положениях [5] и могут быть присоединены не только к О3 остатков GlcA, но также к GalNAc в положении О4 или О6 [6, 7].

Ответвления от главной цепи в FCS могут быть представлены не только единичными остатками Fuc, но и дисахаридами различного строения [8–11] и даже более длинными углеводными цепями [12], остатки GlcA не обязательно фукозилированы, но могут быть незамещенными [13] или сульфатированными по О3 [7, 14] и даже одновременно по О2 и О3 [15], тогда как остатки GalNAc обычно сульфатированы по О4 и/или О6 [5]. Таким образом, семейство FCS голотурий представляет собой большой набор полисахаридных структур, и с их структурными особенностями, несомненно, связаны различия в биологической активности [16–18].

Другая группа сульфатированных полисахаридов голотурий – фукансульфаты (FS), во многом подобные аналогичным полисахаридам из другого класса иглокожих, морских ежей Echinoidea, и фукоиданам из бурых водорослей Phaeophyceae [19]. Поскольку водорослевые фукоиданы легко доступны в больших количествах, они изучаются гораздо более интенсивно, чем FS голотурий, однако их более сложное строение (нерегулярные разветвленные молекулы, часто содержащие, кроме фукозы, остатки других моносахаридов) затрудняет установление надежных корреляций между структурой и биологической активностью.

В отличие от водорослевых полимеров, FS голотурий обычно состоят только из остатков фукозы и сульфата. Известны простые регулярные структуры, построенные из повторяющихся одинаковых моносульфатированных остатков фукозы $[-3)-\alpha\text{-L-Fuc2S-(1-)]}_n$, $[-4)-\alpha\text{-L-Fuc3S-(1-)]}_n$ и $[-4)-\alpha\text{-L-Fuc2S-(1-)]}_n$, выделенные, соответственно, из *Stichopus horrens* [20], *Holothuria fuscopunctata* [21] и *Thelenota ananas* [21]. Более сложные молекулы могут быть построены из олигосахаридных повторяющихся звеньев, причем FS, выделенные из разных видов голотурий, различаются размером этих звеньев, степенью сульфатирования, положением сульфатных групп, а также наличием или отсутствием разветвлений в каждом звене (подробный перечень известных структур

приведен в работах [22, 23]). Регулярный характер молекул FS позволяет надежно устанавливать их строение и использовать эти данные для выявления структурных особенностей, ответственных за проявление практически важных биологических свойств, таких как антикоагулянтная, противорвусная и многие другие активности [24–26].

Морская акватория Вьетнама – это богатый источник морских объектов, таких как голотурии, для химических исследований. Примером служит работа, в которой описаны выделение, структурный анализ и характеристика противопухоловой активности нового FS из *Stichopus variegatus* [27]. В нашем предыдущем сообщении [22] приведены данные о строении и антикоагулянтной активности полисахаридов, выделенных из двух вьетнамских голотурий *Bohadschia argus* и *Holothuria (Theelothuria) spinifera*. В предлагаемой статье, выполненной в продолжение этих исследований, сообщаются новые данные о сульфатированных полисахаридах голотурии *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea* (Jaeger, 1833) (обозначаемой далее *H. (S.) fuscocinerea*). Полисахаридный состав этого вида, довольно широко распространенного в тропических водах Мирового океана [28, 29], ранее не исследовался. Нами выделены и охарактеризованы по структуре препараты **FCS-Hf**, **Hf-Fuc1** и **Hf-Fuc2**, биологическая активность которых изучается в настоящее время.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из морского огурца *H. (S.) fuscocinerea*, собранного во Вьетнаме, были получены сульфатированные полисахариды. Смесь водорастворимых полисахаридов **SP** выделяли из стенки тела морских огурцов путем обычной солиubilизации в присутствии папаина, добавляемого для разрушения белков [14], с последующей обработкой экстракта бромидом гексадецилтриметиламмония для осаждения сульфатированных компонентов, которые затем превращали в водорастворимые натриевые соли [22].

Препарат **SP** фракционировали с помощью анионообменной хроматографии. Оказалось, что главная фракция препарата (**FS**) не сорбируется на DEAE-сефацелле и элюируется с колонки водой. Остальной материал элюировали растворами NaCl возрастающей концентрации. Фракцию, которая элюировалась 1.0 M NaCl и по составу соответствовала фукозилированному хондроитинсульфату, обозначали **FCS-Hf** и использовали для структурного анализа.

Невозможность разделения **FS** в условиях как ионообменной, так и гелпроникающей хроматографии можно объяснить тем, что этот биополимерный продукт образует не истинные, а

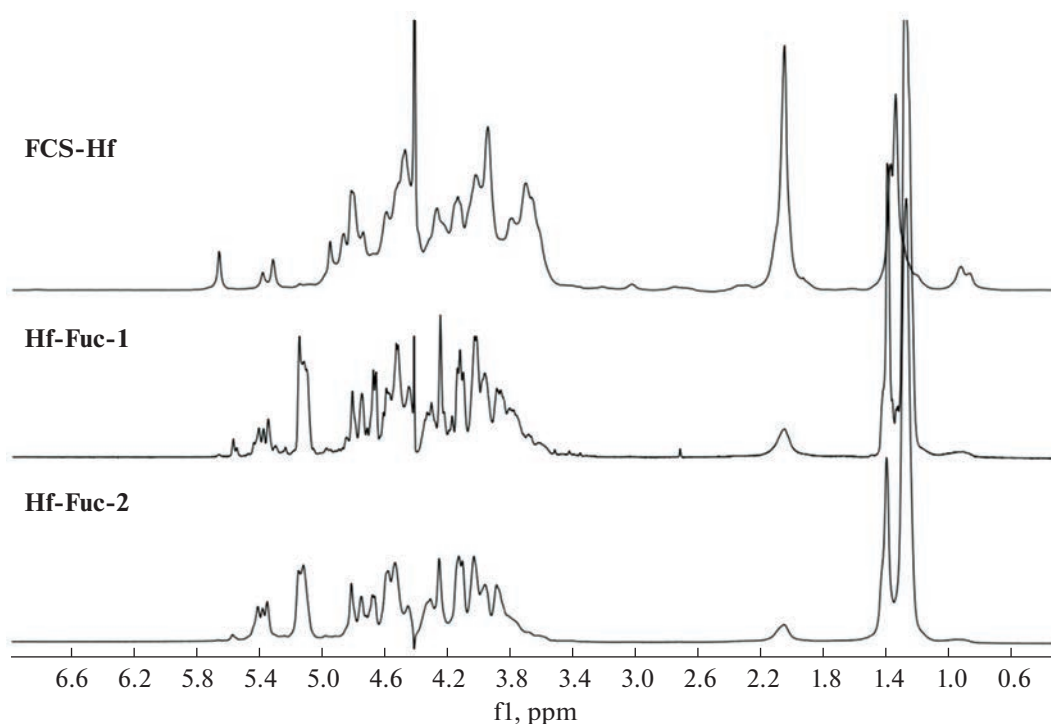


Рис. 1. Спектры ^1H -ЯМР сульфатированных полисахаридов, выделенных из морского огурца *H. (S.) fuscocinerea*.

коллоидные растворы, где присутствует в виде высокомолекулярных комплексов с белками и мультивалентными катионами. С подобным явлением, когда часть сульфатированных полисахаридов не сорбируется на ионообменных фазах и элюируется в виде фракции, вымываемой водой, уже сталкивались другие авторы, что упомянуто в ряде недавних работ [22, 23, 30, 31]. Интересно отметить, что такие комплексы образуют только FS, но не FCS. Таким образом, это, казалось бы, нежелательное явление позволяет, тем не менее, разделить FS и FCS, которые в отсутствие такого комплексообразования обладали бы одинаковой подвижностью при анионообменной хроматографии. Для разрушения комплекса фракцию FS подвергали кратковременному нагреванию с разбавленной HCl, после чего препарат можно было хроматографировать на колонке с DEAE-сефацелом, как описано выше. Две главные фракции, которые элюировались 1.0 и 1.5 M NaCl, соответствующие по составу фукансульфату, были обозначены **Hf-Fuc1** и **Hf-Fuc2** и использовались далее для установления их строения.

Детальную характеристику строения полисахаридов проводили с использованием спектроскопических методов ЯМР. Важно отметить, что одномерные спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР полисахаридов оказались малоинформативными (рис. 1 и 2). Характеристические сигналы в них соответствовали присутствию в структуре полисахаридов

определенных моносахаридных остатков. Так, наличие фукозы, галактозамина и уоновой кислоты в качестве основных моносахаридных компонентов в полисахариде **FCS-Hf** подтверждалось характеристическими значениями химических сдвигов C6 для Fuc (δ 17.3 м.д.) и GlcA (δ 176.3 м.д.), а также C2 для GalNAc (δ 52.7 м.д.) в спектре ^{13}C -ЯМР (рис. 2). Это подтвердило сделанное на основании результатов определения содержания моносахаридов и сульфата предположение о том, что биополимер **FCS-Hf** — это фукозилированный хондроитинсульфат. Полисахариды **Hf-Fuc1** и **Hf-Fuc2**, согласно анализу моносахаридного состава, были построены в основном из остатков фукозы. Это подтверждалось характеристическими значениями химических сдвигов C6 (δ 16.5–16.9 м.д.) и H6 (δ 1.28–1.40 м.д.) для Fuc в спектрах ^{13}C - и ^1H -ЯМР соответственно (рис. 1 и 2). Таким образом, полисахариды **Hf-Fuc1** и **Hf-Fuc2** действительно представляли собой две фракции фукансульфата, очевидно, различающиеся степенью сульфатирования.

Только детальная расшифровка двумерных спектров COSY, HSQC, TOCSY и ROESY позволила получить данные о типах гликозидных связей и положении сульфатных групп в исследуемых полисахаридах. На рис. 3 представлен пример расшифровки двумерного спектра ^1H - ^{13}C HSQC, полученного для полисахарида **FCS-Hf**.

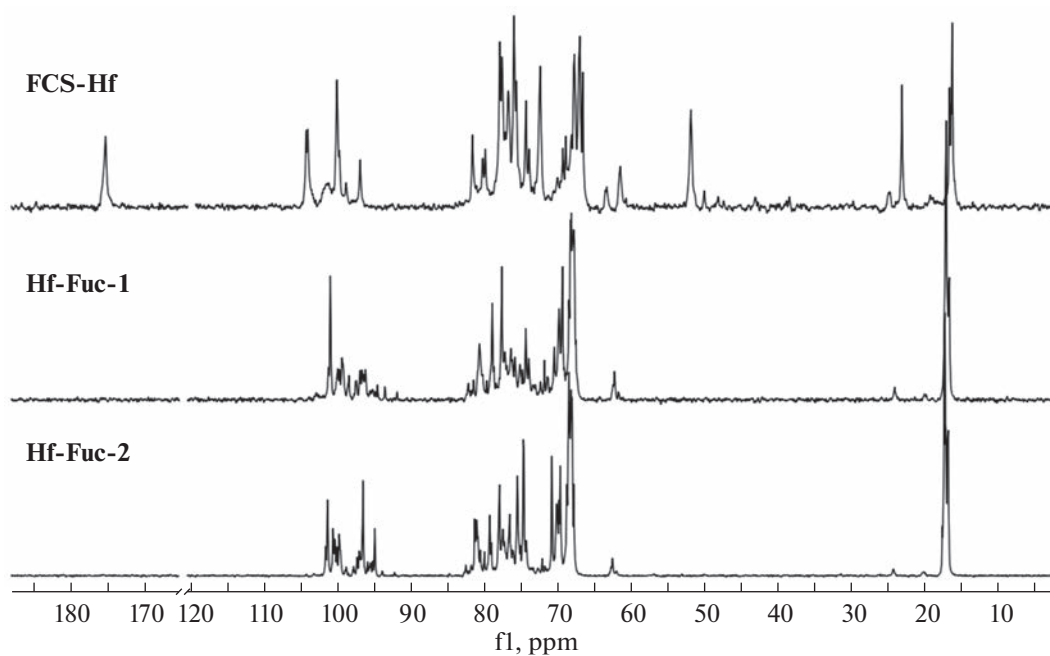


Рис. 2. Спектры ^{13}C -ЯМР сульфатированных полисахаридов, выделенных из морского огурца *H. (S.) fuscocinerea*.

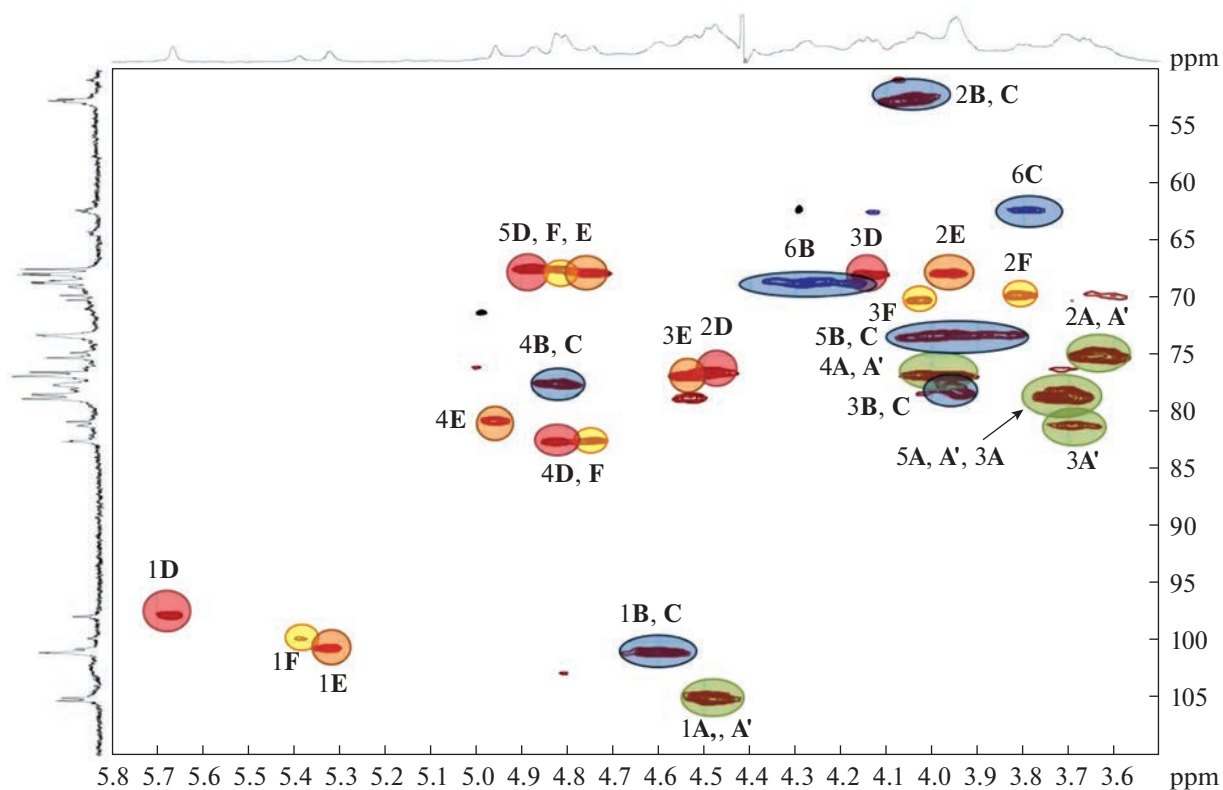


Рис. 3. Спектр ^1H - ^{13}C HSQC полисахарида FCS-Hf.

Таблица 1. Данные спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР (химические сдвиги, м.д.) полисахаридов **FCS-Hf** и **Hf-Fuc1**

	Остаток	H1 (C1)	H2 (C2)	H3 (C3)	H4 (C4)	H5 (C5)	H6 (C6)
A	$\rightarrow 4$)- β -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$	4.48 (105.0)	3.64 (75.0)	3.71 (78.2)	3.96 (76.6)	3.71 (78.2)	— (176.0)
A'	$\rightarrow 4$)- β -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$	4.48 (105.0)	3.60 (75.0)	3.68 (80.7)	4.00 (76.6)	3.71 (78.2)	— (176.0)
B	$\rightarrow 3$)- β -D-GalpNAc4S6S-(1 $\rightarrow$	4.58 (100.9)	4.07 (52.7)	3.95 (77.9)	4.81 (77.2)	4.00 (73.2)	4.33, 4.20 (68.5)
C	$\rightarrow 3$)- β -D-GalpNAc4S-(1 $\rightarrow$	4.58 (100.9)	4.07 (52.7)	3.95 (77.9)	4.81 (77.2)	4.02 (76.2)	3.81 (62.3)
D	α -L-Fucp2S4S-(1 $\rightarrow$	5.69 (97.7)	4.48 (76.6)	4.17 (67.8)	4.86 (82.5)	4.90 (67.5)	1.37 (16.9)
E	α -L-Fucp3S4S-(1 $\rightarrow$	5.34 (100.5)	3.95 (67.6)	4.53 (76.6)	5.01 (80.6)	4.85 (67.6)	1.37 (17.2)
F	α -L-Fucp4S-(1 $\rightarrow$	5.41 (99.6)	3.82 (69.7)	4.04 (70.0)	4.77 (82.4)	4.85 (67.6)	1.37 (17.2)
G	$\rightarrow 4$)- α -L-Fucp3S-(1 $\rightarrow$	5.15 (101.0)	4.14 (68.3)	4.67 (77.6)	4.26 (78.9)	4.53 (69.3)	1.40 (16.9)

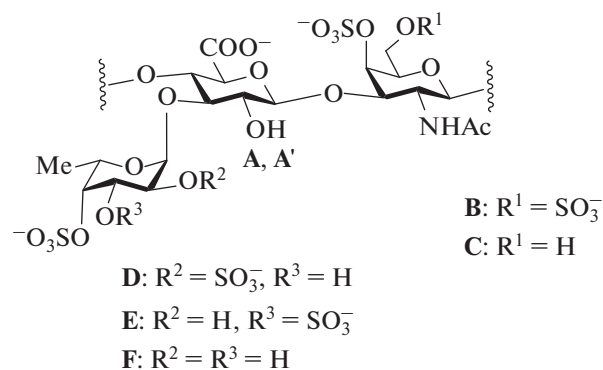
Примечание: полужирным шрифтом выделены сигналы, соответствующие положениям сульфатных групп.

Сигналы GlcA и GalNAc были аналогичны описанным ранее для других фукозилированных хондроитинсульфатов, основная цепь которых построена из звеньев $\rightarrow 3$)- β -D-GalNAc-(1 $\rightarrow 4$)- β -D-GlcA-(1 $\rightarrow$ [4, 32, 33] (табл. 1).

FCS из разных видов морских огурцов различаются положением сульфатных групп в фукозильных остатках [3, 4, 32, 33]. В случае **FCS-Hf** наблюдали три типа фукозильных ответвлений: **D**, **E** и **F** (рис. 4). По данным спектра HSQC, положения сигналов H1, отвечающих звеньям **D**, **E** и **F**, находятся при 5.69, 5.34 и 5.41 м.д. соответственно (рис. 3).

Дальнейшее отнесение сигналов в спиновых системах остатков **D**, **E** и **F** было выполнено с использованием данных спектра COSY (рис. 5а, табл. 1). Слабопольные сдвиги сигналов H2 (δ 4.48 м.д.) и H4 (δ 4.86 м.д.) свидетельствовали о наличии сульфатных групп при C2 и при C4 в остатке **D**. Для остатка **E** слабопольные сдвиги сигналов H3 (δ 4.53 м.д.) и H4 (δ 5.01 м.д.) свидетельствовали о сульфатировании положений 3 и 4. В остатке **F** содержится только одна сульфатная группа при C4 (δ H4 4.77 м.д.). Эти данные согласуются с результатами, полученными ранее для многих других FCS, несущих сульфатированные

фукозильные ответвления [4, 34, 35]. Соотношение остатков **D** : **E** : **F** было определено с использованием величин интегральных интенсивностей соответствующих сигналов H1 и составило 2 : 2 : 1. Анализ данных спектра ROESY позволил определить положение фукозильных ответвлений **D**, **E** и **F** (рис. 5б). Кросс-пики, соответствующие взаимодействию H1 (Fuc) — H3 (GlcA), однозначно свидетельствовали о присоединении фукозных заместителей к O3 остатков глюконовой кислоты.

**Рис. 4.** Строение повторяющегося звена полисахарида **FCS-Hf**.

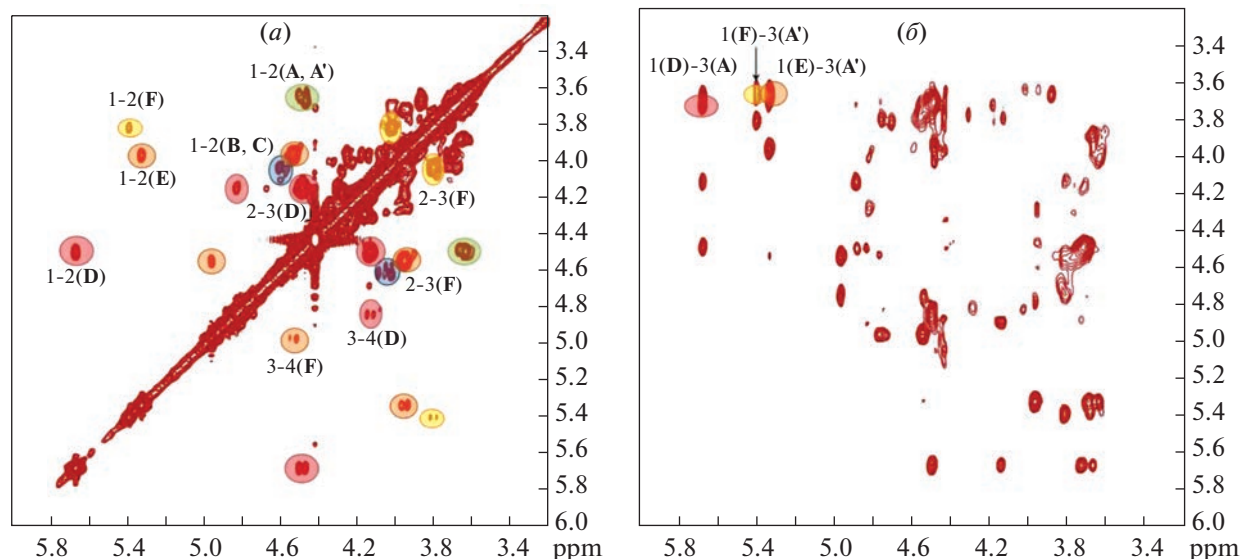


Рис. 5. Спектры ^1H - ^1H COSY (а) и ^1H - ^1H ROESY (б) полисахарида **FCS-Hf**.

По данным спектра HSQC, в структуре **FCS-Hf** присутствуют сульфатированные по положениям О4 остатки GalNAc, часть которых дополнительно сульфатирована по положениям О6 (кросс-пики 6В и 6С, рис. 3). Интегрирование интенсивностей соответствующих кросс-пиков позволило определить приблизительное соотношение между остатками **В** и **С** (рис. 4), которое составило 3 : 1.

Расшифровка двумерных спектров фукансульфатов **Hf-Fuc1** и **Hf-Fuc2** показала, что эти биополимеры существенно различаются по строению. Так, главным компонентом образца **Hf-Fuc1** оказался регулярный линейный полимер, построенный из повторяющихся 4-связанных фукозных остатков (**G**), несущих сульфатную группу при С3 (рис. 6а). Аналогичный полисахарид был выделен ранее из морских огурцов *Holothuria fuscopunctata* [21] и *Bohadschia argus* [22]. Спектры полисахарида **Hf-Fuc2** были достаточно сложны для детального анализа из-за перекрытия многих важных сигналов (рис. 6б). Эта сложность может быть объяснена наличием разветвлений и случайным

распределением сульфатов вдоль полимерных цепей, т.к. разветвление и сульфатирование в каждом положении вызывают изменение химических сдвигов не только в своем остатке, но и в соседних гликозилированных и гликозилирующих остатках. Тем не менее отнесение многих сигналов и соответствующих им корреляций в аномерной области спектров было предложено (табл. 2), исходя из предположения об одновременном присутствии двух типов полимеров, содержащих случайно сульфатированные повторяющиеся звенья, показанные на рис. 7.

Для предварительной оценки молекулярной массы полисахаридов проводили гель-электрофорез образцов **FCS-Hf**, **Hf-Fuc1** и **Hf-Fuc2** с использованием сульфатированных полисахаридов гепарина (Sigma, 15 кДа) и эноксапарина (Clexane®, Sanofi, 4.5 кДа) с определенной молекулярной массой в качестве стандартов (рис. 8). На основании подвижности образцов был сделан вывод, что молекулярная масса **FCS-Hf** выше, чем у гепарина, у **Hf-Fuc2** сопоставима с эноксапарином, а у **Hf-Fuc1** меньше, чем у эноксапарина.

Таблица 2. Данные спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР (аномерные сигналы, химические сдвиги, м.д.) отдельных звеньев полисахарида **Hf-Fuc2**

Остаток	$\text{H}_{3\text{S}} \rightarrow \text{J}_{2\text{S}4\text{S}} \rightarrow \text{H}_{3\text{S}}$	$\text{H}_{3\text{S}} \rightarrow \text{J}_{2\text{S}} \rightarrow \text{H}_{3\text{S}}$	$\text{J}_{2\text{S}} \rightarrow \text{H}_{3\text{S}}$	$\text{H}_{3\text{S}} \rightarrow \text{J}_{4\text{S}} \rightarrow \text{H}_{3\text{S}}$	$\text{J}_{2\text{S}} \rightarrow \text{H}_{3\text{S}} \rightarrow \text{J}_{4\text{S}}$	$\text{H}_{3\text{S}} \rightarrow \text{J}_{2\text{S}}$
С1	94.7	96.3	96.3	96.3	99.5	100.4
Н1	5.39	5.41	5.32	5.12	5.12	5.14

Примечание: полужирным шрифтом выделены моносахаридные остатки, для которых приведены химические сдвиги сигналов в ЯМР-спектрах.

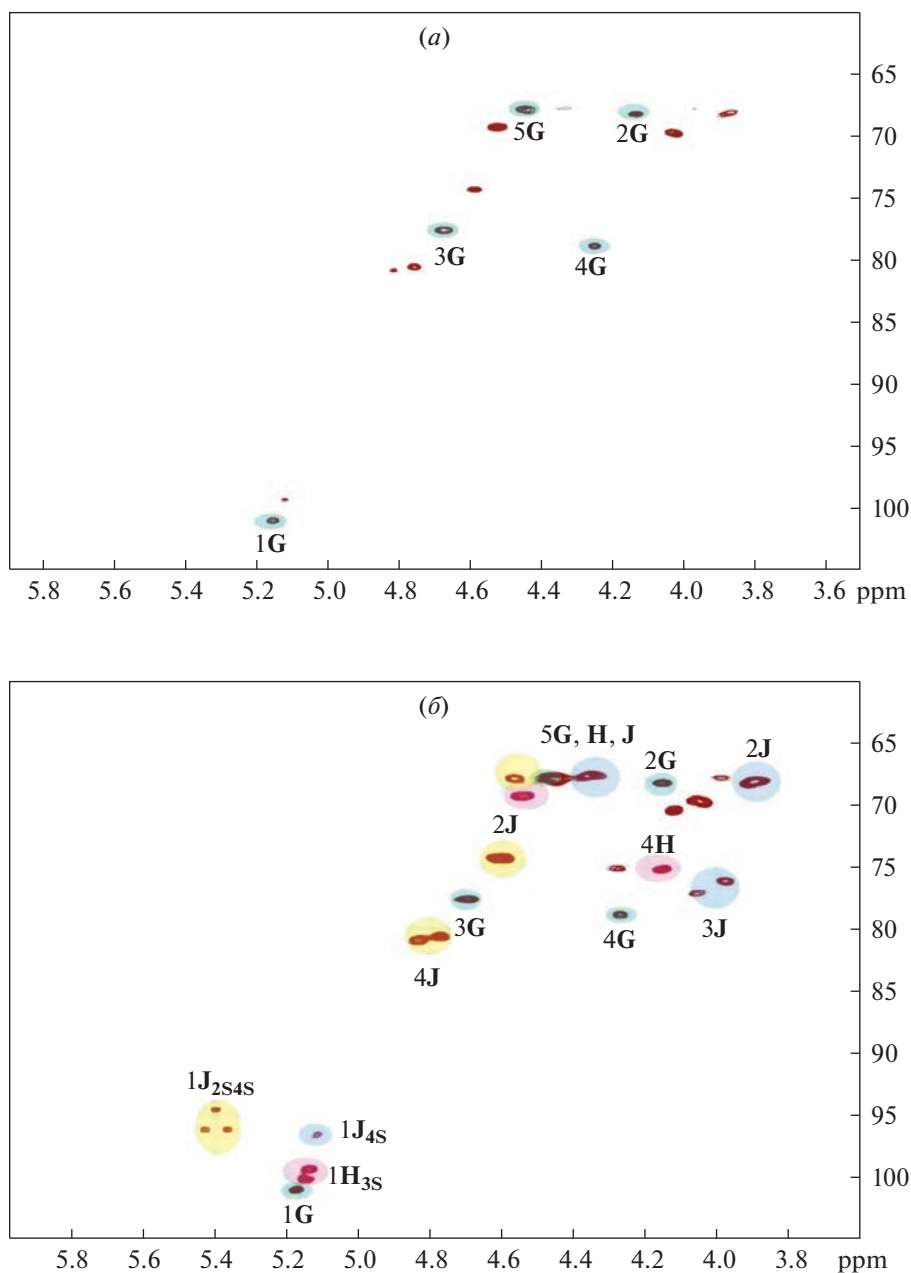


Рис. 6. Спектры ^1H - ^{13}C HSQC полисахаридов **Hf-Fuc1** (a) и **Hf-Fuc2** (б).

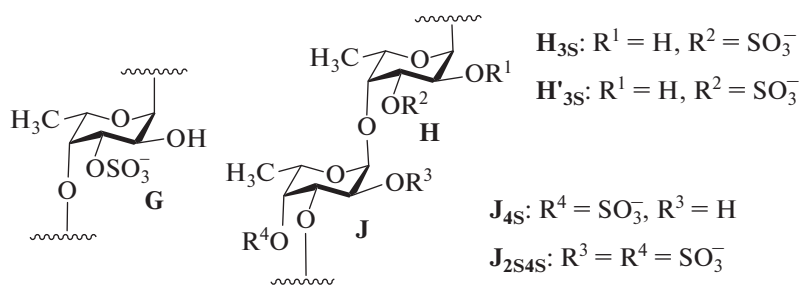


Рис. 7. Основные структурные фрагменты полисахаридов **Hf-Fuc1** (G) и **Hf-Fuc2** (G, J, H).

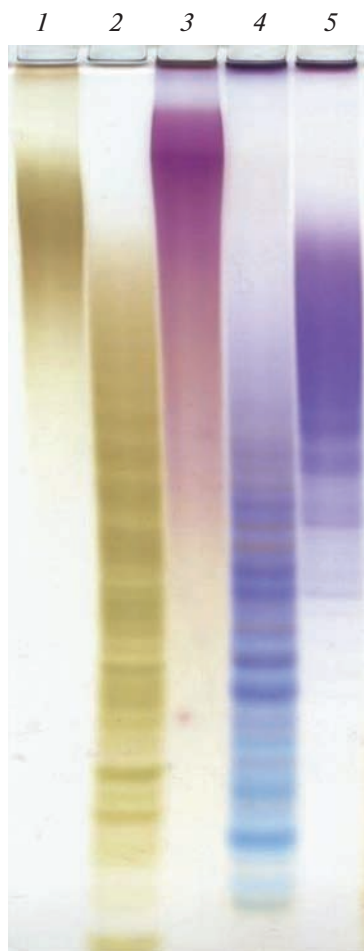


Рис. 8. Электрофорез в 20%-ном ПААГ образцов гепарина (1), эноксапарина (2), FCS-Hf (3), Hf-Fuc1 (4) и Hf-Fuc2 (5).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Общие методы. Методики определения содержания в полисахаридах нейтральных моносахаридов и аминсахаров с помощью ГЖХ [36, 37], уроновых кислот спектрофотометрическим методом по реакции с 3,5-диметилфенолом и серной кислотой [38] и сульфата методом турбидиметрии [36] описаны ранее.

Животные. Взрослые особи голотурии *H. (S.) fuscocinerea* были собраны в прибрежной зоне залива Нячанг (Вьетнам), помещены в морскую воду и доставлены в лабораторию в тот же день. После удаления внутренних органов стенки тела морских огурцов погружали в 96%-ный этанол, выдерживали 5 суток, после чего заливали ацетоном и оставляли на ночь. Далее материал измельчали и высушивали на воздухе.

Выделение полисахаридов. Согласно традиционной процедуре экстракции [14], препарат стенок тела морских огурцов (50 г) и папаин (10 г) в

1 л 0.1 М ацетатного буфера (pH 6.0), содержащего 5 мМ ЭДТА и 5 мМ хлоргидрата цистеина, инкубировали 24 ч при 60°C, после чего нагревали 20 мин на кипящей водяной бане для инактивации фермента, охлаждали и небольшой осадок отделяли центрифугированием. К супернатанту добавляли 10%-ный водный раствор бромид гексадецилтриметиламмония до полного осаждения сульфатированных полисахаридов. Смесь оставляли на ночь при 4°C, осадок отделяли центрифугированием, промывали водой, растворяли в смеси 2 М NaCl и этанола (4 : 1) и прибавляли 3 объема 96%-ного этанола. Смесь выдерживали 24 ч при 4°C, осадок отделяли, промывали этанолом, растворяли в воде, диализовали и лиофилизировали, получали суммарный препарат сульфатированных полисахаридов **SP** (выход 1.7 г), в составе которого обнаружили 20.9% фукозы и 3.6% уроновых кислот. Суспензию 300 мг **SP** в 60 мл воды перемешивали несколько часов при комнатной температуре, осадок (60 мг) отделяли центрифугированием, раствор наносили на колонку (3 × 10 см) с DEAE-сефацелом (Pharmacia, Швеция) в Cl⁻ форме, промывали водой и далее растворами NaCl возрастающей концентрации (0.5, 0.75, 1.0 и 1.5 М), каждый раз до отсутствия положительной реакции на углеводы с фенолом и серной кислотой [39]. Фракции обессоливали диализом или на колонке с сефадексом G-15 и лиофилизировали, выход фракций H₂O (далее обозначается **FS**) составил 100 мг (33.3%), 0.5 М — менее 5 мг, 0.75 М — 11 мг (3.7%), 1.0 М — 47 мг (15.7%) и 1.5 М — 16 мг (5.3%). Фракция 1.0 М по составу была близка к типичным FCS (мольные соотношения фукозы, галактозамина, уроновых кислот и сульфата 14 : 11 : 14 : 61 с небольшой примесью галактозы и глюкозамина) и исследовалась далее под названием **FCS-Hf**.

Кислотная обработка фракции FS. Фракцию (100 мг) растворяли в 30 мл 0.1 М HCl, нагревали 3 ч при 50°C, после охлаждения наносили на колонку с DEAE-сефацелом и хроматографировали, как описано выше. Получили две фракции, которые элюировались, соответственно, 1.0 М NaCl (**Hf-Fuc1**, выход 24 мг, состав: Fuc 48.9%, Gal 4.0%, SO₃Na 33.4%, уроновые кислоты 1.7%, следы аминсахаров) и 1.5 М NaCl (**Hf-Fuc2**, выход 20 мг, состав: Fuc 49.0%, Gal 2.6%, SO₃Na 36.9%, уроновые кислоты 0.7%, следы аминсахаров).

Спектроскопия ЯМР. Образец полисахарида (30 мг) растворяли в 99.9% D₂O и лиофилизировали, затем снова растворяли в 99.96% D₂O и помещали в ампулу. Спектры ЯМР получали при 60°C на ЯМР-спектрометре Avance II (Bruker, Германия) с частотой 600 МГц, оснащенном зондом Z-градиента с частотами протонов и углерода

600.13 и 150.90 МГц соответственно. В качестве внутреннего стандарта использовали 3-(триметилсилил)-3,3,2,2-тетрадейтеропропионовую кислоту (δH 0.0, δC 1.6). Одномерные спектры ^{13}C -ЯМР получали с использованием времени релаксации и регистрации 0.1 и 0.54 с соответственно, с накоплением 110 000 сканов. Перед преобразованием Фурье было применено экспоненциальное уширение линии 2 Гц. Двумерные спектры регистрировали и обрабатывали стандартными методами и пакетами Bruker. Спектры ^1H - ^1H корреляционной спектроскопии (COSY) записывали с шириной 4800×4800 Гц, 4 повторения, 512 приращений, с предварительным насыщением для подавления сигнала воды. Спектры полной корреляционной спектроскопии (TOCSY) записывали с шириной 4800×4800 Гц, 8 повторов, 256 приращений. Время спиновой блокировки в экспериментах TOCSY составляло 100 мс. Спектры с использованием эффекта Оверхаузера (ROESY) записывали с шириной 4800×4800 Гц, 32 повторения, 256 приращений, с предварительным насыщением для подавления сигнала воды. Время смещения в экспериментах ROESY составляло 200 мс. Спектры гетероядерной одиночной квантовой когерентности (HSQC) регистрировали с шириной 3000×15000 Гц, задержкой релаксации 1.5 с, 32 повторениями по 256 приращений.

Электрофорез. Растворы полисахаридов **FCS-Hf**, **Hf-Fuc1**, **Hf-Fuc2**, гепарина (Sigma, США) и эноксапарина (Clexane®, Sanofi, Франция) (по 15 мкг) в буфере (10 mM Tris-борат, pH 8.3, с 10% (w/v) глицерина) наносили на слой 20%-ного полиакриламида (ICN Biochemicals) толщиной 0.75 мм, приготовленного в 100 mM Tris-борате, pH 8.3. Электрофорез проводили при 400 В в буфере (100 mM Tris-борат, pH 8.3) в течение 1 ч. Гель окрашивали 0.003%-ным раствором Stains-all (Merck, Германия) в смеси формамид (Sigma, США)–изопропанол–вода (5 : 25 : 70) в течение ночи в темноте и обесцвечивали водой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из вьетнамской голотурии *H. (S.) fuscocinerea* выделена смесь сульфатированных полисахаридов, из которой с помощью анионообменной хроматографии был получен препарат фукозилированного хондроитинсульфата **FCS-Hf** и фракция **FS**, содержащая фукансульфат в виде высокомолекулярного комплекса, не способного сорбироваться на ионообменнике. После разложения этого комплекса мягкой кислотной обработкой и анионообменной хроматографии были получены два образца фукансульфата – **Hf-Fuc1** и **Hf-Fuc2**. Для установления строения полисахаридов использовали данные количественного определе-

ния моносахаридного состава и сульфата, а также спектры ЯМР. Показано, что **FCS-Hf** имеет довольно распространенную для FCS голотурий структуру углеводной части, которая содержит линейную цепь из чередующихся остатков 3-связанного *N*-ацетил- β -D-галактозамина и 4-связанной β -D-глюкуроновой кислоты, несущей ответвления в виде остатков α -L-фукозы, присоединенных в положение 3. Полисахариды с такой структурой углеводной части, выделенные из разных видов голотурий, могут различаться способом сульфатирования. В нашем случае сульфатные группы расположены в остатках фукозы (2,4-дисульфат, 3,4-дисульфат и 4-моноссульфат в соотношении 2 : 2 : 1) и галактозамина (4,6-дисульфат и 4-моноссульфат в соотношении 3 : 1). Число и положение сульфатных групп в FCS голотурий важны для проявления их биологической активности. Показано также, что **Hf-Fuc1** представляет собой в основном регулярный полимер, построенный из 4-связанных остатков 3-сульфата α -L-фукозы, тогда как **Hf-Fuc2** – это, по всей вероятности, смесь из нескольких FS, линейных и разветвленных, с разнообразным положением сульфатных групп. Хотя обычно считается, что именно характер сульфатирования определяет в первую очередь биологические свойства подобных полисахаридов, в нашей предыдущей статье был отмечен и такой неожиданный случай, как отсутствие антикоагулянтной активности у сульфатированного FS из голотурии *Bohadschia argus* [22]. Препараты, полученные в данной работе, предназначены для изучения их биологического действия, и эти результаты будут опубликованы отдельно.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 21-53-54004 Вьет_a) и Вьетнамской академии науки и технологии (грант KHCBB1.01/21-23).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Работа не содержит описания исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sea Cucumbers. A Global Review of Fisheries and Trade / Eds. Toral-Granda V., Lovatelli A., Vasconcellos M. Rome: FAO, 2008. 317 p.
2. Khotimchenko Y. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 1342. <https://doi.org/10.3390/ijms19051342>
3. Pomin V.H. // Mar. Drugs. 2014. V. 12. P. 232–254. <https://doi.org/10.3390/md12010232>
4. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Pure Appl. Chem. 2019. V. 91. P. 1065–1071. <https://doi.org/10.1515/pac-2018-1211>
5. Liu X., Zhang Z., Mao H., Wang P., Zuo Z., Gao L., Shi X., Yin R., Gao N., Zhao J. // Mar. Drugs. 2020. V. 18. P. 286. <https://doi.org/10.3390/md18060286>
6. Yang J., Wang Y., Jiang T., Lv Z. // Int. J. Biol. Macromol. 2015. V. 72. P. 911–918. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.010>
7. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Shashkov A.S., Kusaykin M.I., Stonik V.A., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Glycobiology. 2016. V. 26. P. 449–459. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv119>
8. Mao H., Cai Y., Li S., Sun H., Lin L., Pan Y., Yang W., He Z., Chen R., Zhou L., Wang W., Yin R., Zhao J. // Carbohydr. Polym. 2020. V. 245. P. 116503. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116503>
9. Li S., Zhong W., Pan Y., Lin L., Cai Y., Mao H., Zhang T., Li S., Chen R., Zhou L., Wang W., Cui Q., Yin R., Huang S., Zhao J. // Carbohydr. Polym. 2021. V. 269. P. 118290. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118290>
10. Yin R., Zhou L., Gao N., Lin L., Sun H., Chen D., Cai Y., Zuo Z., Hu K., Huang S., Liu J., Zhao J. // Biomacromolecules. 2021. V. 22. P. 1244–1255. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01739>
11. Yin R., Pan Y., Cai Y., Yang F., Gao N., Ruzemaimaiti D., Zhao J. // Carbohydr. Polym. 2022. V. 294. P. 119826. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119826>
12. Qiu P., Wu F., Yi L., Chen L., Jin Y., Ding X., Ouyang Y., Yao Y., Jiang Y., Zhang Z. // Carbohydr. Polym. 2020. V. 240. P. 116337. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116337>
13. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Panina E.G., Sanyan N.P., Dmitrenok A.S., Tsvetkova E.A., Ushakova N.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Mar. Drugs. 2018. V. 16. P. 389. <https://doi.org/10.3390/md16100389>
14. Vieira R.P., Mulloy B., Mourão P.A.S. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 13530–13536. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)92730-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)92730-4)
15. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Polym. 2017. V. 164. P. 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.034>
16. Li H., Yuan Q., Lv K., Ma H., Gao C., Liu Y., Zhang S., Zhao L. // Carbohydr. Polym. 2021. V. 251. P. 117034. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117034>
17. Ustyuzhanina N.E., Anisimova N.Y., Bilan M.I., Donenko F.V., Morozovich G.E., Yashunskiy D.V., Usov A.I., Siminyan N.G., Kirgisov K.I., Varfolomeeva S.R., Kiselevskiy M.V., Nifantiev N.E. // Pharmaceuticals. 2021. V. 14. P. 1074. <https://doi.org/10.3390/ph14111074>
18. Киселевский М.В., Анисимова Н.Ю., Билан М.И., Усов А.И., Устюжанина Н.Е., Петкевич А.А., Шубина И.Ж., Морозевич Г.Е., Нифантьев Н.Э. // Биоорг. химия. 2022. Т. 48. С. 633–647. [Kiselevskiy M.V., Anisimova N.Yu., Bilan M.I., Usov A.I., Ustyuzhanina N.E., Petkevich A.A., Shubina I.Zh., Morozovich G.E., Nifantiev N.E. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 39. P. 1109–1122.] <https://doi.org/10.1134/S1068162022060152>
19. Pereira M.S., Mulloy B., Mourão P.A.S. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 7656–7667. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.7656>
20. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Borodina E.Y., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Res. 2018. V. 456. P. 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.12.001>
21. Shang S., Mou R., Zhang Z., Gao N., Lin L., Li Z., Wu M., Zhao J. // Carbohydr. Polym. 2018. V. 195. P. 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.117>
22. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Tsvetkova E.A., Nikogosova S.P., Cao T.T.H., Pham D.T., Dinh T.T., Tran T.T.V., Shashkov A.S., Usov A.I., Nifantiev N.E. // Mar. Drugs. 2022. V. 20. P. 380. <https://doi.org/10.3390/md20060380>
23. Ning Z., Wang P., Zuo Z., Tao X., Gao L., Xu C., Wang Z., Wu B., Gao N., Zhao J. // Mar. Drugs. 2022. V. 20. P. 377. <https://doi.org/10.3390/md20060377>
24. Mourão P.A.S. // Mar. Drugs. 2015. V. 13. P. 2770–2784. <https://doi.org/10.3390/md13052770>
25. Fonseca R.J.C., Mourão P.A.S. // Mar. Drugs. 2021. V. 19. P. 425. <https://doi.org/10.3390/md19080425>
26. Lu W., Yang Z., Chen J., Wang D., Zhang Y. // Carbohydr. Polym. 2021. V. 272. P. 118526. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118526>
27. Pham D.T., Ly B.M., Usoltseva R.V., Shevchenko N.M., Rasin A.V., Anastayuk S.D., Malyarenko O.S., Zvyagintseva T.N., San P.T., Ermakova S.P. // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 117. P. 1101–1109. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.017>
28. Teo S., Ng C.S.L., Loh K.S. // Nat. Singapore. 2010. V. 3. P. 133–137.
29. Maya-Alvarado B., Calva-Benítez L.G., Granja-Fernández R., Pérez-López J., López-Pérez A. // Rev. Biol. Tropical. 2021. V. 69 (S1). P. 66–79. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69isuppl.1.46328>
30. Gao N., Chen R., Mou R., Xiang J., Zhou K., Li Z., Zhao J. // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 164. P. 3421–3428. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.150>
31. Ma Y., Gao N., Zuo Z., Li S., Zheng W., Shi X., Liu Q., Ma T., Yin R., Li X., Zhao J. // Int. J. Biol. Macromol. 2021. V. 186. P. 535–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.049>

32. Pomin V.H. // Carbohydr. Res. 2015. V. 413. P. 41–50.
https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.05.004
33. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Borodina E.Y., Stonik V.A., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Polym. 2017. V. 167. P. 20–26.
https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.101
34. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Res. 2019. V. 476. P. 8–11.
https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.02.008
35. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Anisimova N.Y., Dmitrenok A.S., Tsvetkova E.A., Kiselevskiy M.V., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Polym. 2022. V. 281. P. 119072.
https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.119072
36. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 719–730.
https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00053-8
37. Билан М.И., Захарова А.Н., Грачев А.А., Шапков А.С., Нифантьев Н.Э., Усов А.И. // Биоорг. химия. 2007. Т. 33. С. 44–53. [Bilan M.I., Zakharova A.N., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2007. V. 33. P. 38–46.]
https://doi.org/10.1134/S1068162007010049
38. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Bot. Mar. 1995. V. 38. P. 43–51.
https://doi.org/10.1515/botm.1995.38.1-6.43
39. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith, F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.
https://doi.org/10.1021/ac60111a017

The Structure of Sulfated Polysaccharides from the Sea Cucumber *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea*

M. I. Bilan*, A. S. Dmitrenok*, S. P. Nikogosova*, E. A. Tsvetkova*, N. E. Ustyuzhanina*,
Cao Thi Thuy Hang**, Pham Duc Thinh**, Dinh Thanh Trung**,
Tran Thi Thanh Van**, A. I. Usov*, and N. E. Nifantiev*,#

#Phone: +7 (499) 135-87-84; e-mail: nen@ioc.ac.ru

*Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect 47, Moscow, 119991 Russia

**NhaTrang Institute of Technology Research and Application, Vietnam Academy of Science and Technology,
02 Hung Vuong Street, Nhatrang, 650000 Socialist Republic of Vietnam

Fucosylated chondroitin sulfate **FCS-Hf** and preparations of fucan sulfates **Hf-Fuc1** and **Hf-Fuc2** were isolated from the Vietnamese sea cucumber *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea*. Separation of the polysaccharides was carried out using anion-exchange chromatography on DEAE-Sephacel. The structure of polysaccharides was established by determinations of the content of monosaccharides and sulfate, as well as by NMR spectra. It was shown that **FCS-Hf** was built of the repeating trisaccharide fragments, with alternating 3-linked *N*-acetyl- β -D-galactosamine and 4-linked β -D-glucuronic acid residues forming the main polymer chain, which carries α -L-fucose residues as side branches attached to O3 of glucuronic acid. The regular structure of polymer is masked by an uneven distribution of sulfate groups attached to fucose residues (2,4-disulfate, 3,4-disulfate and 4-monosulfate in a ratio of 2 : 2 : 1) and galactosamine residues (4,6-disulfate and 4-monosulfate in a ratio of 3 : 1). It was also shown that fucan sulfate **Hf-Fuc1** contained predominantly linear molecules built of 4-linked α -L-fucose 3-sulfate residues, while **Hf-Fuc2** appeared to be a mixture of several related linear and branched fucan sulfates containing 3-linked and 4-linked α -L-Fuc residues sulfated at different positions.

Keywords: *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea*, sea cucumber, polysaccharides, fucosylated chondroitin sulfate, fucan sulfate



РЕКОМБИНАНТНЫЙ SLURP-1 ИНГИБИРУЕТ РОСТ И МИГРАЦИЮ ГЛИОМЫ U251 MG В РЕЗУЛЬТАТЕ АРЕСТА КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И МОДУЛЯЦИИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ МАРК И АКТ¹

© 2023 г. М. А. Шулепко*, **, М. Л. Бычков**,
М. П. Кирпичников**, ***, Е. Н. Люкманова*, **, ***, #

*Шеньчжэньский МГУ-ППИ Университет, Китай, 518172, Провинция Гуандун,
Шэньчжэнь, р-он Лунган, Даюньсиньчэн, ул. Гоцзидасюэюань, 1

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

***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 30.11.2022 г.

После доработки 10.12.2022 г.

Принята к публикации 12.12.2022 г.

Рекомбинантный аналог белка SLURP-1 человека (rSLURP-1) эффективно ингибирует рост карцином, взаимодействуя с никотиновым ацетилхолиновым рецептором $\alpha 7$ -типа. Недавно мы показали, что rSLURP-1 также ингибирует рост глиом *in vitro*, однако механизм действия rSLURP-1 в глиомах не был изучен. В представленной работе мы выяснили, что rSLURP-1 избирательно ингибирует рост клеток глиомы U251 MG, но не нормальных астроцитов, а также тормозит миграцию клеток глиомы. Кроме того, rSLURP-1 тормозит прохождение клеточного цикла в фазе G2/M, но не вызывает апоптоз. Инкубация клеток U251 MG с rSLURP-1 приводит к ингибированию в них фосфорилирования киназ ERK, p38 MAPK и АКТ, активация которых способствует прогрессии глиом. При этом rSLURP-1 не влияет на активность киназы JNK. Таким образом, rSLURP-1 представляет собой эндогенный белок, перспективный для разработки на его основе препаратов для лечения не только карцином, но и глиом.

Ключевые слова: SLURP-1, *Lu6/uPAR*, *Lynx1*, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, рак, глиома

DOI: 10.31857/S0132342323040401, **EDN:** ODXOTP

ВВЕДЕНИЕ

Глиомы составляют более 80% опухолей головного мозга и состоят из астроцитов, олигодендроцитов, а также других типов клеток [1, 2]. Средняя выживаемость пациентов с глиомами составляет лишь 12–15 месяцев [2, 3]. Хирургическое удаление опухолей, а также химиотерапия показывают низкую эффективность [4], что опре-

деляет актуальность поиска новых молекулярных мишеней и действующих на них соединений для терапии глиом.

Одна из перспективных молекулярных мишеней для разработки новых противоопухолевых препаратов – никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR) [5, 6]. Рецепторы nAChR представляют собой лигандзависимые ионные каналы, которые активируются ацетилхолином и участвуют в регуляции многих жизненно важных процессов в центральной и периферической нервной системе [7], эпителиальных клетках и иммунной системе [8]. Подтип nAChR, состоящий из пяти одинаковых субъединиц $\alpha 7$ -типа ($\alpha 7$ -nAChR), вовлечен в процессы никотинзависимой онкогенной трансформации и прогрессии карцином [9]. Нарушение регуляции $\alpha 7$ -nAChR может приводить к активации митогенных сигнальных путей ERK/MEK и PI3K/АКТ/mTOR, ингибированию старения клеток и апоптоза, в

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Вадима Тихоновича Иванова.

Сокращения: АКТ – протеинкиназа В; ERK – внеклеточная сигнально-регулируемая киназа; JNK – киназа Jun; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор; NNN – *N*-нитрозонорникотин; NNK – 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанол; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; rSLURP-1 – рекомбинантный аналог белка SLURP-1 человека.

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

результате чего происходит стимуляция образования опухолей [10–12]. В соответствии с этим экспрессия гена *CHRNA7*, кодирующего $\alpha 7$ -субединицу nAChR, повышена в некоторых карциномах пациентов [13] и клеточных линиях глиом [14].

Некоторые эндогенные белки семейства Ly6/uPAR [15–17], такие как C4.4A, uPAR, Ly6D, Ly6E, Ly6H, Ly6K, Lynx1, SLURP-1 и PSCA, в настоящее время рассматриваются как биомаркеры развития различных опухолей [15, 18–27]. Один из таких белков человека — секретлируемый регулятор гомеостаза кератиноцитов SLURP-1 [28]. Экспрессия гена *SLURP1* снижается в клетках карциномы толстой кишки при их обработке никотином [29], в карциномах легкого курящих мужчин по сравнению со здоровыми тканями легкого [25], в первичных и метастазирующих меланомах [24], а также в кератиноцитах человека в результате онкогенной трансформации нитрозамином NNK и NNN, содержащимися в табаке [30]. В то же время повышенная концентрация эндогенного SLURP-1 в крови пациентов с раком поджелудочной железы коррелирует с лучшим прогнозом выживаемости пациентов после хирургического удаления первичной опухоли [26].

Рекомбинантный аналог белка SLURP-1 человека (rSLURP-1) ингибирует вызванные ацетилхолином токи через $\alpha 7$ -nAChR [31] и подавляет рост различных раковых клеток эпителиального происхождения [32–35]. Более того, rSLURP-1 снижает пролиферацию клеток аденокарциномы легкого A549 при их обработке никотином посредством взаимодействия с $\alpha 7$ -nAChR [34]. Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR вовлечен в антипролиферативную и антимиграционную активность rSLURP-1 в клетках A549 [34, 35].

Ранее мы показали, что помимо карцином rSLURP-1 ингибирует рост клеток глиом U251 MG и A172 с наномолярной эффективностью, при этом в клетках глиомы U251 MG активность rSLURP-1 была обусловлена взаимодействием с $\alpha 7$ -nAChR [14]. В данной работе мы изучили селективность действия препарата rSLURP-1 по отношению к глиомам U251 MG и нормальным астроцитам первичной линии, выявили наличие у rSLURP-1 антимиграционной активности, а также исследовали молекулярные и клеточные механизмы, обеспечивающие эффекты rSLURP-1 в клетках глиом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

rSLURP-1 подавляет рост глиомы U251 MG, но не действует на клетки нормальных астроцитов. Рекомбинантный SLURP-1 эффективно ингибирует рост клеток глиом U251 MG и A172, взаимодействуя с $\alpha 7$ -nAChR [14]. Сравнительный анализ выявил повышенную экспрессию гена *CHRNA7*,

кодирующего $\alpha 7$ -nAChR, в клетках U251 MG по сравнению с нормальными астроцитами [14]. Поскольку $\alpha 7$ -nAChR — основная мишень действия rSLURP-1 [31], мы предположили, что повышенная экспрессия $\alpha 7$ -nAChR в глиомах может определять специфичность действия rSLURP-1 на опухолевые клетки. Поэтому мы сравнили действие rSLURP-1 на клетки глиом U251 MG и на нормальные астроциты, выделенные из гиппокампа новорожденных крыс. Анализ жизнеспособности клеток при помощи МТТ-теста показал, что в отличие от клеток U251 MG, инкубация астроцитов с 1 мкМ rSLURP-1 в течение 72 ч не приводила к достоверному подавлению их роста (рис. 1). Таким образом, rSLURP-1 селективно действует на различные клетки глиом и не оказывает влияния на рост нормальных астроцитов.

Полученный результат согласуется с исследованиями, показавшими, что нормальные фибробласты легкого, демонстрирующие пониженную экспрессию $\alpha 7$ -nAChR по сравнению с аденокарциномой легкого A549 [34], менее чувствительны к rSLURP-1, чем клетки A549 [32, 33]. Таким образом, rSLURP-1 можно рассматривать как универсальный регулятор роста именно раковых клеток различного происхождения, а повышенный уровень экспрессии $\alpha 7$ -nAChR может служить показателем большей чувствительности опухолевых клеток к rSLURP-1.

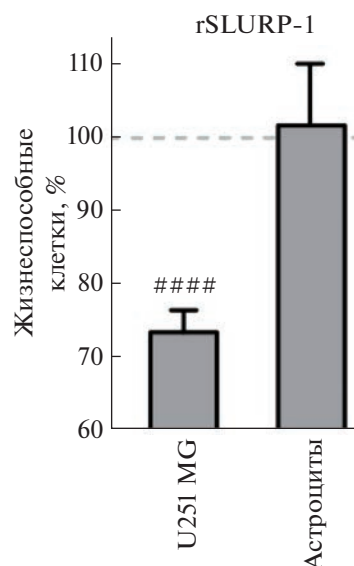


Рис. 1. Антипролиферативный эффект рекомбинантного белка rSLURP-1 на клетках глиомы U251 MG и нормальных астроцитах гиппокампа крысы. Клетки инкубировали с 1 мкМ rSLURP-1 в течение 72 ч. Данные приведены в процентах от контроля (необработанные клетки, пунктирная линия) $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$ для астроцитов, $n = 4$ для клеток U251 MG). #### $p < 0.0001$ (достоверное отличие от контроля согласно one-sample t -тесту).

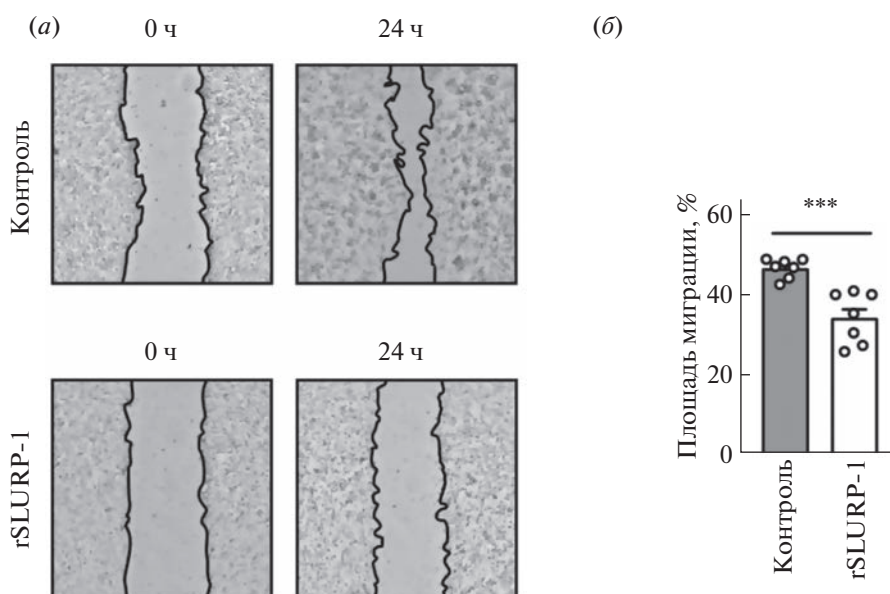


Рис. 2. Влияние рекомбинантного белка rSLURP-1 на миграцию клеток глиомы U251 MG. (а) — Репрезентативные изображения теста “заживление раны” для клеток U251 MG, инкубированных с 1 мкМ rSLURP-1 в течение 72 ч; (б) — площадь, занимаемая мигрирующими клетками U251 MG. Данные представлены в процентах от исходной поверхности, занятой мигрирующими клетками, $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 7$). *** $p < 0.001$ (достоверное отличие между группами по двустороннему t -тесту).

В то же время, возможно, избирательность rSLURP-1 связана не только с уровнем экспрессии проонкогенного рецептора $\alpha 7$ -nAChR, но и с вероятным образованием комплексов $\alpha 7$ -nAChR с другими проонкогенными рецепторами в раковых клетках, например, с рецепторами различных факторов роста [36]. Возможность действия лигандов $\alpha 7$ -nAChR через связанные с ним рецепторы обсуждалась давно, в частности мы показали, что мишень действия rSLURP-1 в клетках аденокарциномы легкого A549 — гетерокомплекс $\alpha 7$ -nAChR с рецептором эпидермального фактора роста EGFR и рецептором тромбоцитарного фактора роста PDGFR [35].

rSLURP-1 вызывает снижение миграции клеток глиомы U251 MG. SLURP-1 ингибирует миграцию раковых клеток поджелудочной железы [26], аденокарциномы легкого A549 [35] и клеток метастатической меланомы [37]. В настоящей работе с помощью теста на миграцию (тест на застывание раны, scratch assay) мы исследовали влияние rSLURP-1 на миграцию клеток глиомы U251 MG (рис. 2). Инкубация клеток U251 MG с 1 мкМ rSLURP-1 в течение 24 ч приводила к значительному снижению площади, занятой клетками, — на ~34% по сравнению с необработанными клетками. Таким образом, rSLURP-1 ингибирует миграцию не только раковых клеток эпителиального происхождения, но также и глиом. Ранее было показано, что активация $\alpha 7$ -nAChR никотином не приводит к усилению миграции клеток U251 MG, но увеличивает активность металлопротеазы MMP9 [38]. Таким об-

разом, возможно, ингибирование $\alpha 7$ -nAChR с помощью rSLURP-1 приводит к подавлению миграции раковых клеток также с участием MMP-9. Поскольку миграция — это процесс, тесно связанный с инвазивностью и метастазированием опухолей, ингибирование миграции при помощи rSLURP-1 дополнительно демонстрирует перспективность разработки на основе этого эндогенного белка препаратов для терапии глиом.

rSLURP-1 тормозит прохождение клеточного цикла в клетках глиомы U251 MG. Мы проанализировали влияние rSLURP-1 на прогрессию клеточного цикла в клетках глиомы U251 MG. Анализ с помощью проточной цитометрии показал, что в клетках U251 MG rSLURP-1 уменьшает количество клеток в фазе G1 (с ~67 до ~57%) и увеличивает количество клеток в фазе G2/M (с ~17 до ~27%) (рис. 3а, 3б), что указывает на торможение прохождения клеточного цикла в фазе G2/M. Мы не обнаружили характерного для апоптоза увеличения популяции клеток в фазе sub-G1 [39]. Анализ морфологии ядер также не выявил признаков апоптоза в клетках глиомы U251 MG (рис. 3в). Таким образом, rSLURP-1 в клетках глиомы U251 MG тормозит прохождение клеточного цикла, но не вызывает апоптоз. Это соответствует ранее полученным данным о том, что rSLURP-1 приводит к аресту клеточного цикла в клетках аденокарциномы легкого A549, не индуцируя при этом апоптоз [35]. Более того, полученные данные согласуются с влиянием на клеточный цикл в клетках A549 другого белка семейства Lu6/uPAR, также

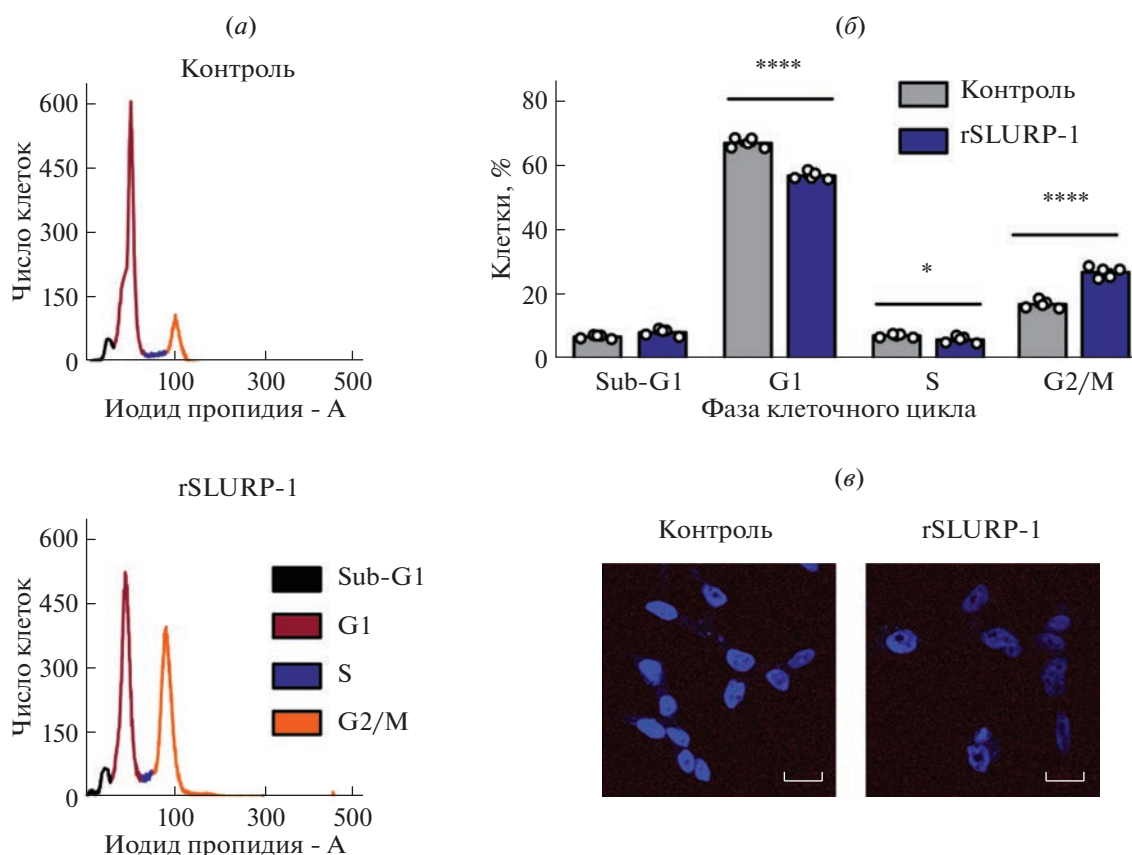


Рис. 3. Влияние рекомбинантного белка rSLURP-1 на клеточный цикл и морфологию ядер клеток глиомы U251 MG. (а) — Репрезентативное распределение популяции ядер клеток U251 MG, обработанных и не обработанных 1 мкМ rSLURP-1 в течение 72 ч; (б) — содержание клеток в различных фазах клеточного цикла. Данные представлены в процентах клеток в каждой фазе клеточного цикла $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 5$). * $p < 0.05$ и **** $p < 0.0001$ (достоверное отличие между группами по двустороннему t -тесту); (в) — анализ морфологии ядер клеток после инкубации с rSLURP-1 при их окрашивании Хехстом 33342 и иодидом пропидия (в канале иодида пропидия сигнала не было), масштабный отрезок — 10 мкм.

модулирующего работу $\alpha 7$ -nAChR в эпителиальных клетках, — Lynx1 [40]. Возможно, это указывает на существование общего молекулярного механизма торможения роста раковых клеток в результате ингибирования $\alpha 7$ -nAChR.

rSLURP-1 подавляет активацию киназ ERK, p38 MAPK и AKT, но не JNK, в клетках U251 MG. Мы проанализировали влияние rSLURP-1 на активность основных внутриклеточных сигнальных путей в клетках U251 MG, опосредующих прогрессию глиом и связанных с активностью $\alpha 7$ -nAChR [41–43]. Результаты анализа с помощью магнитных частиц Bio-Plex показали, что 72-часовая инкубация клеток глиомы с 1 мкМ rSLURP-1 приводила к достоверному снижению активности киназ ERK, p38 MAPK и AKT, но не JNK (рис. 4).

Ранее мы показали, что rSLURP-1 в клетках аденокарциномы легкого A549 модулирует передачу внутриклеточных сигналов через инозитол-1,4,5-трисфосфат (IP3) и сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR. Однако rSLURP-1 не влияет

на активность основного митогенного пути MEK/ERK и путей, ассоциированных с p38 MAPK и AKT [35]. При этом Lynx1 модулирует в клетках A549 внутриклеточные каскады, связанные с сигнальными путями PKC/IP3, MEK/ERK, p38 MAPK и JNK [40]. Сравнение полученных в настоящей работе данных с результатами предыдущих исследований позволяют сделать вывод, что арест клеточного цикла в фазе G2/M, наблюдаемый при инкубации раковых клеток с rSLURP-1 или Lynx1, может достигаться за счет разных молекулярных механизмов. Подавление активности киназ ERK, p38 MAPK и AKT опосредует арест клеточного цикла в клетках глиом, а в карциномах этот же процесс происходит за счет ингибирования других киназ.

Ранее нами на основе фрагмента петли I молекулы SLURP-1 был получен синтетический пептид, который ингибирует ток через $\alpha 7$ -nAChR и тормозит рост и миграцию клеток аденокарциномы легкого A549 [35]. Полученные в настоящей

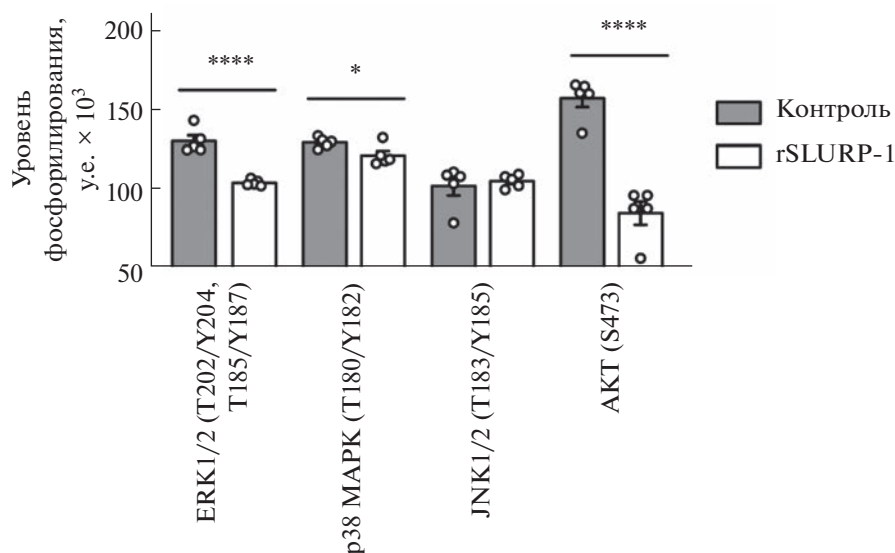


Рис. 4. Влияние рекомбинантного белка rSLURP-1 на активность основных митогенных сигнальных путей в клетках глиомы U251 MG. Клетки инкубировали с 1 мкМ rSLURP-1 в течение 72 ч и анализировали фосфорилирование киназ ERK, p38 MAPK, JNK и AKT посредством технологии MagPix (набор BioPlex Pro; Bio-Rad, США). Данные представлены в виде уровня фосфорилирования $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 5$). * $p < 0.05$ и **** $p < 0.0001$ (достоверное отличие между группами по двустороннему t -тесту).

работе данные указывают на необходимость дальнейших исследований противоопухолевого действия rSLURP-1 и его пептидного миметика в клетках глиом. Поскольку активация $\alpha 7$ -nAChR может способствовать прогрессии глиом [44, 45], применение ингибиторов данного рецептора может стать новой стратегией терапии этих злокачественных образований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток. Клетки глиомы U251 MG (НИИ цитологии РАН, Россия) культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Nuclease, Великобритания).

Животных содержали в стандартных условиях Питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Уникальная научная установка Био-модель ИБХ РАН; Биоресурсная коллекция “Коллекция лабораторных грызунов SPF-статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований”, соглашение № 075-15-2021-1067), имеющего международную аккредитацию AAALACi. Астроциты новорожденных крыс получали по описанной ранее методике [46] и культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Nuclease, Великобритания). Астроциты выращивали на пластике, обработанном поли-L-лизинном (ПанЭко, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂, пересевали минимум 2 раза в неделю.

Получение rSLURP-1. Рекомбинантный препарат SLURP-1 получали, как описано ранее [47], чистоту и правильную пространственную структуру препарата подтверждали с помощью масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и ¹H-ЯМР-спектроскопии.

Влияние rSLURP-1 на жизнеспособность глиомных клеток и астроцитов. Клетки высевали в 96-луночные культуральные планшеты (5 × 10³ клеток на лунку в 100 мкл среды), 1 мкМ rSLURP-1 (из 250 мкМ стока в 100%-ном ДМСО (Applichem, Германия)) растворяли в культуральной среде и добавляли к клеткам. После этого клетки инкубировали в течение 72 ч с заменой среды на свежую каждые 24 ч. Максимальная концентрация ДМСО не превышала 0.5%, добавленный ДМСО не влиял на рост клеток, что было подтверждено в отдельном эксперименте. В каждом эксперименте в контрольные лунки добавляли ДМСО в концентрации, аналогичной таковой в пробах с rSLURP-1. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи МТТ-теста. К клеткам добавляли МТТ (ПанЭко, Россия) в конечной концентрации 0.1 мг/мл, инкубировали в течение 4 ч. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в изопропанолем с 75 мМ HCl, после чего определяли поглощение в лунках планшета при 540 нм с выравниванием на фон при 655 нм на планшетном ридере Bio-Rad 680 (Bio-Rad, США). Оптическую плотность лунок планшета нормировали на оптическую плотность лунок с необработанными клетками, полученные результаты анали-

зировали с помощью программы Graphpad Prism 8.0 (GraphPad Software, США).

Влияние rSLURP-1 на миграцию клеток U251 MG. Анализ влияния rSLURP-1 на миграцию клеток U251 MG в модели “заживление раны” *in vitro* (scratch assay) проводили согласно методике Bychkov et al. [35]. Клетки U251 MG высевали в 96-луночные планшеты (5×10^4 клеток/лунку) и выращивали в течение 24 ч. Затем среду из лунок заменяли на среду без сыворотки, чтобы минимизировать возможную пролиферацию клеток. Через 8 ч, стерильным наконечником пипетки объемом 10 мкл, на дне лунки процарапывали вертикальную полосу (насадка GenFollower, E-FTB10S, Китай), после чего клетки промывали PBS и обрабатывали rSLURP-1, разведенным в среде из 250 мкМ стока в 100%-ном ДМСО. В контрольные лунки добавляли ДМСО без rSLURP-1. Снимки лунок с процарапанными полосами анализировали через 0 и 24 ч при 20-кратном увеличении, используя систему анализа клеток Clone-Select Imager (Molecular Devices, США). Центр лунки планшета отмечали как центральную точку отсчета, чтобы обеспечить фотографирование лунки без сдвига. Были сделаны цифровые изображения, площадь царапин оценивали с помощью программ ImageJ (NIH, США) и MS Excel, вычисляя процент поверхности царапин, занятой мигрирующими клетками. В каждом эксперименте повторяющиеся измерения усредняли.

Анализ клеточного цикла. Для анализа клеточного цикла клетки U251 MG высевали в 6-луночные культуральные планшеты (25×10^4 клеток/лунку) и инкубировали с 1 мкМ rSLURP-1 в течение 72 ч с заменой среды на свежую каждые 24 ч. Затем клетки фиксировали в 70%-ном этаноле в течение 12 ч (-20°C), дважды промывали раствором Эрла и инкубировали в буфере для облегчения прохождения йодида пропидия в клетки, их мембрану пермеабилizовали буфером для пермеабилizации (200 мМ Na_2HPO_4 с 0.004% Triton X-100, pH 7.8) в течение 5 мин. Затем клетки промывали и ресуспендировали в растворе Эрла с 50 мг/мл йодида пропидия и 0.2 мг/мл РНКазы А, после чего анализировали на цитофлуориметре Attune NxT (Life Technologies, США). Процентное содержание клеток в фазах клеточного цикла определяли с использованием программы Attune NxT Software (Life Technologies, США).

Анализ фосфорилирования внутриклеточных киназ. Фосфорилирование клеточных сигнальных белков анализировали с помощью магнитных частиц Bio-Plex с набором реагентов для клеточной сигнализации Bio-Plex Pro (Bio-Rad, США). Клетки инкубировали в течение 48 ч с добавлением 1 мкМ rSLURP-1 из 250 мкМ стока в 100% исходного ДМСО, после чего лизировали с использованием буфера, входящего в состав на-

бора. Анализ проводили на аппарате Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкциями производителя. Использовали наборы частиц и детектирующих антител для определения уровней фосфорилирования: ERK (171V50006M), p38 MAPK (171V50014M), JNK (171V50011M) и АКТ (171V50001M).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые показано, что рекомбинантный белок rSLURP-1 тормозит рост клеток глиомы, ингибирует их миграцию и вызывает арест клеточного цикла в клетках глиомы U251 MG в фазе G2/М. Эффекты, вызываемые rSLURP-1 в клетках глиомы, опосредованы подавлением активности киназ ERK, p38 MAPK и АКТ. Таким образом, рекомбинантный белок rSLURP-1 может являться прообразом новых противоглиомных препаратов — модуляторов никотиновых рецепторов ацетилхолина.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-74-20161).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Получение астроцитов новорожденных крыс проводили в соответствии с протоколом IACUC ИБХ РАН № 312/2020 от 21 декабря 2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

М.А. Шулепко и М.Л. Бычков внесли равноценный вклад в написание статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cahill D., Turcan S. // Semin. Neurol. 2018. V. 38. P. 5–10. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1620238>
2. Hu Y., Jiang Y., Behnan J., Ribeiro M.M., Kalantzi C., Zhang M.D., Lou D., Häring M., Sharma N., Okawa S., Del Sol A., Adameyko I., Svensson M., Persson O., Ernfors P. // Sci. Adv. 2022. V. 8. P. eabm6340. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm6340>
3. Ostrom Q.T., Gittleman H., Truitt G., Boscia A., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. // Neuro Oncol. 2018. V. 20. P. iv1–iv86. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131>
4. Tan A.C., Ashley D.M., López G.Y., Malinzak M., Friedman H.S., Khasraw M. // CA Cancer J. Clin. 2020.

- V. 70. P. 299–312.
<https://doi.org/10.3322/caac.21613>
5. Schuller H.M. // Nat. Rev. Cancer. 2009. V. 9. P. 195–205.
<https://doi.org/10.1038/nrc2590>
6. Egleton R.D., Brown K.C., Dasgupta P. // Trends Pharmacol. Sci. 2008. V. 29. P. 151–158.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.12.006>
7. Zoli M., Pucci S., Vilella A., Gotti C. // Curr. Neuropharmacol. 2018. V. 16. P. 338–349.
<https://doi.org/10.2174/1570159X15666170912110450>
8. Wessler I., Kirkpatrick C.J. // Br. J. Pharmacol. 2008. V. 154. P. 1558–1571.
<https://doi.org/10.1038/bjp.2008.185>
9. Grando S.A. // Nat. Rev. Cancer. 2014. V. 14. P. 419–429.
<https://doi.org/10.1038/nrc3725>
10. Tsurutani J., Castillo S.S., Brognard J., Granville C.A., Zhang C., Gills J.J., Sayyah J., Dennis P.A. // Carcinogenesis. 2005. V. 26. P. 1182–1195.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgi072>
11. Dasgupta P. // J. Clin. Invest. 2006. V. 116. P. 2208–2217.
<https://doi.org/10.1172/JCI28164>
12. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Jolkovsky D.L., Pinkerton K.E., Grando S.A. // FASEB J. 2007. V. 22. P. 1356–1368.
<https://doi.org/10.1096/fj.07-9965com>
13. Wang S., Hu Y. // Oncol. Lett. 2018. V. 16. P. 1375–1382.
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.8841>
14. Shulepko M.A., Bychkov M.L., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P. // Dokl. Biochem. Biophys. 2020. V. 493. P. 211–214.
<https://doi.org/10.1134/S1607672920040134>
15. Loughner C.L., Bruford E.A., McAndrews M.S., Delp E.E., Swamynathan S., Swamynathan S.K. // Hum. Genomics. 2016. V. 10. P. 10.
<https://doi.org/10.1186/s40246-016-0074-2>
16. Vasilyeva N.A., Loktyushov E.V., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N. // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. P. 1702–1715.
<https://doi.org/10.1134/S0006297917130090>
17. Shulepko M.A., Kulbatskii D.S., Bychkov M.L., Lyukmanova E.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 66–75.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019020122>
18. Liu J.-F., Mao L., Bu L.-L., Ma S.-R., Huang C.-F., Zhang W.-F., Sun Z.-J. // Am. J. Cancer Res. 2015. V. 5. P. 3505–3515.
19. Jacobsen B., Kriegbaum M.C., Santoni-Rugiu E., Ploug M. // World J. Clin. Oncol. 2014. V. 5. P. 621–632.
<https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i4.621>
20. Choi S.H., Kong H.K., Park S.Y., Park J.H. // Int. J. Oncol. 2009. V. 35. P. 601–607.
https://doi.org/10.3892/ijo_00000371
21. Su S.-C., Lin C.-W., Yang W.-E., Fan W.-L., Yang S.-F. // Expert Opin. Ther. Targets. 2016. V. 20. P. 551–566.
<https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1113260>
22. Fu X.W., Song P.F., Spindel E.R. // Int. Immunopharmacol. 2015. V. 29. P. 93–98.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.05.022>
23. Reiter R.E., Gu Z., Watabe T., Thomas G., Szigeti K., Davis E., Wahl M., Nisitani S., Yamashiro J., Le Beau M.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 1735–1740.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1735>
24. Bergqvist C., Kadara H., Hamie L., Nemer G., Safi R., Karouni M., Marrouche N., Abbas O., Hasbani D.J., Kibbi A.G. // Int. J. Dermatol. 2018. V. 57. P. 162–170.
<https://doi.org/10.1111/ijd.13850>
25. Russo P., Cardinale A., Margaritora S., Cesario A. // Life Sci. 2012. V. 91. P. 1087–1092.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.05.003>
26. Throm V.M., Männle D., Giese T., Bauer A.S., Gaida M.M., Kopitz J., Bruckner T., Plaschke K., Grekova S.P., Felix K. // Oncotarget. 2018. V. 9. P. 11734–11751.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.24312>
27. Luo L., McGarvey P., Madhavan S., Kumar R., Gusev Y., Upadhyay G. // Oncotarget. 2016. V. 7. P. 11165–11193.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.7163>
28. Chernyavsky A.I., Arredondo J., Galitovskiy V., Qian J., Grando S.A. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2010. V. 299. P. 903–911.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00216.2010>
29. Pettersson A., Nylund G., Khorram-Manesh A., Nordgren S., Delbro D.S. // Auton. Neurosci. 2009. V. 148. P. 97–100.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2009.03.002>
30. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A. // Life Sci. 2007. V. 80. P. 2243–2247.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.01.003>
31. Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Kudryavtsev D.S., 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. e0149733.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149733>
32. Lyukmanova E.N., Bychkov M.L., Sharonov G.V., Efremenko A.V., Shulepko M.A., Kulbatskii D.S., Shenkarev Z.O., Feofanov A.V., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // Br. J. Pharmacol. 2018. V. 175. P. 1973–1986.
<https://doi.org/10.1111/bph.14194>
33. 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 Naturae. 2014. V. 6. P. 60–66.
34. Shulepko M.A., Bychkov M.L., Shlepova O.V., Shenkarev Z.O., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. // Int. Immunopharmacol. 2020. V. 82. P. 106303.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106303>
35. 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>
36. Chernyavsky A.I., Shchepotin I.B., Grando S.A. // Int. Immunopharmacol. 2015. V. 29. P. 36–44.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.05.033>

37. Kirichenko A.V., Shlepova O.V., Bychkov M.L., Mikhaylova I.N., Shulepko M.A., Lyukmanova E.N. // J. Invest. Dermatol. 2021. V. 141. P. 9.
<https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.02.065>
38. Thompson E.G., Sontheimer H. // Cells. 2019. V. 8. P. 1203.
<https://doi.org/10.3390/cells8101203>
39. Kajstura M., Halicka H.D., Pryjma J., Darzynkiewicz Z. // Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. 2007. V. 71. P. 125–131.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.20357>
40. Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Shulepko M.A., Shlepova O.V., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. // PLoS One. 2019. V. 14. P. e0217339.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217339>
41. Grave N., Scheffél T.B., Cruz F.F., Rockenbach L., Goetert M.I., Laufer S., Morrone F.B. // Front. Pharmacol. 2022. V. 13. P. 975197.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.975197>
42. Chen D., Zuo D., Luan C., Liu M., Na M., Ran L., Sun Y., Persson A., Englund E., Salford L.G. // PLoS One. 2014. V. 9. P. e87281.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087281>
43. Zhang Z.-Q., Wang X., Xue B.-H., Zhao Y., Xie F., Wang S.-D., Xue C., Wang Y., Zhang Y.-S., Qian L.-J. // Oncol. Rep. 2021. V. 46. P. 202.
<https://doi.org/10.3892/or.2021.8153>
44. Pucci S., Fasoli F., Moretti M., Benfante R., Di Lascio S., Viani P., Daga, A., Gordon T.J., McIntosh M., Zoli M. // Pharmacol. Res. 2021. V. 163. P. 105336.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105336>
45. McConnell D.D., Carr S.B., Litofsky N.S. // Expert Rev. Neurother. 2019. V. 19. P. 545–555.
<https://doi.org/10.1080/14737175.2019.1617701>
46. Schildge S., Bohrer C., Beck K., Schachtrup C. // J. Vis. Exp. 2013. P. e50079.
<https://doi.org/10.3791/50079>
47. Shulepko M.A., Lyukmanova E.N., Paramonov A.S., Lobas A., Shenkarev Z.O., Kasheverov I.E., Dolgikh D.A., Tsetlin V.I., Arseniev A.S., Kirpichnikov M.P. // Biochemistry (Moscow). 2013. V. 78. P. 204–211.
<https://doi.org/10.1134/S0006297913020090>

Recombinant SLURP-1 Inhibits Growth and Migration of U251 MG Glioma by Cell Cycle Arrest and Modulation of MAPK and AKT Signaling Pathways

M. A. Shulepko*, **, M. L. Bychkov**, M. P. Kirpichnikov**, ***, and E. N. Lyukmanova*, **, ***, #

Phone: +7 (495) 336-80-11; e-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

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

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

***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

A recombinant analog of the human SLURP-1 protein (rSLURP-1) effectively inhibits the growth of carcinomas by interaction with the $\alpha 7$ -type nicotinic acetylcholine receptor. Recently, rSLURP-1 inhibition of gliomas growth *in vitro* was shown by the authors, although, the mechanism of rSLURP-1 action was not studied. Here, we showed that rSLURP-1 selectively inhibits the growth of U251 MG glioma cells but not of normal astrocytes, and controls glioma cell migration. In addition, rSLURP-1 induces cell cycle arrest in the G2/M phase in U251 MG glioma cells, but does not result in apoptosis. Incubation of U251 MG cells with rSLURP-1 causes inhibition of phosphorylation of ERK, p38 MAPK, and AKT kinases, the activation of which contributes to the progression of gliomas. At the same time, rSLURP-1 does not affect the activity of JNK kinase. Thus, rSLURP-1 is an endogenous protein promising for the development of drugs based on it for the treatment of not only carcinomas, but also gliomas.

Keywords: SLURP-1, Ly6/uPAR, nicotinic acetylcholine receptor, glioma



РЕГИОСПЕЦИФИЧНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА ЗАЩИЩЕННОГО ПРОИЗВОДНОГО β -РАЗВЕТВЛЕННОГО ДИПЕПТИДА АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ¹

© 2023 г. В. Н. Азев*, #, Л. К. Байдакова*, А. Н. Чулин*, А. Б. Тузиков**, П. Г. Кислицин***, М. В. Молчанов****, А. И. Мирошников**

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

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

***ЦВТ "Химрар", Россия, 141401 Химки, ул. Рабочая, 2а, корп. 1

****Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Россия, 142290 Пущино, ул. Институтская, 3

Поступила в редакцию 01.12.2022 г.

После доработки 27.12.2022 г.

Принята к публикации 28.12.2022 г.

Разработан новый эффективный метод синтеза N_α -защищенной β -L-аспартил-L-аспарагиновой кислоты и ее производных. Отличительные особенности метода — использование легкодоступных исходных веществ (Cbz-аспарагина и диметилового эфира аспарагиновой кислоты), подавление образования аспартимида в финальной стадии синтеза за счет электростатического эффекта и применение нового реагента (NaNO_2 /водная трифторуксусная кислота) для превращения защищенного производного аспарагина в соответствующую аспарагиновую кислоту. Метод позволяет получить производные аспарагиновой кислоты, которые находят применение в исследованиях мультивалентных взаимодействий углеводов с различными макромолекулами и могут использоваться для синтеза дендримерных карбоксилатных конструкций, изучаемых в качестве микробицидов.

Ключевые слова: нитрозирование аспарагина, ортогональная защитная группа, подавление образования аспартимида

DOI: 10.31857/S0132342323040279, EDN: ODAVUU

ВВЕДЕНИЕ

Для изучения мультивалентных взаимодействий углеводов, находящихся на поверхности клеток или в растворе, с углевод-связывающими белками лектинами используются различные гликоконъюгаты, в том числе гликокластеры [1]. Защищенные по аминогруппе производные дипептида, β -L-аспартил-L-аспарагиновой кислоты, нашли применение в синтезе гликокластеров, содержащих три одинаковых углевода — антигена системы групп крови АВ0, а также их липидных производных, кластерных неогликолипидов

[2, 3]. В этих исследованиях, в частности, необходимо использование значительных количеств N_α -карбонилбензилокси- β -L-аспартил-L-аспарагиновой кислоты (I), однако в литературе отсутствует описание препаративного метода получения этого соединения.

Один из известных подходов к синтезу разветвленных дипептидов на основе аспарагиновой кислоты основан на региоселективном взаимодействии защищенного ангидрида аспарагиновой кислоты (такого как, например, соединение (II)) с аминами. Однако обсуждаемый подход не может считаться общим ввиду непредсказуемой региоселективности [4–6], и, более того, в литературе описано образование смеси изомеров (I) и (IV) (схема 1) при взаимодействии соединения (II) с аспаратом (III) [7].

Цель данного исследования — разработка нового региоселективного метода синтеза N_α -бензилоксикарбонил- β -L-аспартил-L-аспарагиновой кислоты (I).

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Вадима Тихоновича Иванова.

Сокращения: 9-BBN — 9-борабицикло[3.3.1]нонан; ESI — ионизация распылением в электрическом поле; HRMS — масс-спектр высокого разрешения; Nbz — 4-нитробензил; Рас — фенацил(2-фенил-2-оксоэтил); Pfr — пентафторфенил; ТФУ — трифторуксусная кислота.

Автор для связи: (тел: +7 (496) 773-54-42; эл. почта: viatcheslav.azev@bibch.ru).

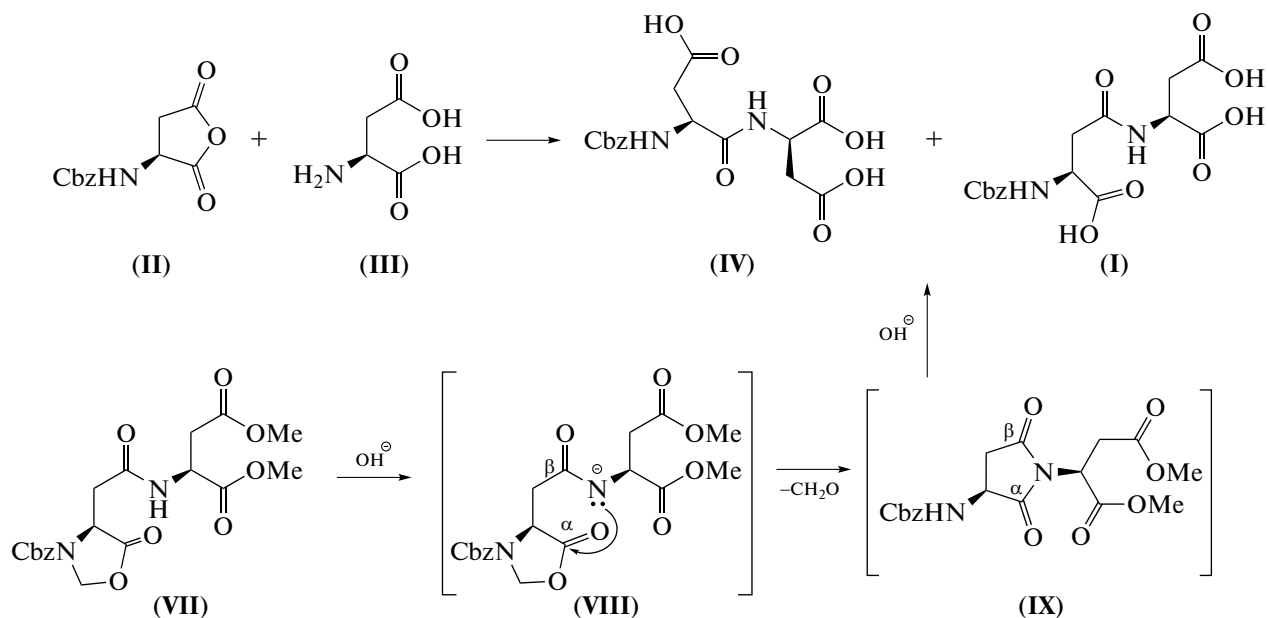


Схема 1. Неселективные синтезы N_{α} -карбонилбензилокси- β -L-аспартил-L-аспарагиновой кислоты (I).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Легкодоступный гидрохлорид диметиласпартата (V) был выбран в качестве одного из исходных веществ (метилловые эфиры ортогональны к защитной группе Cbz).

Описано лишь одно общее и относительно простое в реализации решение проблемы дифференцировки карбоксильных групп во втором легкодоступном исходном веществе — N_{α} -карбонилбензилоксиаспарагиновой кислоте (VI). Региоспецифичное введение защитной группы на α -карбоксил возможно с использованием хелатного эффекта нуклеофильных центров на атоме кислорода и на атоме азота соответствующих α -карбоксильной и α -аминогрупп по отношению к электрофилу, таким как формальдегид [8], Cu^{2+} [9], бораны [10] и гексафторацетон [11]. Следует, однако, отметить, что при этом только лишь аддукты производного аспарагиновой кислоты с формальдегидом [12] и с 9-BBN [13] применялись для синтеза β -разветвленных пептидов.

Мы выбрали способ синтеза целевого соединения (I) с использованием в качестве ключевого интермедиата аддукта N_{α} -карбонилбензилоксиаспарагиновой кислоты с формальдегидом — α -защищенного оксазолидин-5-она (VII) (схема 1). Такой подход, по нашему мнению, имеет преимущества по сравнению с синтезом аддукта на основе 9-BBN. Дипептид (VII) был получен с высоким

выходом из легкодоступных соединений (V) и (VI). Однако в результате гидролиза метиленового мостика и эфирных группировок была получена смесь целевого соединения (I) и, возможно, его изомера, соединения (IV).

На рис. 1 представлено сравнение сигналов α - и β -атомов водорода в остатках аспарагиновых кислот в ^1H -ЯМР-спектрах чистого соединения (I) и смеси продуктов реакции гидролиза соединения (VII). Положение сигналов и их форма свидетельствовали об изомерной природе примеси. Данные масс-спектрометрического анализа подтвердили это предположение.

Из литературы известно, что α -эфиры аспарагина очень восприимчивы к внутримолекулярной нуклеофильной атаке N -анионами (такими как в соединении (VIII)) [14, 15], приводящей к образованию циклических продуктов.

Внутримолекулярное раскрытие метиленового мостика с образованием аспартимида в присутствии других оснований также известно из литературы [16], поэтому образование двух продуктов при гидролизе соединения (VII) можно описать последовательностью превращений, показанной на схеме 1. В результате депротонирования амидного протона и последующей внутримолекулярной нуклеофильной атаки на карбонильную группу оксазолидин-5-она в соединении (VIII) (схема 1) образуется аспартимид (IX), который раскрывается при взаимодействии с гидроксид-

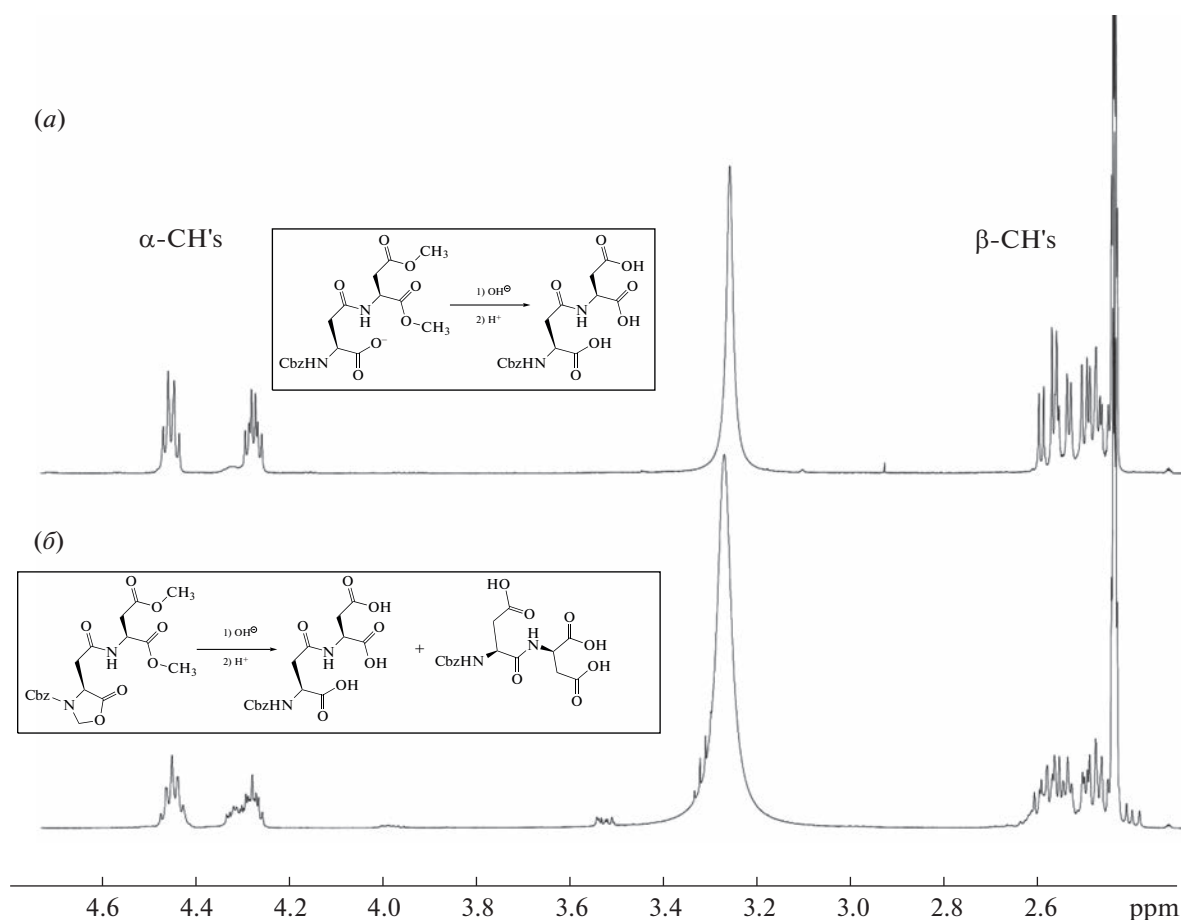


Рис. 1. Сравнение области ¹H-ЯМР-спектров образца чистого соединения (I), который был получен новым методом, описанным в настоящей работе (а), и образца соединения (I), полученного по аналогии с опубликованным методом Mehrotra et al. [12] и содержащего примесь (б).

анионом по любой из имеющихся карбонильных групп с образованием двух изомеров — (I) и (IV).

Следует еще раз подчеркнуть, что хотя строгие экспериментальные доказательства обсуждаемых превращений отсутствуют, из литературных данных известно, что образование аспартимида оказывается порой неизбежным для производных аспарагиновой кислоты (или аспарагина), однако скорость образования такого интермедиата зависит от конкретной пептидной последовательности [14], и только очень редко его образования, по-видимому, можно избежать [12].

Образование аспартимида следовало радикально подавить, что возможно, если гидролизу подвергнуть субстрат с отрицательным зарядом на α-карбоксильной группе (схема 2а). Таким образом, возникла задача разработать региоселективный метод получения C_α-защищенного производного аспарагиновой кислоты с защитной группой, ортогональной к Cbz и к метиловым сложноэфирным группам. Таким требованиям, в

первую очередь, удовлетворяет *трет*-бутильная защитная группа, однако соответствующее производное Cbz-Asp-OBu^t труднодоступно [17]. Простым же в реализации решением представлялось использование защитных групп, которые удаляются восстановлением [18]. В литературе описан довольно простой метод получения соединения (XIa) — из 4-нитробензильного эфира Cbz-аспарагина (XIIa) с использованием нитрозилсерной кислоты (HO₃SONO) [19]. В свою очередь, синтез эфиров аспарагина довольно тривиален [20, 21].

На схеме 2б представлен ретросинтетический анализ соединения (I). Одной из особенностей запланированной работы было изучение эффективности использования (с точки зрения суммарного химического выхода соединения (X)) различных по химическому строению и свойствам C-концевых защитных групп — 4-нитробензильной и фенацильной.

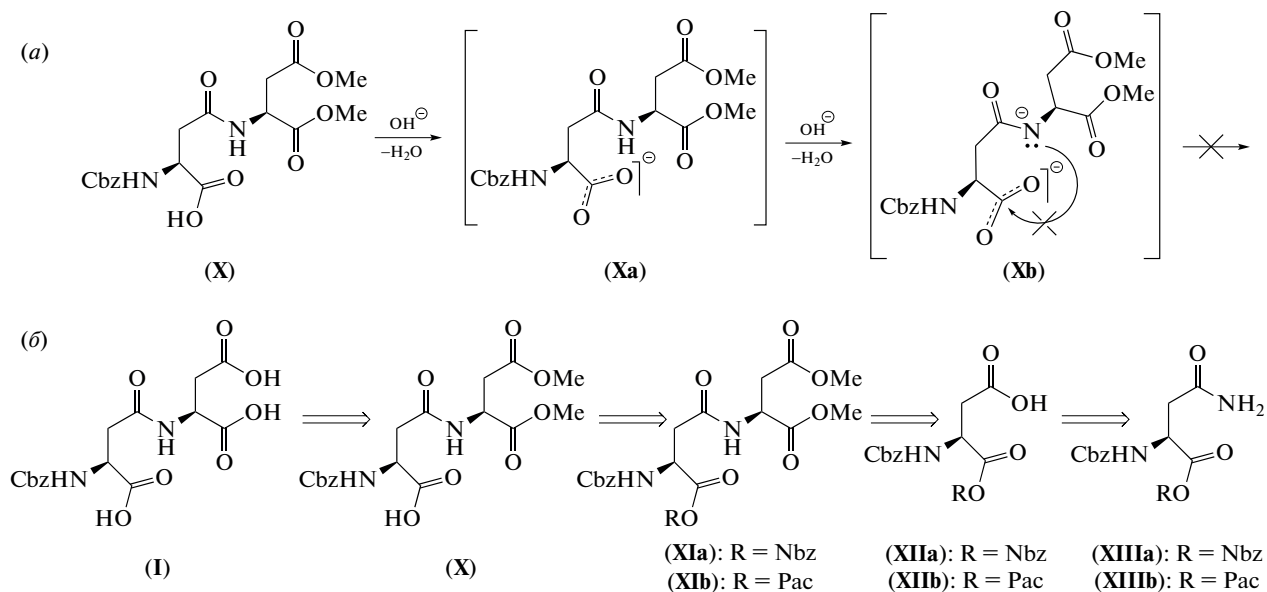


Схема 2. Новый подход к синтезу соединения (I). (a) – Вследствие отталкивания депротонированной амидной группы боковой цепи и карбоксилат-аниона протекание циклизации в аспартимид невозможно; (b) – ретросинтетический анализ соединения (I).

На схеме 3 представлены результаты реализации запланированных превращений. Соединение (XIIIa) было получено с высоким выходом (74%), сравнимым с опубликованными данными (70%) [20]. Выход соединения (XIIIb) оказался ниже (50%). Нитрозил-серная кислота не была коммерчески доступна, по-

этому проводили эксперименты, в которых ее синтезировали *in situ* и применяли для проведения нитрозилирования по аналогии с использованием такого раствора в реакции диазотирования слабоосновных аминов [22, 23]. В этих экспериментах были получены низкие выходы (16–18%) соединения (XIIa).

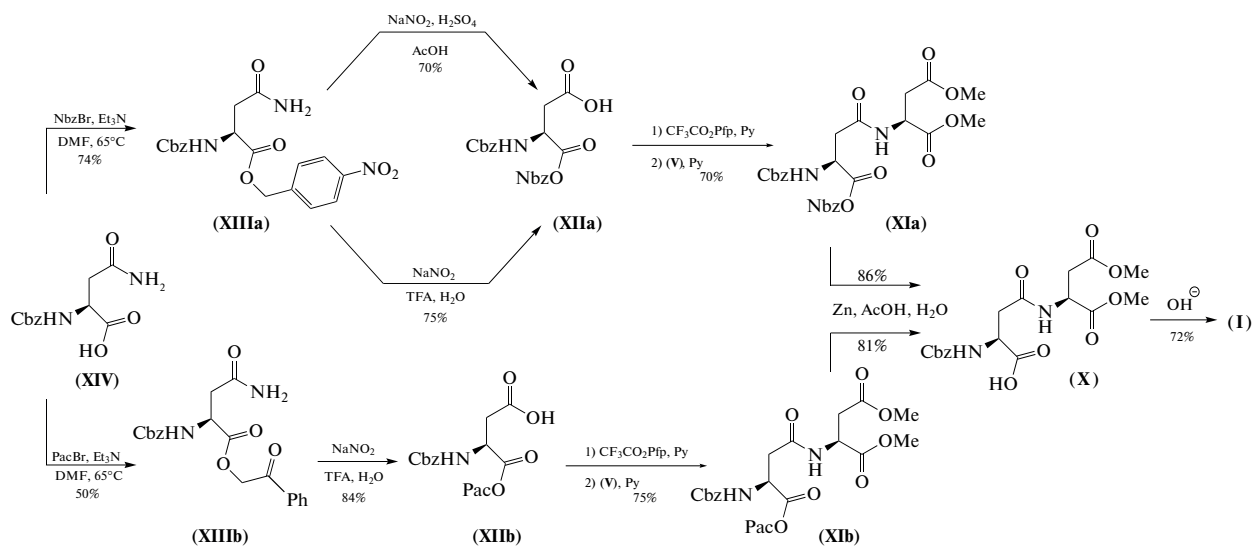


Схема 3. Синтез соединения (I).

При использовании обратного порядка смешения реагентов [24] и уксусной кислоты в качестве соразвителя выход соединения (XIIa) был гораздо выше (70%), однако условия обработки реакционной смеси оказались неприемлемыми для масштабирования.

По аналогии с реакцией, в которой амид нитрозилировали оксидом азота(IV) в среде водной трифторуксусной кислоты (ТФУ) [25], мы опробовали еще один метод синтеза соединения (XIIa) – нитрит натрия добавляли к раствору производного аспарагина в водной ТФУ. В результате опти-

мизации условий реакции мы показали, что избыток твердого NaNO₂ следует добавлять к раствору соединения (XIIIa) в смеси ТФУ–вода (85 : 15, v/v) небольшими порциями. После добавления 7 экв. NaNO₂ соединение (XIIa) было выделено с выходом 75%. При этом продолжительность реакции не должна превышать 70–80 мин с целью предотвращения гидролиза сложноэфирной группы. Далее в найденных условиях в реакцию вводили другое производное аспарагина с феноцильной сложноэфирной группой, продукт реакции – кислота (XIIb) – выделена также с высоким выходом, однако при использовании 10 экв. NaNO₂.

Оба синтезированных производных аспарагиновой кислоты вводили в реакцию с соединением (V), дипептиды (XIa, b) были получены с высокими выходами, превышающими 70%. Защитные группы в соединениях (XIa, b) были селективно удалены с использованием Zn/AcOH [26, 27], дипептид (X) был получен с выходами 86 и 81% соответственно. Гидролиз соединения (X) привел к получению целевого разветвленного дипептида (I), образования аспартимида при этом не наблюдалось (рис. 1a).

Таким образом, был разработан эффективный, масштабируемый и региоспецифичный метод синтеза защищенного β-разветвленного дипептида на основе аспарагиновой кислоты. Мы также предложили для превращения производных аспарагина в соответствующие кислоты использовать новый реагент – нитрит натрия в водной ТФУ. Следует отметить значительную стабильность сложноэфирных групп к условиям этой реакции. Другой отличительной чертой разработанного метода оказалось эффективное подавление образования аспартимида в щелочных условиях. Аналогичный подход использовался в дизайне защитной группы боковой цепи аспарагиновой кислоты, имеющей бетаиновую природу [28]. В этом случае модификация боковой цепи

аспарагиновой кислоты заключалась в обращении ее полярности (из электрофильной группы СО в нуклеофильный енолят), что привело к подавлению циклизации в аспартимид.

Еще одна отличительная черта разработанного метода – использование амидной группы аспарагина в качестве защитной группы боковой цепи аспарагиновой кислоты. Насколько нам известно, такой прием лишь изредка применялся в синтезе пептидов, разветвленных в боковой цепи [29, 30], но никто не изучал это свойство аспарагина для подавления образования аспартимида.

Обе изученные защитные группы продемонстрировали одинаковую эффективность, однако, ввиду того что производное аспарагина с 4-нитробензильной защитной группой было получено с более высоким выходом, синтетическая цепочка на ее основе была отмасштабирована для получения соединения (I) в количестве нескольких грамм.

Соединение (X) может быть использовано в синтезе других разветвленных производных аспарагиновой кислоты. Карбоксильную группу в соединении (X) активировали и вводили в реакцию с соединением (V), при этом было получено соединение (XV) с не оптимизированным выходом 41% (схема 4). Именно этот трипептид можно получить несколько более эффективно (55–57%; см. работу Niggemann et al. [31] и “Эксперим. часть”), используя другое исходное вещество – N_α-Cbz-аспарагиновую кислоту. Однако первый способ более гибок, поскольку позволяет синтезировать трипептид из различных дикабоновых кислот. Такие трипептиды (например, соединение (XVI)) находят применение в исследованиях мультивалентных взаимодействий углеводов с различными макромолекулами [1–3], а кроме того, могут использоваться для синтеза дендримерных карбоксилатных конструкций, изучаемых в качестве микробицидов [32].

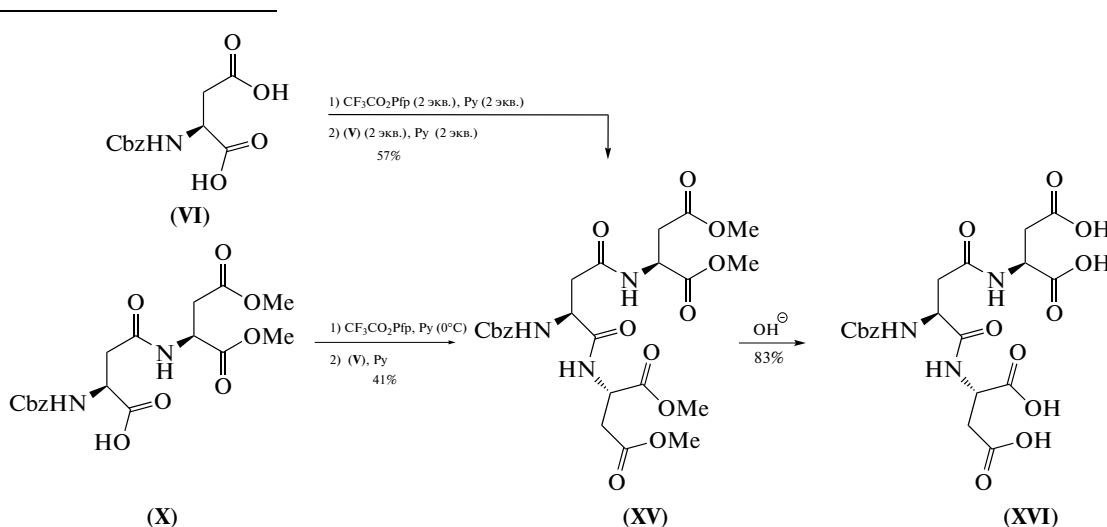


Схема 4. Получение разветвленного трипептида из ключевого промежуточного продукта (X).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали неорганические реактивы и растворители (РеаХим или Химмед, Россия); 4-нитробензилбромид, фенацилбромид (Fluka, Швейцария); трифторуксусную кислоту, пентафторфенилтрифторацетат (P&M Invest, Россия), аминокислоты и их стандартные производные (Reanal, Венгрия или IRIS Biotech GmbH, Германия). При необходимости реактивы подвергали очистке по известным методикам [33]. Гидрохлорид диметил L-аспартата [34] и (4R)-3-бензилоксикарбонил-5-оксооксазолидин-4-уксусную кислоту [12] синтезировали по описанным методикам. Спектры ЯМР регистрировали на приборе Bruker AVANCE III (Bruker BioSpin, Германия; ^1H при 600 МГц, ^{13}C при 125 МГц) относительно остаточных протонов растворителя $\text{DMSO}-d_6$. 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). ТСХ проводили на пластинах F254 Silica gel G plates (part 1.05554.0001; Merck, Германия). Детекцию соединений на пластинах проводили с использованием следующих реагентов: 1) раствора нингидрина (нингидрин 0.5 г, бутанол-1 250 мл, уксусная кислота 50 мл, сим-коллиндин 10 мл) с последующим нагревом; 2) паров иода; 3) УФ-облучения; 4) насыщенного раствора фосфорномолибденовой кислоты в этаноле (~6 г, 60 мл) с последующим нагревом.

N_α -Бензилоксикарбонил-L-аспарагина 4-нитробензиловый эфир (XIIa). N_α -Бензилоксикарбонил-L-аспарагин (XIV) (4.5 г, 16.9 ммоль), триэтиламин (2.4 мл, 15.6 ммоль) и 4-нитробензилбромид (5.49 г, 25.4 ммоль) последовательно растворяли в DMF (65 мл) при перемешивании. Реакционную смесь нагревали при 65°C в течение 4 ч, затем выдерживали при 20–25°C в течение 16 ч. Реакционную смесь медленно выливали в холодный (0°C) 10%-ный водный раствор KHCO_3 (150 мл) при перемешивании. Осадок отфильтровывали, промывали водой (3 × 15 мл) и метанолом (3 × 50 мл), затем перекристаллизовывали из этанола и сушили в вакууме над P_2O_5 . Выход соединения (XIIa) составил 5.01 г (74%), $R_f = 0.55$ (90 : 8 : 2 v/v/v $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$), т. пл. 162–164°C, лит. т. пл. 164–166°C [20].

N_α -Бензилоксикарбонил-L-аспарагина фенацильный эфир (XIIb). Синтезирован аналогично соединению (XIIa) из Cbz-Asn-OH (4.12 г, 15.5 ммоль), фенацилбромида (4.63 г, 23 ммоль) и триэтиламина (2.2 мл, 15.6 ммоль). Выход соединения (XIIb) составил 2.96 г (50%), $R_f = 0.39$ (90 : 8 : 2 v/v/v $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$). Спектр ^1H -ЯМР: 2.58 (дд, J 9.01, 15.83, 1H, H β), 2.72 (дд, J 4.29,

15.82, 1H, H β), 4.63 (ддд, J 4.26, 8.71, 9.15, 1H, H α), 5.03 (д, J 12.87, 1H, PhCH_2), 5.06 (д, J 12.87, 1H, PhCH_2), 5.49 (д, J 16.93, 1H, CH_2COPh), 5.59 (д, J 16.93, 1H, CH_2COPh), 6.98 (ш.с., 1H, NH), 7.25–7.38 (м, 5H, PhCH_2), 7.41 (ш.с., 1H, NH), 7.57 (т, J 8.02, 2H, CH_2COPh), 7.70 (тт, J 1.20, 7.44, 1H, CH_2COPh), 7.75 (д, J 8.13, 1H, NH), 7.97 (дд, J 1.17, 7.19, 2H, CH_2COPh). Спектр ^{13}C -ЯМР: 192.45, 171.60, 170.52, 155.79, 136.84, 133.97, 133.78, 128.89, 128.32, 127.76, 127.68, 66.85, 65.50, 50.50, 36.64; HRMS (ESI) m/z : найдено M , 385.1392; вычислено для $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_6^+ [M + \text{H}]^+$ 385.1394.

N_α -Бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты α -4-нитробензиловый эфир (XIIa). Метод а. Серную кислоту (94%, 0.934 мл) охлаждали на ледяной бане, после чего добавляли нитрит натрия (182.3 мг, 2.6 ммоль) четырьмя одинаковыми порциями. Полученную бесцветную суспензию перемешивали 10 мин, после чего к ней по каплям добавляли раствор соединения (XIIa) (0.4 г, 1 ммоль) в ледяной уксусной кислоте (1.9 мл). Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°C, затем 30 мин при 20–25°C и выливали в смесь воды со льдом (300 мл). Осадок отфильтровывали, промывали водой (5 × 15 мл) и сушили в вакууме над P_2O_5 . Выход соединения (XIIa) составил 0.07 г (17.5%), $R_f = 0.23$ (92 : 8 v/v $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$), т. пл. 125–126°C, лит. т. пл. 127–128°C [19].

Метод б. Соединение (XIIa) (0.2 г, 0.5 ммоль) растворяли в ледяной уксусной кислоте (4.5 мл). Раствор охлаждали на водяной бане (10°C) и добавляли концентрированную серную кислоту (0.5 мл). Внешнее охлаждение убирали и добавляли нитрит натрия (0.241 г, 3.5 ммоль, 7 экв.) при перемешивании семью одинаковыми порциями в течение 1 ч. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч и выливали в смесь воды со льдом (200 мл). Осадок отфильтровывали, промывали водой (5 × 15 мл) и сушили в вакууме над P_2O_5 . Выход соединения (XIIa) составил 0.145 г (70%).

Метод в. Соединение (XIIa) (3.21 г, 8 ммоль) растворяли в 85%-ной водной ТФУ (90 мл) при комнатной температуре. К полученному раствору добавляли нитрит натрия (3.87 г, 56 ммоль, 7 экв.) при перемешивании семью одинаковыми порциями в течение 1 ч. Реакционную смесь перемешивали до прекращения выделения оксидов азота и упаривали в вакууме масляного насоса, снабженного двумя ловушками, охлаждаемыми жидким азотом, соединенными последовательно. Остаток после упаривания растворяли в смеси EtOAc (100 мл) и воды (100 мл), водный слой отделяли, органический слой промывали водой (3 × 30 мл) и насыщенным раствором NaCl (3 × 20 мл). Органическую фазу сушили над MgSO_4 и упаривали. Остаток после упаривания растворяли в EtOAc (10 мл), к полученному раствору добавляли пет-

ролейный эфир (30/50) до слабого помутнения и оставляли до завершения кристаллизации. Суспензию фильтровали, осадок на фильтре промывали петролейным эфиром (30/50, 2 $\times$ 20 мл) и сушили в вакууме над P $_2$ O $_5$. Выход соединения (XIa) составил 2.41 г (75%).

N α -Бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты α -фенациловый эфир (XIb). Синтезирован аналогично соединению (XIa) (метод в) из Cbz-Asn-OPAc (1.35 г, 3.5 ммоль), 85%-ной водной ТФУ (42 мл) и NaNO $_2$ (2.42 г, 35 ммоль, 10 экв.). Продукт очищали перекристаллизацией из смеси диэтилового эфира с петролейным эфиром (30/50). Выход соединения (XIb) составил 1.13 г (84%), R_f = 0.46 (90 : 8 : 2 v/v/v CHCl $_3$ /MeOH/AcOH). Спектр 1 H-ЯМР: 2.69 (дд, J 9.07, 16.82, 1H, H β), 2.90 (дд, J 4.53, 16.77, 1H, H β), 4.61 (ддд, J 4.49, 8.73, 9.24, 1H, H α), 5.05 (с, 2H, PhCH $_2$), 5.50 (д, J 16.91, 1H, CH $_2$ COPh), 5.61 (д, J 16.91, 1H, CH $_2$ COPh), 7.25–7.40 (м, 5H, PhCH $_2$), 7.57 (м, 2H, CH $_2$ COPh), 7.70 (тт, J 1.20, 7.41, 1H, CH $_2$ COPh), 7.88 (д, J 8.21, 1H, NH), 7.57 (дд, J 0.97, 8.15, 2H, CH $_2$ COPh), 12.53 (ш.с., 1H, CO $_2$ H). Спектр 13 C-ЯМР: 192.38, 171.20, 171.00, 155.83, 136.80, 134.00, 133.74, 128.90, 128.33, 127.79, 127.68, 67.01, 65.58, 50.48, 35.88; HRMS (ESI) m/z : найдено M , 384.1084; вычислено для C $_{20}$ H $_{18}$ NO $_7$ [M – H] $^-$ 384.1089.

N α -Бензилоксикарбонил- α -4-нитробензил-L-аспартил-L-аспарагиновой кислоты диметиловый эфир (XIa). Соединение (XIa) (7.7 г, 19.2 ммоль) растворяли в сухом DMF (22 мл) и добавляли при перемешивании пиридин (1.71 мл, 21 ммоль), а затем пентафторфенилтрифторацетат (3.83 мл, 22 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 1 ч, полноту протекания реакции контролировали по ТСХ (90 : 8 : 2 v/v/v CHCl $_3$ /MeOH/AcOH). К реакционной смеси добавляли соединение (V) (5.7 г, 28.8 ммоль, 1.5 экв.) и пиридин (2.33 мл, 28.8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 18 ч и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в смеси EtOAc (400 мл) и воды (200 мл). Водный слой отделяли, а органический слой промывали последовательно 5%-ным водным NaHCO $_3$ (3 $\times$ 200 мл), водой (200 мл), 0.1 М водной HCl (3 $\times$ 200 мл), водой (3 $\times$ 100 мл), насыщенным раствором NaCl (3 $\times$ 100 мл). Органический слой сушили (MgSO $_4$) и упаривали. Остаток растворяли в EtOAc (50 мл), к полученному раствору добавляли петролейный эфир (30/50) до слабого помутнения и оставляли до завершения кристаллизации. Суспензию фильтровали, осадок на фильтре промывали петролейным эфиром (30/50, 2 $\times$ 15 мл) и сушили в вакууме. Выход соединения (XIa) составил 7.3 г (70%), R_f = 0.45 (2 : 1 v/v EtOAc/ n -гептан). Спектр 1 H-ЯМР: 2.59 (дд, J 7.42, 15.53, 1H, H β), 2.66 (дд, J 6.95, 16.54, 1H,

H β), 2.71 (дд, J 6.05, 15.56, 1H, H β), 2.76 (дд, J 6.13, 16.48, 1H, H β), 3.58 (с, 3H, OMe), 3.59 (с, 3H, OMe), 4.54 (дд, J 7.55, 13.99, 1H, H α), 4.63 (дд, J 6.78, 14.05, 1H, H α), 5.03 (д, J 12.73, 1H, PhCH $_2$), 5.06 (д, J 12.73, 1H, PhCH $_2$), 5.25 (д, J 13.92, 1H, NbzCH $_2$), 5.28 (д, J 13.92, 1H, NbzCH $_2$), 7.22–7.40 (м, 5H, PhCH $_2$), 7.61 (д, J 8.74, 2H, NbzCH $_2$), 7.69 (ш.д., J 8.10, 1H, NH), 8.20 (д, J 8.75, 2H, NbzCH $_2$), 8.53 (д, J 7.89, 1H, NH). Спектр 13 C-ЯМР: 171.06, 170.92, 170.29, 168.81, 155.80, 147.03, 143.69, 136.78, 128.29, 128.22, 127.80, 127.66, 123.42, 65.58, 64.86, 52.12, 51.62, 50.65, 48.52, 36.54, 35.59; HRMS (ESI) m/z : найдено M , 568.1533; вычислено для C $_{25}$ H $_{27}$ N $_3$ NaO $_{11}$ [M + Na] $^+$ 568.1538.

N α -Бензилоксикарбонил- α -фенацил-L-аспартил-L-аспарагиновой кислоты диметиловый эфир (XIb). Соединение (XIb) (0.385 г, 1 ммоль) растворяли в сухом DMF (1 мл) в атмосфере аргона. К полученному раствору добавляли пиридин (0.09 мл, 1.1 ммоль) и пентафторфенилтрифторацетат (0.172 мл, 1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 1 ч, полноту протекания реакции контролировали по ТСХ (90 : 8 : 2 v/v/v CHCl $_3$ /MeOH/AcOH). К полученному раствору добавляли соединение (V) (0.297 г, 1.5 ммоль) и пиридин (0.122 мл, 1.5 ммоль). Реакционную смесь выдерживали в атмосфере аргона в течение 18 ч и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в смеси EtOAc (20 мл) и воды (10 мл). Водный слой отделяли, а органический промывали последовательно 5%-ным водным NaHCO $_3$ (3 $\times$ 10 мл), водой (10 мл), 0.1 М водной HCl (3 $\times$ 10 мл), водой (3 $\times$ 10 мл), насыщенным раствором NaCl (3 $\times$ 10 мл). Органический слой сушили (MgSO $_4$) и упаривали. Остаток растворяли в EtOAc (5 мл), к полученному раствору добавляли петролейный эфир (30/50) до слабого помутнения и до завершения кристаллизации. Суспензию фильтровали, осадок на фильтре промывали петролейным эфиром (30/50, 2 $\times$ 15 мл) и сушили в вакууме. Выход соединения (XIb) составил 0.39 г (75%), R_f = 0.47 (2 : 1 v/v EtOAc/ n -гептан). Спектр 1 H-ЯМР: 2.67 (дд, J 8.51, 15.33, 1H, H β), 2.70 (дд, J 7.16, 16.56, 1H, H β), 2.75–2.83 (м, 2H, H β), 3.59 (с, 3H, OCH $_3$), 3.61 (с, 3H, OCH $_3$), 4.61–4.71 (м, 2H, H α), 5.04 (с, 2H, PhCH $_2$), 5.49 (д, J 16.88, 1H, CH $_2$ COPh), 5.59 (д, J 16.88, 1H, CH $_2$ COPh), 7.28–7.39 (м, 5H, PhCH $_2$), 7.57 (м, 2H, CH $_2$ COPh), 7.68–7.73 (м, 2H, CH $_2$ COPh, NH), 7.96 (дд, J 1.25, 7.19, 2H, CH $_2$ COPh), 8.52 (д, J 7.89, 1H, NH). Спектр 13 C-ЯМР: 192.41, 171.29, 171.01, 170.32, 168.68, 155.75, 136.81, 134.00, 133.75, 128.91, 128.31, 127.79, 127.76, 127.67, 66.90, 65.54, 52.15, 52.13, 51.64, 51.62, 50.40, 48.58, 36.62, 35.60; HRMS (ESI) m/z : найдено M , 551.1631; вычислено для C $_{26}$ H $_{28}$ N $_2$ NaO $_{10}$ [M + Na] $^+$ 551.1636.

Диметил *N*-[(4*S*)-3-бензилоксикарбонил-5-оксооксазолидин-4-ил-ацетил]-(2*S*)-аспартат (VII). Синтезирован аналогично соединению (XIb) из (4*R*)-3-бензилоксикарбонил-5-оксооксазолидин-4-уксусной кислоты (0.279 г, 1 ммоль). Выход соединения (VII) составил 0.349 мг (83%), $R_f = 0.63$ (2 : 1 *v/v* EtOAc/*n*-гептан). Спектр ^1H -ЯМР: (*E*- и *Z*-ротамеры наблюдаются при 298 К — это свойство подобных гетероциклических соединений [35]): 2.7–3.2 (м, 4H, H β), 3.55–3.67 (м, 6H, OMe), 4.55–5.05 (м, H α , NCH₂O), 5.12 (с, 2H, PhCH₂), 6.09 (ш.с., 1H, NH), 7.26–7.44 (м, 5H, PhCH₂); HRMS (ESI) m/z : найдено M , 445.1213; вычислено для C₁₉H₂₂N₂NaO₉⁺ [M + Na]⁺ 445.1218.

***N* α -Бензилоксикарбонил- β -L-аспартил-L-аспарагиновой кислоты диметиловый эфир (X).** Дипептид (XIa) (7.3 г, 13.4 ммоль) растворяли в 80%-ной водной уксусной кислоте (200 мл). Добавляли цинковую пыль (15.73 г, 268 ммоль, 20 экв.) в три порции. Реакционную смесь перемешивали 3 ч и фильтровали. Остаток на фильтре промывали 80%-ной водной уксусной кислотой (4 $\times$ 20 мл). Объединенные растворы упаривали досуха в вакууме (остаточное давление 0.1 мм рт. ст.). Остаток после упаривания растворяли в смеси EtOAc (200 мл) и 1 М водной H₂SO₄ (200 мл). Водную фазу отделяли, а органический слой промывали последовательно водой (3 $\times$ 100 мл) и насыщенным раствором NaCl (3 $\times$ 100 мл). Органический слой сушили (MgSO₄) и упаривали. Остаток растворяли в EtOAc (7 мл), к полученному раствору добавляли петролейный эфир (30/50) до слабого помутнения и оставляли до завершения кристаллизации. Суспензию фильтровали, осадок на фильтре промывали петролейным эфиром (30/50, 2 $\times$ 30 мл) и сушили в вакууме. Выход соединения (X) составил 4.52 г (86%), $R_f = 0.26$ (90 : 8 : 2 *v/v/v* CHCl₃/MeOH/AcOH). Спектр ^1H -ЯМР: 2.51 (м, 1H, H β), 2.61 (дд, J 5.25, 15.38, 1H, H β), 2.67 (дд, J 6.94, 16.51, 1H, H β), 2.77 (дд, J 6.19, 16.51, 1H, H β), 3.59 (с, 3H, OMe), 3.61 (с, 3H, OMe), 4.34 (ддд, J 5.26, 8.16, 8.36, 1H, H α), 4.62 (дд, J 6.71, 14.13, 1H, H α), 5.02 (с, 2H, PhCH₂), 7.27–7.38 (с, 5H, PhCH₂), 7.40 (д, J 8.3, 1H, NH), 8.43 (д, J 7.86, 1H, NH), 12.67 (ш.с., 1H, CO₂H). Спектр ^{13}C -ЯМР: 175.97, 171.13, 170.38, 170.01, 155.63, 137.12, 128.26, 127.64, 127.57, 65.12, 52.07, 51.73, 51.59, 48.43, 38.06, 35.67; HRMS (ESI) m/z : найдено M , 411.1401; вычислено для C₁₈H₂₃N₂O₉⁺ [M + H]⁺ 411.1398.

Соединение (X) было получено по методике, описанной выше, из соединения (XIb) (0.39 г, 0.75 ммоль). Выход соединения (X) составил 0.25 г (81%).

Попытка получения соединения (I) реакцией гидролиза соединения (VII). Соединение (VII) (0.349 г, 0.83 ммоль) растворяли в 80%-ном вод-

ном этаноле (17 мл) при перемешивании. К полученному раствору добавляли 1 М водного NaOH (2.5 мл), а спустя 30 мин — вторую порцию 1 М водного NaOH (0.5 мл). Реакционную смесь перемешивали 1 ч, после чего упаривали. Остаток растворяли в воде (5 мл), полученный раствор подкисляли холодным (4°C) 2 М водным раствором NaHSO₄ до pH 3. Мутный водный раствор экстрагировали EtOAc (4 $\times$ 5 мл). Объединенные органические фазы промывали водой (3 $\times$ 3 мл) и насыщенным раствором NaCl (3 $\times$ 3 мл). Органический слой сушили (MgSO₄) в течение 16–18 ч и упаривали. Получили 0.2 г твердого вещества. По данным ^1H -ЯМР-спектроскопии, в полученном образце содержался целевой продукт (I) с примесью вероятного изомера (IV); HRMS (ESI) m/z : найдено M , 381.0944; вычислено для C₁₆H₁₇N₂O₉[−] [M − H][−] 381.0940.

***N* α -Бензилоксикарбонил- β -L-аспартил-L-аспарагиновая кислота (I).** Соединение (X) (4.52 г, 11.5 ммоль) растворяли в 80%-ном водном этаноле (200 мл) при перемешивании. К полученному раствору по каплям добавляли 1 М водного NaOH (34.5 мл), спустя 30 мин добавляли вторую порцию 1 М водного NaOH (5.8 мл), реакционную смесь перемешивали 1 ч. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в воде (30 мл) и подкисляли холодным (4°C) 2 М водным раствором NaHSO₄ до pH 3. Помутневший водный раствор экстрагировали EtOAc (4 $\times$ 40 мл). Объединенные экстракты промывали водой (3 $\times$ 20 мл) и насыщенным раствором NaCl (3 $\times$ 20 мл). Органический слой сушили (MgSO₄) и упаривали. Выход соединения (I) составил 3.1 г (72%), $R_f = 0.37$ (4 : 3 : 2 *v/v/v* IPA/EtOAc/вода). Спектр ^1H -ЯМР: 2.51–2.69 (м, 4H, H β), 4.34 (ддд, J 5.15, 8.1, 8.75, 1H, H α), 4.51 (дд, J 6.33, 14.4, 1H, H α), 5.01 (д, J 12.47, 1H, PhCH₂), 5.04 (д, J 12.57, 1H, PhCH₂), 7.2–7.48 (м, Hz, 6H, PhCH₂, NH), 8.23 (д, J 7.93, 1H, NH). Спектр ^{13}C -ЯМР: 172.91, 172.25, 171.55, 168.99, 155.75, 136.92, 128.30, 127.74, 127.61, 65.41, 50.48, 48.60, 36.64, 36.08; HRMS (ESI) m/z : найдено M , 381.0942; вычислено для C₁₆H₁₇N₂O₉[−] [M − H][−] 381.0940.

***N* α -Бензилоксикарбонил- α,β -бис-(L-диметоксiasпартил)-L-аспарагиновая кислота (XV).** Метод 1. Кислоту (VI) (267 мг, 1 ммоль) растворяли в DCM (5 мл), при перемешивании добавляли пиридин (0.192 мл, 2.4 ммоль), а затем пентафторбензилтрифторацетат (0.4 мл, 2.4 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 2 ч, полноту протекания реакции контролировали по ТСХ (90 : 8 : 2 *v/v/v* CHCl₃/MeOH/AcOH). Реакционную смесь разбавляли DCM (20 мл) и промывали 0.1 М водным NaHCO₃ (30 мл), 0.1 М водной HCl (20 мл) и водой (20 мл). Органический слой сушили MgSO₄

при перемешивании 1 ч, фильтровали и упаривали. К остатку добавляли раствор соединения (V) (413 мг, 2.1 ммоль) в DMF (4 мл), а затем NMM (0.5 мл, 4.4 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 18 ч. На следующий день в реакционную смесь добавили еще 20 мг (0.1 ммоль) соединения (V) и NMM (15 мкл), перемешивали еще 2 ч. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (70 мл), промывали 5%-ным водным KHCO₃ (30 мл), 0.1 М водной HCl (30 мл) и водой (30 мл). Органический раствор сушили над MgSO₄ и упаривали. К остатку добавляли петролейный эфир (30/50, 10 мл), выдерживали при перемешивании до окончания кристаллизации вещества, отфильтровывали и сушили в вакууме. Выход соединения (XV) составил 0.32 г (57%), т. пл. 174–177°C, лит. т. пл. 161°C [31], $R_f = 0.57$ (4 : 2 : 1 v/v/v *n*-гексан/CHCl₃/2-пропанол). Спектр ¹H-ЯМР: 2.4 (дд, *J* 15.3, 9.4, 1H, Hβ), 2.54 (дд, *J* 15.3, 4.4, 1H, Hβ), 2.67 (дд, *J* 16.2, 6.3, 1H, Hβ), 2.71 (ддд, *J* 16.6, 6.8, 1H, Hβ), 2.75 (дд, *J* 16.5, 6.3, 1H, Hβ), 2.78 (дд, *J* 16.5, 6.2, 1H, Hβ), 3.61, 3.609, 3.603 и 3.586 (4 с, 12H, 4 OCH₃), 4.37 (ддд, *J* 4.5, 8.9, 8.9, 1H, Hα Z-D), 4.64 (м, 2H, 2 Hα), 5.02 (с, 2H, PhCH₂), 6.95 (м, 0.12H, *цис*-NH-Z), 7.35 (м, 5.88H, PhCH₂ и *транс*-NH-Z), 8.30–8.50 (м, 2H, 2 NH). Спектр ¹³C-ЯМР: 171.09, 171.01, 170.93, 170.37, 170.31, 169.07, 155.58, 136.83, 128.27, 128.75, 127.63, 65.46, 52.14, 52.08, 51.60, 51.31, 48.53, 48.45, 35.64, 35.41.

Метод 2. Соединение (X) (0.205 г, 0.5 ммоль) растворяли в сухом DMF (0.5 мл) в атмосфере аргона. Раствор охлаждали до 0°C, добавляли пиридин (0.045 мл, 0.55 ммоль) и пентафторфенилтрифторацетат (0.086 мл, 1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 2 ч, полноту реакции контролировали по ТСХ (90 : 8 : 2 v/v/v CHCl₃/MeOH/AcOH). Охлаждение убирали и в реакционную смесь вносили соединение (V) (0.149 г, 0.75 ммоль), пиридин (0.061 мл, 0.75 ммоль), перемешивали в атмосфере аргона в течение 18 ч, после чего упаривали в вакууме. Остаток растворяли в смеси EtOAc (70 мл) и воды (10 мл). Водный слой отделяли, а органический слой промывали последовательно 5%-ным водным NaHCO₃ (3 × 10 мл), водой (10 мл), 0.1 М водной HCl (3 × 10 мл), водой (3 × 10 мл), насыщенным раствором NaCl (3 × 10 мл). Органический слой сушили (MgSO₄) и упаривали. Остаток перекристаллизовывали из метанола. Выход соединения (XV) составил 0.323 г (41%).

N_α-Бензилоксикарбонил-α,β-бис-(L-аспартил)-L-аспарагиновая кислота (XVI). Тетраметиловый эфир (XV) (108 мг, 0.195 ммоль) суспендировали в смеси 1.4 мл воды и 1.4 мл пропанола-2. К перемешиваемой суспензии добавляли 1 М водного NaOH (0.828 мл, 0.828 ммоль) в четырех одинаковых порциях. Реакционную смесь выдерживали в течение 18 ч при 20–25°C. Раствор разбавляли во-

дой (20 мл) и упаривали до объема 2 мл при температуре не выше 30°C. Остаток наносили на ионообменную смолу Dowex 50X4 (200–400 mesh, Ru^{+} -форма) в колонке (8 мл) и элюировали водой. Фракции, содержащие соединение (XVI), объединяли и упаривали. Остаток дважды лиофилизировали из воды. Выход тетракислоты (XVI) с содержанием пиридина 0.8 моль/моль составил 81 мг (83%), $R_f = 0.32$ (4 : 3 : 2 v/v/v 2-пропанол/MeCN/H₂O). Спектр ¹H-ЯМР: 2.44 (дд, *J* 9.7, 15.3, 1H, Hβ), 2.61 (м, 5H, 5 Hβ), 4.39 (дд, *J* 4.1, 8.9, 8.9, 1H, Hα Z-D), 4.53 (п, *J* 6.7, 2H, 2 Hα), 5.01 (с, 2H, PhCH₂), 7.27–7.40 (м, 6H, PhCH₂ и NH-Z), 8.14 (д, *J* 8.1, 1H, NH), 8.16 (д, *J* 8.1, 1H, NH), 12.54 (ш.с., 4H, C(O)OH). Спектр ¹³C-ЯМР (D₂O): 174.93, 174.80, 174.74, 174.68, 172.43, 171.43, 157.41, 136.23, 128.44, 127.83, 127.73, 67.27, 51.99, 49.85, 37.18, 36.23, 36.09; HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M*, 496.1201; вычислено для C₂₀H₂₂N₃O₁₂ [*M* – H][–] 496.1209.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан эффективный, масштабируемый и региоспецифичный метод синтеза защищенного β-разветвленного дипептида на основе аспарагиновой кислоты. Отличительные черты разработанного метода – эффективное подавление образования аспартимида в щелочных условиях за счет электростатического эффекта и использование амидной группы аспарагина в качестве защитной группы боковой цепи аспарагиновой кислоты. Для селективного превращения производных аспарагина в соответствующие кислоты предложен новый реагент – нитрит натрия в водной трифторуксусной кислоте.

Разработанный метод позволяет эффективно синтезировать ди- и трипептиды, которые находят применение в исследованиях мультивалентных взаимодействий углеводов с различными макромолекулами и могут использоваться для синтеза дендримерных карбоксилатных конструкций, изучаемых в качестве микробицидов.

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 (№ 2019 0101-2019-0014).

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. Müller Ch., Despras G., Lindhorst T.K. // Chem. Soc. Rev. 2016. V. 45. P. 3275–3302.
<https://doi.org/10.1039/C6CS00165C>
2. Korchagina E.Y., Henry S.M. // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 857–871.
<https://doi.org/10.1134/S0006297915070068>
3. Петракова Д.О., Савченко М.С., Попова И.С., Тузиков А.Б., Парамонов А.С., Чижов А.О., Бовин Н.В., Рыжов И.М. // Биоорг. химия. 2023. Т. 49. № 4. С. 422–433.
<https://doi.org/10.31857/S013234232304036X>
4. Le Quesne W.J., Young G.T. // J. Chem. Soc. 1952. P. 24–28.
<https://doi.org/10.1039/JR9520000024>
5. Lee R.T., Lin P., Lee Yu.C. // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 4255–4261.
<https://doi.org/10.1021/bi00313a037>
6. Lee R.T., Lee Yu.C. // Bioconjug. Chem. 1997. V. 8. P. 762–765.
<https://doi.org/10.1021/bc9700796>
7. Benoit N.L., Chen F.M.F., Steinauer R., Chouinard M. // Int. J. Peptide Protein Res. 1986. V. 27. P. 28–33.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1986.tb02762.x>
8. Itoh M.I. // Chem. Pharm. Bull. 1969. V. 17. P. 1679–1686.
<https://doi.org/10.1248/cpb.17.1679>
9. Ledger R., Stewart F.H.C. // Aust. J. Chem. 1965. V. 18. P. 1477–1484.
<https://doi.org/10.1071/CH9651477>
10. Nefkens G.H.L., Zwanenburg B. // Tetrahedron. 1983. V. 39. P. 2995–2998.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)92162-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)92162-3)
11. Pumpor K., Windeisen E., Spengler J., Albericio F., Burger K. // Monatsh. Chem. 2004. V. 135. P. 1427–1443.
<https://doi.org/10.1007/s00706-004-0183-9>
12. Mehrotra A.P., Webster K.L., Gani D. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1997. P. 2495–2512.
<https://doi.org/10.1039/A702407J>
13. Sánchez A., Calderón E., Vazquez A. // Synthesis. 2013. V. 45. P. 1364–1372.
<https://doi.org/10.1055/s-0032-1316848>
14. 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>
15. Roeske R. // J. Org. Chem. 1963. V. 28. P. 1251–1253.
<https://doi.org/10.1021/jo01040a022>
16. 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>
17. Gregory H., Morley J.S., Smith J.M., Smithers M.J. // J. Chem. Soc. 1968. P. 715–725.
<https://doi.org/10.1039/J39680000715>
18. Isidro-Llobet A., Álvarez M., Albericio F. // Chem Rev. 2009. V. 109. P. 2455–2504.
<https://doi.org/10.1021/cr800323s>
19. Nefkens G.H.L., Nivard R.J.F. // Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. 1965. V. 84. P. 1315–1318.
<https://doi.org/10.1002/recl.19650841013>
20. Sondheimer E., Semeraro R.J. // J. Org. Chem. 1961. V. 26. P. 1847–1849.
<https://doi.org/10.1021/jo01065a038>
21. Cosmatos A., Johnson S., Breier B., Katsoyannis P.G. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1975. P. 2157–2163.
<https://doi.org/10.1039/P19750002157>
22. Schoutissen H.A.J. // J. Am. Chem. Soc. 1933. V. 55. P. 4531–4534.
<https://doi.org/10.1021/ja01338a032>
23. Hodgson H.H., Mahadevan A.P., Ward E.R. // Org. Synth. 1948. V. 28. P. 52–54.
<https://doi.org/10.1002/0471264180.os028.21>
24. Moss R.A., Bracken K., Emge T.J. // J. Org. Chem. 1995. V. 60. P. 7739–7746.
<https://doi.org/10.1021/jo00129a012>
25. Anzeveno P.B., Creemer L.J., Daniel J.K., King C.H.R., Liu P.S. // J. Org. Chem. 1989. V. 54. P. 2539–2542.
<https://doi.org/10.1021/jo00272a015>
26. Hendrickson J.B., Kandall C. // Tetrahedron Lett. 1970. V. 11. P. 343–344.
[https://doi.org/10.1016/0040-4039\(70\)80079-X](https://doi.org/10.1016/0040-4039(70)80079-X)
27. Suzuki K., Endo N.T. // Chem. Pharm. Bull. 1978. V. 26. P. 2269–2274.
<https://doi.org/10.1248/cpb.26.2269>
28. Neumann K., Farnung J., Baldauf S., Bode J.W. // Nature Commun. 2020. V. 11. P. 982.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-14755-6>
29. Adang A.E., Duindam A.J., Brussee J., Mulder G.J., Van Der Gen A. // Biochem. J. 1988. V. 255. P. 715.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1135284/>
30. Gleich A., Schmidtcher F.P., Scheuplein S.W., Kusche A., Brückner R., Harms K. // Chem. Ber. 1990. V. 123. P. 907–915.
<https://doi.org/10.1002/cber.19901230442>
31. Niggemann M., Ritter H. // Acta Polym. 1996. V. 47. P. 351–356.
<https://doi.org/10.1002/actp.1996.010470806>
32. Akbari A., Bigham A., Rahimkhoei V., Sharifi S., Jabbari A. // Polymers. 2022. V. 14. P. 1634.
<https://doi.org/10.3390/polym14091634>
33. Armarego W.L.F., Chai C. // Purification of Laboratory Chemicals, 6th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2012.
34. Gmeiner P., Feldman P.L., Chu-Moyer M.Y., Rapoport H. // J. Org. Chem. 1990. V. 55. P. 3068–3074.
<https://doi.org/10.1021/jo00297a023>
35. 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)

Regiospecific Preparation of a Suitably Protected β -Branched Aspartic Acid Dipeptide

V. N. Azev^{*, #}, L. K. Baidakova^{*}, A. N. Chulin^{*}, A. B. Tuzikov^{**}, P. G. Kislitsyn^{***},
M. V. Molchanov^{****}, and A. I. Miroshnikov^{**}

[#]Phone: +7 (496) 773-54-42; e-mail: viatcheslav.azev@bibch.ru

^{*}Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Bioorganic Chemistry Institute, RAS, prosp. Nauki 6, Pushchino, 142290 Russia

^{**}Shemyakin-Ovchinnikov Bioorganic Chemistry Institute, RAS, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{***}CHEMRAR Group, ul. Rabochaya 2a-1, Khimki, 141401 Russia

^{****}Institute for Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, ul. Institutskaya 3, Pushchino, 142290 Russia

A new efficient synthetic approach for the preparation of N_{α} -protected β -L-aspartyl-L-aspartic acid dipeptide was elaborated. The distinctive features of the developed approach include utilization of readily available starting materials (Cbz-asparagine and dimethyl aspartate), aspartimide formation suppression employing electrostatic effect in a final deprotection step and an employment of a novel reagent (NaNO_2 /aqueous trifluoroacetic acid) for transformation of protected asparagine derivative into the corresponding aspartic acid. The developed method allows preparation of aspartic acid derivatives that find application in carbohydrate polivalent interaction studies as well as in preparation of microbicidal dendrimeric constructs.

Keywords: aspartimide formation suppression, asparagine side-chain nitrosylation, orthogonal protecting group



ПОЛУЧЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ГЛИКОЛИПИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТЕТРАСАХАРИД А (ТИП 2)¹

© 2023 г. Д. О. Петракова*, М. С. Савченко*, И. С. Попова*, А. Б. Тузиков*, А. С. Парамонов*,
А. О. Чижев**, 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

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

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 12.12.2022 г.

Принята к публикации 14.12.2022 г.

Гликолипиды — компоненты клеточной мембраны, способные к транспорту как из нее, так и в обратном направлении — из межклеточного пространства в мембрану. Последнее открывает возможность изучать функционирование гликолипидов путем их встраивания в мембрану клетки. На практике для такой цели намного удобнее использовать не природные гликолипиды, выделение которых представляет собой отдельную задачу, а их синтетические аналоги, т.к. можно варьировать их свойства, модифицируя структуру, а также вводить в их состав другие биоактивные компоненты, помимо гликанов. В данной работе описан синтез восьми синтетических аналогов гликолипидов, содержащих одну и ту же углеводную часть — тетрасахарид А (тип 2), но отличающихся строением липидной части, а также синтетических аналогов гликолипидов, несущих несколько одинаковых углеводных фрагментов. Полученная серия синтетических аналогов гликолипидов открывает возможность исследовать презентацию гликанового антигена в его узнавании антителами в условиях реального микроокружения (гликокаликса) живой клетки.

Ключевые слова: гликолипид, гликокластер, диолеилфосфатидилэтанолламин, дистеароилфосфатидилэтанолламин, дифитаноилфосфатидилэтанолламин, холестерин

DOI: 10.31857/S013234232304036X, **EDN:** ODKLJF

ВВЕДЕНИЕ

Гликолипиды (ГЛ) входят в состав плазматической мембраны, их липидный фрагмент заякоривается в липидном бислое мембраны, а гликан экспонируется наружу во внеклеточное пространство. Гликаны, входящие в состав гликолипидов, выступают частью гликокаликса клетки [1]. Гликолипиды могут покидать мембрану клетки, ранее было показано, что такой перенос происходит в основном по везикулярному механизму (отпочковывание везикул, содержащих гликолипид, от мембраны) [2]. Возможен и обратный процесс, в результате которого клетки обмениваются гликолипидами [3]. Встраивание ГЛ, при-

родных или синтетических, в мембрану открывает широкие возможности для модификации клеточного гликоландшафта [4].

Один из основных классов гликолипидов в организме человека — гликофинголипиды (гликозилцерамиды) [5]. Размер их углеводной части может варьироваться от моносахаридов до больших разветвленных гликанов, включающих до 40 моносахаридных звеньев [6, 7]. Липидная часть гликофинголипидов представляет собой аминокспирт сфингозин, в котором к одной из гидроксигрупп гликозидной связью присоединен гликан, а аминоксигруппа ацилирована остатком какой-либо жирной кислоты.

Ввиду значительного разнообразия (как по углеводной части, так и по жирной кислоте) гликофинголипидов, а также, как правило, низкого содержания в плазматической мембране, выделение таких соединений в индивидуальном виде в значительных количествах крайне затруднительно. Химический синтез полностью природных гликофинголипидов в отдельных случаях возможен [8], но практически нереален, если необходима серия таких молекул. Более того, гликофин-

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Вадима Тихоновича Иванова.

Сокращения: Ad — адипиноил; Av — аминвалериановая кислота; Chol — холестерин; CMG — *N*-карбоксиметилглицин; DOPE — диолеилфосфатидилэтанолламин; DSPE — дистеароилфосфатидилэтанолламин; DPE — дифитаноилфосфатидилэтанолламин; ГЛ — гликолипид; нГЛ — неогликолипид.

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

голипиды часто плохо растворимы в водной среде (совместимой с живыми клетками), что затрудняет их использование для модификации клеток.

Для того чтобы обойти описанные выше проблемы, были предложены синтетические аналоги гликолипидов (нГЛ, неогликолипиды; иногда их называют FSL [9]), которые содержат такую же или аналогичную углеводную часть, а вот липидная часть и связка между гликаном и липидом (т.е. спейсер) варьируются [10]. Такие модификации позволяют значительно упростить синтез гликолипидов за счет применения известных и эффективных методов конъюгации, а также улучшить физико-химические свойства получаемых молекул, например, растворимость в водных средах за счет введения в их структуру гидрофильных фрагментов [4, 9, 11].

Одним из семейств гликанов, на основе которых в лаборатории углеводов ИБХ РАН были синтезированы нГЛ, выступают антигены системы групп крови АВ0 [12], в частности тетрасахарид А (тип 2) $\text{GalNAc}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta$, представленный на эритроцитах группы крови А [13] и детерминирующий принадлежность человека к этой группе крови. Первыми нГЛ, в состав которых входит этот тетрасахарид, выступают производные (1) [14] и (2) [15] (рис. 1). Оба включают 3-аминопропилгликозид тетрасахарида А (тип 2) в качестве гликановой компоненты, диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE) в качестве липидной компоненты, но отличаются мостиком (спейсером), соединяющим эти две части.

В соединении (1) для связи гликановой и липидной частей используется остаток адипиновой кислоты (короткий Ad-спейсер), а в соединении (2) – олигопептидный спейсер, построенный из глицина и *N*-карбоксиметилглицина (так называемый CMG(2)-спейсер) [4]. Второй вариант спейсера обладал рядом преимуществ по сравнению с первым: помимо увеличения растворимости в водной среде, CMG(2)-спейсер улучшал доступность гликана для связывания с антителами, отдаляя его от экранирующего действия молекул, локализованных непосредственно на клеточной мембране [14]. Поэтому именно CMG(2)-нГЛ (2) оказался наиболее востребован в практическом применении: он использовался для определения точной углеводной специфичности антител, применяемых в гематологической практике для типирования групп крови [15], а также на его основе был разработан метод определения анти-А-антител перед АВ0-несовместимыми операциями по пересадке органов [16].

Цель данного исследования – синтез серии новых неогликолипидов, отличающихся липидной частью и спейсерной группой. Как и производные (1) и (2), все они содержат тетрасахарид А (тип 2) в качестве углеводной части, что позволило использовать всю серию нГЛ для изучения анти-А-антител. Работа выполнена в рамках дальнейшего развития технологии получения и применения нГЛ в нашей лаборатории.

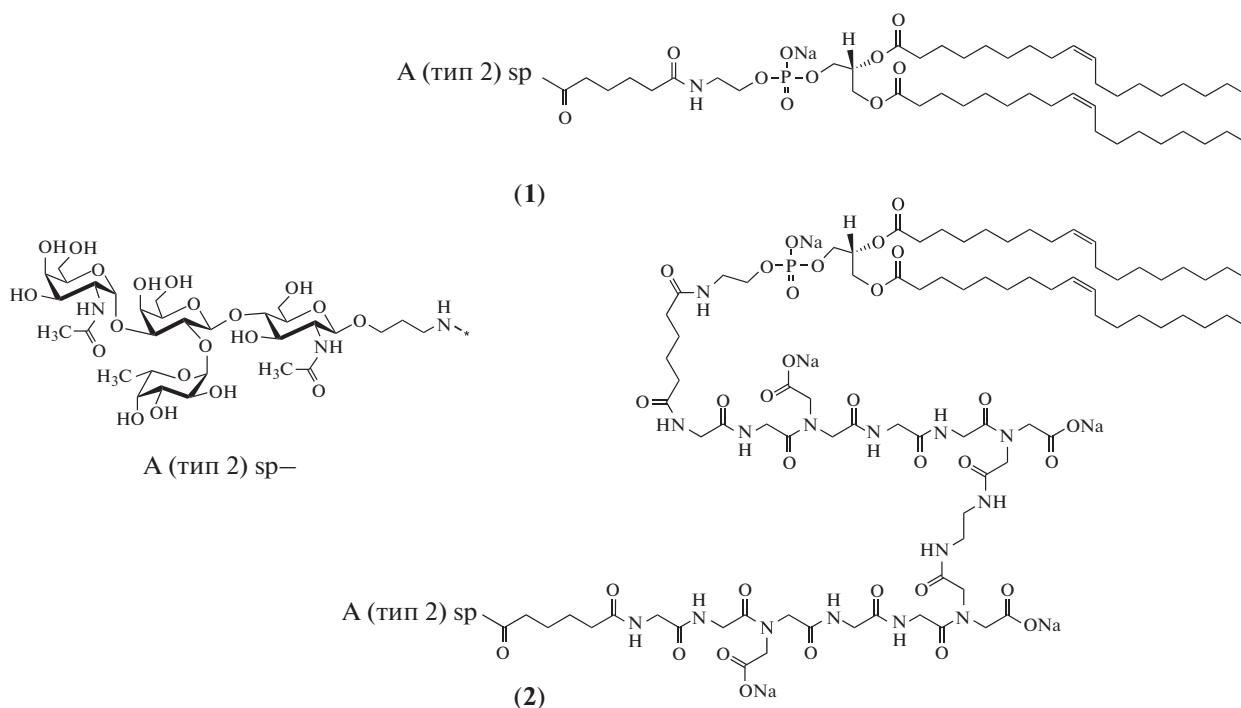


Рис. 1. Ранее синтезированные нГЛ (1) и (2) с тетрасахаридом А (тип 2) (углеводная часть) и DOPE (липидная часть). В соединении (1) использован короткий адипиновый спейсер, в соединении (2) – длинный CMG(2)-спейсер.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа посвящена получению серии новых нГЛ, имеющих общую углеводную часть — тетрасахарид А (тип 2). Проведенные структурные изменения по сравнению с двумя ранее полученными и широко используемыми неогликолипидами (1) и (2) (рис. 1) можно разделить на два типа: 1) синтез мультивалентных нГЛ с гликокластерами на основе аспарагиновой кислоты, несущими несколько остатков А (тип 2); 2) модификация липидной части — синтез нГЛ с диацилфосфатидилэтаноламинами, включающими жирные кислоты, отличные от олеиновой, а также синтез нГЛ с холестерином в качестве липидной части.

Структуру целевых неогликолипидов и промежуточных соединений подтверждали методами ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Получение кластерных нГЛ на основе аспарагиновой кислоты, несущих два, три и четыре остатка тетрасахарида А (тип 2). Поскольку гликаны природных гликофинголипидов нередко представляют собой разветвленные остатки, несущие два и более одинаковых антигенных гликана, мы синтезировали их аналоги, содержащие сразу несколько фрагментов тетрасахарида А (тип 2), т.е. мультивалентные нГЛ. Для получения таких нГЛ необходимо модифицировать спейсерную часть молекулы-предшественника так, чтобы она содержала сразу несколько потенциальных точек присоединения углеводных фрагментов (например, карбоксильные группы для конъюгации с аминопропилгликозидами) и одну потенциальную (ортогональную группам для присоединения гликанов) точку соединения с липидной частью (например, аминогруппу). Один из способов такого разветвления — использование аспарагиновой кислоты (содержит две карбоксильные и одну аминогруппу), а также дипептида и трипептида на ее основе (содержат три и четыре свободные карбоксильные группы соответственно и всегда одну аминогруппу).

В качестве исходных соединений для получения мультивалентных нГЛ использовали производные аспарагиновой кислоты [17] (3–5) (рис. 2), в которых амин был защищен бензилок-

сикарбонильной (*Z*) защитной группой. Конъюгация этих производных с 3-аминопропилгликозидом тетрасахарида А (тип 2) (6) (рис. 2) в присутствии дициклогексилкарбодиимида (DCC) и 1-гидроксibenзотриазола (HOBT) приводила к получению соответствующих гликокластеров с двумя (7), тремя (8) и четырьмя (9) остатками тетрасахарида А (тип 2) с выходами 94, 80 и 41% соответственно. На рис. 3 приведены формулы гликокластеров и целевых нГЛ, а на рис. 4 — схема получения целевых нГЛ на примере гликокластера (8) с тремя остатками тетрасахарида А (тип 2). Выделение продуктов проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле с последующей гель-хроматографией.

Полученные гликокластеры (7–9) далее подвергали гидрогенолизу для деблокирования аминогруппы удалением *Z*-защиты (рис. 4, показано на примере получения амина (11)). Соответствующие амины (10–12) (рис. 3) выделяли с выходами 84, 87 и 65% соответственно.

Целевые нГЛ, содержащие синтезированные гликокластеры, получали конъюгацией аминов (10–12) с активированным эфиром (16) [4] в смеси CH_2Cl_2 –DMF (1 : 1) в присутствии Et_3N (рис. 4, показано на примере получения нГЛ (14)) и выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле с последующей гель-хроматографией. Выходы производных (13–15) составили 64, 67 и 55% соответственно.

Получение нГЛ с DSPE и DPyPE в качестве липидной части. Липидной частью большинства нГЛ, синтезированных нами ранее, выступает диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE) [9], который позволяет проводить встраивание нГЛ в клетку эффективно и дозируемо. Чтобы изучить зависимость топологии встраивания (в какой именно участок плазматической мембраны оно происходит), легкость выхода встроенных нГЛ из клетки в составе микровезикул и некоторые другие факторы, были синтезированы нГЛ с другими липидными фрагментами, а именно диацилфосфатидилэтаноламины: дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE) и дифитаноилфосфатидилэтаноламин (DPyPE), а также холестерином. DSPE содержит два остатка стеариновой кислоты —

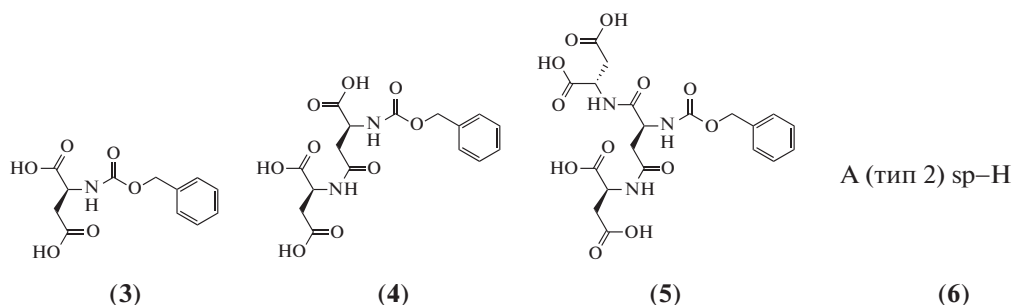


Рис. 2. Исходные соединения для получения гликокластеров: производные аспарагиновой (3), диаспарагиновой (4), триаспарагиновой кислоты (5) и 3-аминопропилгликозид тетрасахарида А (тип 2) (6).

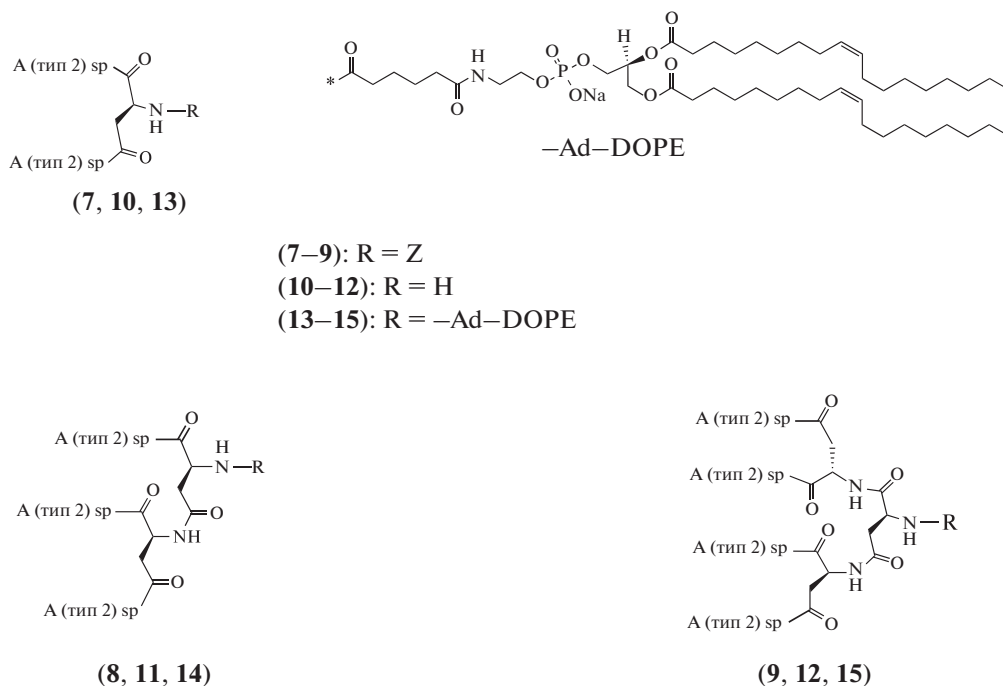


Рис. 3. Гликокластеры (7–12) и целевые нГЛ (13–15).

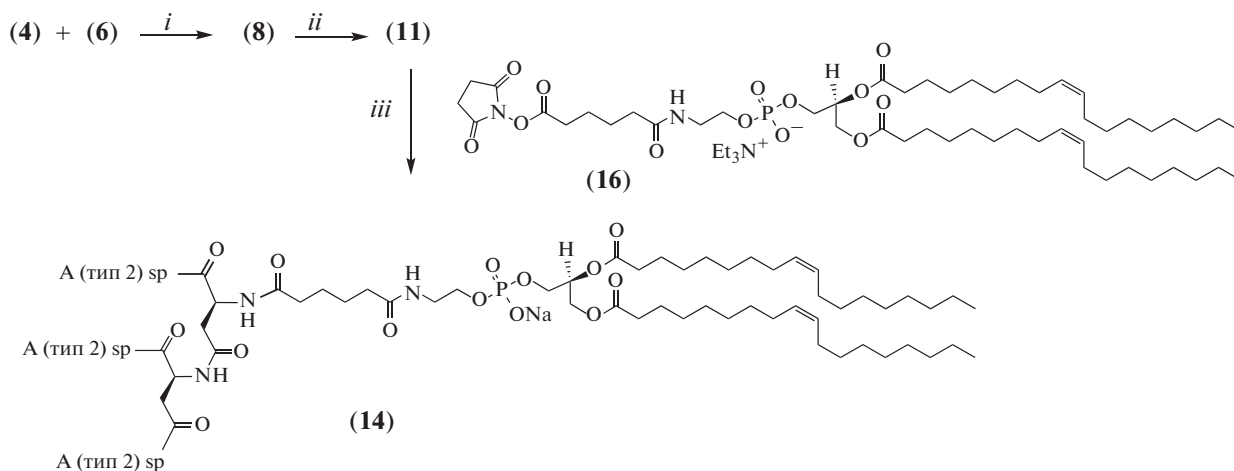


Рис. 4. Получение нГЛ (**14**). Реагенты и условия: *i* – DCC/HOBt в DMF, 80%; *ii* – H₂, Pd/C в H₂O/MeOH + NH₃ водн., 87%; *iii* – DMF, (**16**) в CH₂Cl₂, Et₃N, 67%.

насыщенного аналога олеиновой кислоты. В состав DРyPE входят остатки фитиновой кислоты — насыщенной жирной кислоты, основная цепь которой имеет четыре дополнительные метильные группы, равномерно распределенные по длине молекулы. Холестерин — один из компонентов клеточной мембраны. За счет наличия гидрофобного углеводородного остова он способен встраиваться в мембранный бислой [18, 19], что дает возможность использовать его в качестве липидной компоненты нГЛ.

Из-за наличия двух остатков насыщенной жирной кислоты DSPE, в отличие от DOPE, плохо растворяется в полярных органических раство-

рителях или смесях, содержащих такие растворители. Поэтому для получения производного **(19)** (рис. 5) была выбрана синтетическая схема, в которой DSPE **(18)** вводили на последней стадии, конъюгируя с активированным эфиром **(17)**, уже содержащим тетрасахарид А (тип 2) и адипиновый спейсер, как было описано ранее для синтеза нГЛ **(1)** [14]. В данном случае в качестве растворителя вместо смеси DMF–CH₂Cl₂ (1 : 1) использовали тройную смесь DMF–CH₂Cl₂–CH₃CN (1 : 1 : 1) для увеличения растворимости DSPE. Целевой продукт был выделен методом колоночной хроматографии на силикагеле с выходом 75%.

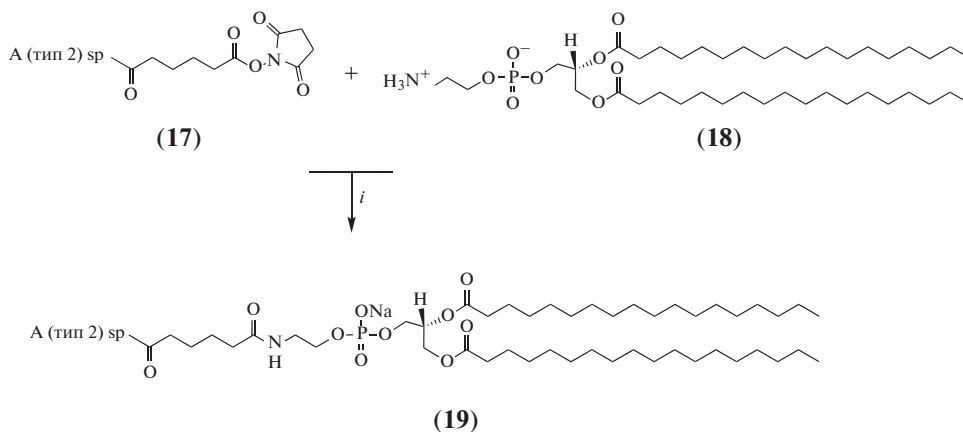


Рис. 5. Получение нГЛ (19). Реагенты и условия: *i* — а — DMF/CH₂Cl₂, Et₃N, б — NaHCO₃ водн., 75%.

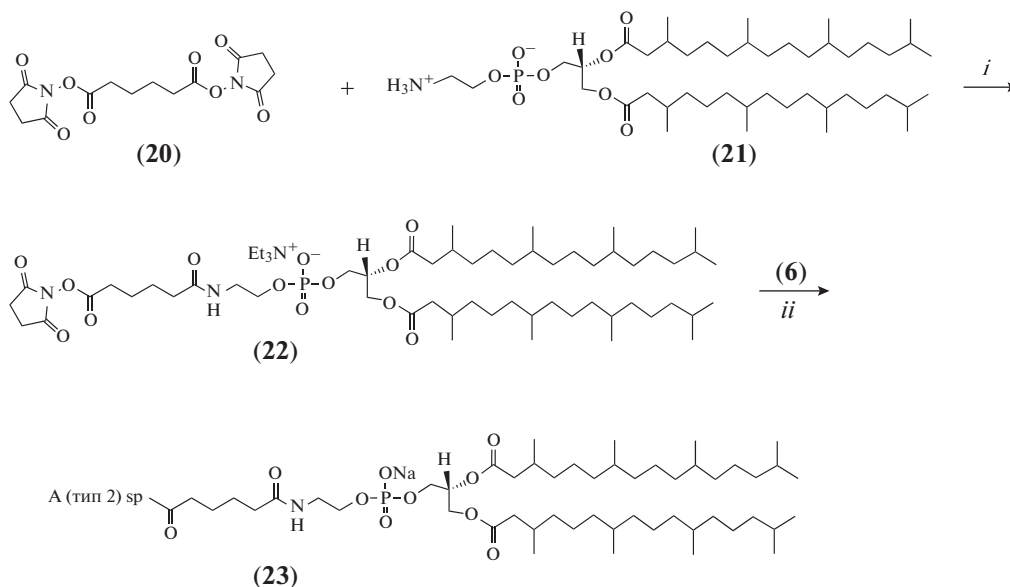


Рис. 6. Получение нГЛ (23). Реагенты и условия: *i* — DMF/CHCl₃, Et₃N; *ii* — а — DMSO/CH₂Cl₂, Et₃N, б — NaHCO₃ водн., 54%.

В отличие от DSPE, амин DPyPE (21) хорошо растворим в смесях DMSO (или DMF) с CHCl₃ (или CH₂Cl₂). Поэтому для получения производного (24) применяли подход, отличный от получения соединения (19): сначала DPyPE (21) обрабатывали значительным (10 экв.) избытком дисукцинимидного эфира адипиновой кислоты Ad(ONSu)₂ (20), чтобы получить активированный эфир (22), который выделяли гель-хроматографией с выходом 95% (рис. 6). Избыток соединения (20) был необходим для предотвращения реакции амина (21) по обоим активированным карбоксильным группам в соединении (20), т.е. образования димера DPyPE-Ad-DPyPE. Активированным эфиром (22) ацилировали аминогруппу 3-аминопропилгликозида (6). Неогликолипид (23) выделяли методом колоночной хроматогра-

фии на силикагеле и гель-хроматографией с выходом 54%.

Получение нГЛ с холестерином в качестве липидной части. В рамках данного исследования мы синтезировали три неогликолипида на основе холестерина. В наиболее простом из них, производном (25), тетрасахарид присоединен непосредственно к гидроксигруппе холестерина через карбамильную связь, что имитирует часто встречающуюся для природных ГСЛ ситуацию максимально тесного приближения гликановой части ГСЛ к плазматической мембране. Его получали конъюгацией производного (6) с хлорформиатом холестерина (24) в смеси DMF—CH₂Cl₂ в присутствии Et₃N и выделяли колоночной хроматографией на силикагеле с выходом 95% (рис. 7).

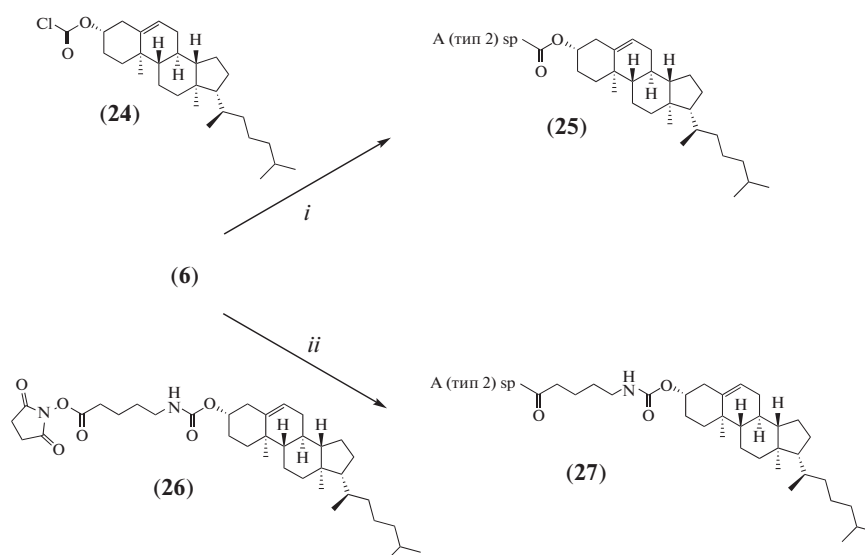


Рис. 7. Синтез нГЛ (25) и (27). Реагенты и условия: *i* – DMF/CH₂Cl₂, Et₃N, 95%, *ii* – DMF, Et₃N, 71%.

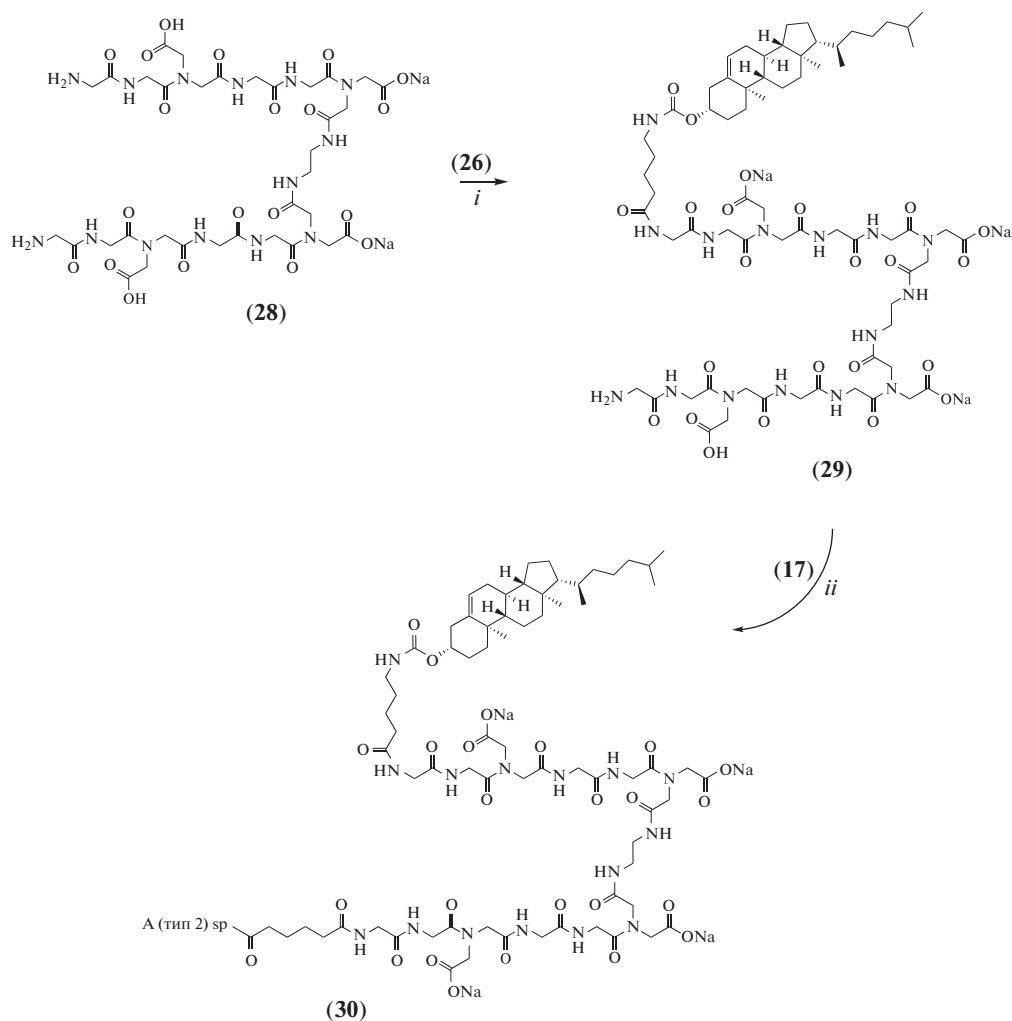


Рис. 8. Синтез нГЛ (30). Реагенты и условия: *i* – эфир (26) в DMF/CHCl₃, диамин (28) в H₂O/*i*-PrOH, Et₃N, 41%; *ii* – а – DMSO, Et₃N, б – NaHCO₃ водн., 53%.

Аналогично был получен неогликолипид (27) с короткой спейсерной группой (аминовалериановая кислота, Av) между гликаном и холестерином. Данный нГЛ был получен конъюгацией аминопропилгликозида (6) с активированным эфиром (26) [20], включающим аминовалериановую кислоту и присоединенный по ее аминогруппе холестерин, в ДМФА в присутствии Et_3N (рис. 7). Выделение неогликолипида (27) осуществляли гель-хроматографией, выход составил 71%.

Также был получен нГЛ (30), в котором тот же тетрасахарид с холестерином связывал олигопептидный CMG(2)-спейсер [4]. Синтез этого неогликолипида осуществляли в два этапа (рис. 8). Сначала активированный эфир (26) вводили в реакцию с CMG(2) диамином (28). Диамин (28) использовали в значительном избытке (4 экв.) для того, чтобы конденсация эфира (26) протекала преимущественно с одной из двух аминогрупп в диаминах (28) (и минимизировалось образование димера Chol-Av-CMG-Av-Chol). В качестве основания в реакционную смесь добавляли водный раствор NaHCO_3 . Продукт (29) выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле и гель-хроматографии с выходом 41%, после чего вводили в реакцию с активированным эфиром тетрасахарида (17). Реакцию проводили в DMSO в присутствии Et_3N , целевой нГЛ (30) был выделен гель-хроматографией с выходом 53%.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Тетрасахарид А (тип 2) (6) [13, 21], его активированный эфир (17) [14], активированный эфир (16) [4], активированный эфир (26) [20] и CMG(2)-диамин (28) [4] были получены в лаборатории углеводов ИБХ РАН по опубликованным методикам. Аспарагиновые производные (3–5) были синтезированы в филиале ИБХ в Пущино (ФИБХ) [22]. Были использованы следующие коммерчески доступные липидные производные: DOPE (Corden Pharma, Швейцария), DSPE (18) (Matreya LLC, США), DPPE (21) (Avanti Polar Lipids, США), хлорформиат холестерина (24) (Sigma, США). Остальные реагенты также были коммерчески доступны (Acros Organics, США; Sigma-Aldrich, Германия). 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 при 200–300°C (обугливание) или раствором нингидрина (для аминов, 3 г/л в смеси бутанол/уксусная кислота, 30 : 1). Колоночную хроматографию проводили на пластинках Silica gel 60 0.040–0.063 мм (Merck, Германия). Растворители упаривали на ротаторном испарителе в вакууме при 40–45°C.

^1H -ЯМР-спектры регистрировали на приборе Avance I (700 МГц; Bruker, Германия) при 30°C. Значения химических сдвигов в ^1H -ЯМР-спектрах (δ , м.д.) приведены с использованием для калибровки сигналов остаточных протонов растворителей HOD ($\delta = 4.750$), CD_2HOD ($\delta = 3.306$ в CD_3OD ; $\delta = 3.341$ в $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{OD}$ 2 : 1; $\delta = 3.354$ в $\text{CDCl}_3-\text{CD}_3\text{OD}$, 1 : 1; $\delta = 3.34$ в $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3-\text{D}_2\text{O}$, 6 : 3 : 2), константы спин-спиновой взаимодействия измерены в герцах. Спектры всех полученных соединений, содержащих тетрасахарид А (тип 2), включали следующие сигналы, соответствующие спейсированному тетрасахариду (с интегральной интенсивностью, кратной количеству гликановых фрагментов): δ 5.37 (д, $J_{1,2}$ 4.2, 1H, H-1 Fuc α), 5.20 (д, $J_{1,2}$ 3.8, 1H, H-1 GalNAc α), 4.61 (д, $J_{1,2}$ 7.7, 1H, H-1 Gal β), 4.51 (д, $J_{1,2}$ 8.5, 1H, H-1 GlcNAc β), 4.33 (кв, $J_{5,6}$ 6.6, 1H, H-5 Fuc α), 4.28–4.20 (м, 3H, кольцевые протоны), 4.06–3.99 (м, 4H, 3 кольцевых протона, $-\text{OCHHCH}_2\text{CH}_2-$), 3.94–3.90 (м, 2H, кольцевые протоны), 3.85–3.66 (м, 13H, 12 кольцевых протонов, $-\text{OCHHCH}_2\text{CH}_2-$), 3.48 (ддд, $J_{4,5}$ 10.0, $J_{5,6a}$ 6.1, $J_{5,6b}$ 2.1, 1H, H-5 GlcNAc β), 3.12–3.09 (м, 2H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2.07 (с, 3H, NC(O)CH_3), 2.06 (с, 3H, NC(O)CH_3), 2.00–1.93 (м, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.27 (д, $J_{5,6}$ 6.6, 3H, H-6 Fuc α).

^{13}C -ЯМР-спектры регистрировали на приборе Avance III (600 МГц; Bruker, Германия) при 30°C. Значения химических сдвигов в ^{13}C -ЯМР-спектрах (δ , м.д.) приведены с использованием для калибровки сигналов растворителей CD_3OD ($\delta = 48.0$) и $\text{DMSO}-d_6$ ($\delta = 48.0$).

Отнесение сигналов в ЯМР-спектрах осуществляли сопоставлением зарегистрированных спектров 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. [23].

Масс-спектры высокого разрешения (HR MS) были зарегистрированы на масс-спектрометре micrOTOF II (Bruker, Германия) с использованием техники ионизации электроспреем (ESI).

Получение нГЛ (13–15). Общая методика получения гликокластеров (7–9): к раствору тетрасахарида А (тип 2) (6) в 0.5 мл DMF добавляли раствор $\text{HOBT} \cdot \text{H}_2\text{O}$ в 0.1 мл DMF, раствор одного из аспарагиновых производных (3), (4) или (5) в 0.1 мл DMF и раствор DCC в 0.1 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 48 ч при комнатной температуре, после чего добавляли 0.5 мл воды. Выпадавшую *N,N*-дициклогексилмочевину удаляли фильтрованием, реакционную смесь упаривали, соупаривали с 1 мл толуола 2–3 раза до полного удаления DMF. Полученный остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле. Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали гель-хроматографии (Sephadex LH-20, элюция $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$, 1 : 1).

Леофильной сушкой из воды получали продукты (7), (8) или (9) в виде белой пены.

Соединение (7), исходные количества реагентов в реакционной смеси: тетрасахарид А (тип 2) (6) (15 мг, 0.019 ммоль), Z-D (3) (1.9 мг, 0.007 ммоль), HOBT · H₂O (4.3 мг, 0.022 ммоль), DCC (6.0 мг, 0.03 ммоль). Элюент для колоночной хроматографии: *i*-PrOH–CH₃CN–H₂O, 4 : 3 : 2, выход 94% (11.9 мг), *R_f* 0.43 (*i*-PrOH–CH₃CN–H₂O, 4 : 3 : 2). ¹H-ЯМР (700 МГц, D₂O, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 7.49–7.39 (м, 5H, ArH), 5.19–5.11 (м, 2H, PhCH₂–), 4.51–4.43 (м, 1H, α-H(D)), 2.80–2.69, 2.65–2.56 (2м, 2H, –CH₂– (D)).

Соединение (8), исходные количества реагентов в реакционной смеси: тетрасахарид А (тип 2) (6) (7.6 мг, 9.6 мкмоль), Z-D(D) (4) (0.90 мг, 2.4 мкмоль), HOBT · H₂O (2.2 мг, 14.4 мкмоль), DCC (3.7 мг, 18 мкмоль). Элюент для колоночной хроматографии: *i*-PrOH–CH₃CN–H₂O, 4 : 3 : 2.5, выход 80% (5.2 мг), *R_f* 0.43 (*i*-PrOH–CH₃CN–H₂O 4 : 3 : 2.5). ¹H-ЯМР (700 МГц, D₂O, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 7.49–7.40 (м, 5H, ArH), 5.19–5.13 (м, 2H, PhCH₂–), 4.65–4.53 (м, 1H, α-H(D)), 4.52–4.48 (м, 1H, α-H(D-Z)), 2.88–2.76, 2.75–2.65, 2.65–2.54 (3м, 4H, 2 –CH₂– (D)).

Соединение (9), исходные количества реагентов в реакционной смеси: тетрасахарид А (тип 2) (6) (20 мг, 0.025 ммоль), Z-D(D)D (5) (2.5 мг, 0.005 ммоль), HOBT · H₂O (5.7 мг, 0.038 ммоль), DCC (9.3 мг, 0.045 ммоль). Элюент для колоночной хроматографии: *i*-PrOH–CH₃CN–H₂O, 4 : 3 : 3, выход 41% (7.3 мг), *R_f* 0.21 (*i*-PrOH–CH₃CN–H₂O, 4 : 3 : 3). ¹H-ЯМР (700 МГц, D₂O, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 7.48–7.40 (м, 5H, ArH), 5.19–5.14 (м, 2H, PhCH₂–), 4.65–4.57 (м, 2H, 2 α-H(D)), 4.51–4.47 (м, 1H, α-H(D-Z)), 2.92–2.79, 2.77–2.67, 2.67–2.54 (3м, 6H, 3 –CH₂– (D)).

Общая методика удаления Z-группы: к раствору одного из гликокластеров (7) (12.0 мг, 6.63 мкмоль), (8) (4.9 мг, 1.8 мкмоль) или (9) (7.0 мг, 2.0 мкмоль) в 1.5 мл смеси H₂O–MeOH (1 : 1) добавляли 30 мкл NH₃ водн. (конц.), 25 мг 10% Pd/C и подвергали гидрогенолизу в атмосфере H₂ (1 атм.). Через 3 ч смесь фильтровали, фильтрат тщательно промывали смесью H₂O–MeOH (1 : 1), маточный раствор концентрировали и фильтровали через плотный слой ваты, чтобы удалить остатки Pd/C. Полученный раствор концентрировали и подвергали леофильной сушке из воды, в результате получили продукты (10), (11) или (12) в виде белой пены.

Соединение (10): выход 84% (9.3 мг), *R_f* 0.37 (MeOH–1 М Py · HOAc водн., 4 : 1). ¹H-ЯМР (700 МГц, D₂O с добавлением эквимольного соединения (10) количества CF₃COOH, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 4.29 (дд, *J* 6.9, 6.0, 1H, α-H(D)), 2.93–2.86 (м, 2H, –CH₂– (D)); HRESIMS: найдено *m/z* 1676.7004, рассчитано для C₆₆H₁₁₃N₇O₄₂, [*M* + H]⁺ 1676.6994; найдено *m/z* 838.8545, рассчитано для C₆₆H₁₁₃N₇O₄₂, [*M* + 2H]²⁺ 838.8534; найдено *m/z* 849.8454, рассчитано для C₆₆H₁₁₃N₇O₄₂, [*M* + H + Na]²⁺ 849.8443; найдено *m/z* 857.8321, рассчитано для C₆₆H₁₁₃N₇O₄₂, [*M* + H + K]²⁺ 857.8313; найдено *m/z* 860.8359, рассчитано для C₆₆H₁₁₃N₇O₄₂, [*M* + 2Na]²⁺ 860.8353; найдено *m/z* 868.8227, рассчитано для C₆₆H₁₁₃N₇O₄₂, [*M* + Na + K]²⁺ 868.8223.

Соединение (11): выход 87% (4 мг), *R_f* 0.18 (*i*-PrOH–CH₃CN–H₂O, 4 : 3 : 4). ¹H-ЯМР (700 МГц, D₂O с добавлением эквимольного соединения (11) количества CF₃COOH, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 4.68–4.65 (м, 1H, α-H(D)), 4.32–4.29 (м, 1H, α-H(D-H)), 3.02–2.91, 2.77–2.72, 2.69–2.64 (3м, 2H, 1H, 1H, 2 –CH₂– (D)); HRESIMS: найдено *m/z* 1282.5324, рассчитано для C₁₀₁H₁₇₁N₁₁O₆₄, [*M* + 2H]²⁺ 1282.5321; найдено *m/z* 855.3580, рассчитано для C₁₀₁H₁₇₁N₁₁O₆₄, [*M* + 3H]³⁺ 855.3572.

Соединение (12): выход 65% (4.4 мг), *R_f* 0.31 (MeOH–1 М Py · HOAc водн., 5 : 1), ¹H-ЯМР (700 МГц, D₂O с добавлением эквимольного соединения (12) количества CF₃COOH, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 4.71–4.64 (м, 2H, 2 α-H(D)), 4.29–4.26 (м, 1H, α-H(D-H)), 2.97–2.64 (м, 6H, 3 –CH₂– (D)); HRESIMS: найдено *m/z* 1150.8095, рассчитано для C₁₃₆H₂₂₉N₁₅O₈₆, [*M* + 3H]³⁺ 1150.8086; найдено *m/z* 1725.7089, рассчитано для C₁₃₆H₂₂₉N₁₅O₈₆, [*M* + 2H]²⁺ 1725.7092.

Общая методика конъюгации кластеров активированным эфиром (16): к раствору одного из кластеров (10), (11) или (12) в 0.5 мл DMF добавляли раствор активированного эфира (16) в 0.5 мл CH₂Cl₂ и Et₃N. После окончания реакции смесь концентрировали, соупаривали с 1 мл толуола 3–4 раза до полного удаления DMF и подвергали колоночной хроматографии на силикагеле. Фракции, содержащие требуемый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали гель-хроматографии (Sephadex LH-20, элюция CH₃CN–H₂O 1 : 1). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали леофильной сушке из воды. Полученный остаток растворяли в 1 мл H₂O, титровали 50 мМ водным раствором NaHCO₃ до pH 6.5–6.7 и снова подвергали

лиофильной сушке, в результате получили целевой нГЛ (**13**), (**14**) или (**15**) в виде белой пены.

Соединение (**13**): исходные количества реагентов: соединение (**10**) (7.2 мг, 4.3 мкмоль), соединение (**16**) (4.2 мг, 4.3 мкмоль), Et₃N (0.65 мкл, 4.7 мкмоль), время протекания реакции 18 ч, элюент для колоночной хроматографии CH₂Cl₂–EtOH–H₂O, 3 : 5 : 1, выход 64% (7.0 мг), *R_f* 0.27 (CH₂Cl₂–EtOH–H₂O, 3 : 5 : 1). ¹H-ЯМР (700 МГц, CD₃OD–CDCl₃–D₂O, 6 : 3 : 2, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 5.40–5.34 (м, 4Н, 2 HC=CH), 5.29–5.25 (м, 1Н, –OCH₂–CHO–CH₂O–), 4.68 (дд, *J* 8.1, 6.1, 1Н, α-Н(D)), 4.59 (дд, *J* 7.8, 11.5, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.22 (дд, *J* 7.6, 12.2, 1Н, м, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.01–3.84 (м, 4Н, РО–CH₂–CH₂–NH–, CH₂–ОР), 2.71 (дд, 1Н, *J* 14.7, 6.1, –СНН– (D)), 2.60 (дд, 1Н, *J* 14.7, 8.1, –СНН– (D)), 2.39–2.33 (м, 4Н, 2 CH₂–C(O), 2.32–2.25 (м, 4Н, C(O)CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)), 2.09–1.98 (м, 8Н, 2 CH₂CH=CHCH₂), 1.69–1.58 (м, 8Н, 2 CH₂–CH₂–C(O), C(O)CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)), 1.40–1.27 (м, 40Н, –CH₂–), 0.91 (т, *J* 7.0, 6Н, 2 –CH₃). ¹³C-ЯМР (151 МГц, DMSO-*d*₆–D₂O 4 : 1): δ 173.0, 172.2, 171.9, 171.3, 171.2, 170.4 (C=O), 130.0 и 129.9 (C=C DOPE), 101.5 и 101.4 (C-1 Galβ), 101.2 и 101.1 (C-1 GalNAcα), 99.4 и 99.3 (C-1 GlcNAcβ), 92.5 и 92.4 (C-1 GalNAcα), 78.2, 76.5, 75.9, 75.7, 73.8, 72.7, 72.2, 71.7, 71.0, 70.3, 69.4, 69.1, 68.4, 67.8, 67.3, 66.6, 63.4, 61.9, 60.9, 60.4, 59.6, 55.6, 50.0, 39.5 (DMSO), 32.0, 29.8, 29.6, 29.4, 29.3, 27.3, 27.2, 25.3, 25.0, 23.3, 23.2, 23.0, 22.8, 21.3, 16.7 (C-6 Fucα), 14.3 (CH₃ DOPE); HRESIMS: найдено *m/z* 2529.2753, рассчитано для C₁₁₃H₁₉₇N₈O₅₂P, [*M* – H][–] 2529.2714; найдено *m/z* 1264.1338, рассчитано для C₁₁₃H₁₉₇N₈O₅₂P, [*M* – 2H]^{2–} 1264.1321; найдено *m/z* 842.4213, рассчитано для C₁₁₃H₁₉₇N₈O₅₂P, [*M* – 3H]^{3–} 842.4190.

Соединение (**14**): исходные количества реагентов: соединение (**11**) (4.0 мг, 1.6 мкмоль), соединение (**16**) (1.5 мг, 1.6 мкмоль), Et₃N (0.25 мкл, 1.7 мкмоль), время протекания реакции 18 ч, элюент для колоночной хроматографии CH₂Cl₂–EtOH–H₂O, 2 : 5 : 1, выход 67% (3.7 мг), *R_f* 0.5 (CH₂Cl₂–EtOH–H₂O, 2 : 5 : 1). ¹H-ЯМР (700 МГц, CD₃OD–CDCl₃–D₂O, 6 : 3 : 2, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 5.40–5.34 (м, 4Н, 2 HC=CH), 5.29–5.25 (м, 1Н, –OCH₂–CHO–CH₂O–), 4.71–4.65 (м, 2Н, 2 α-Н(D)), 4.60–4.57 (м, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.22 (дд, *J* 7.6, 12.3, 1Н, м, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.03–3.84 (м, 4Н, РО–CH₂–CH₂–NH–, CH₂–ОР), 2.84–2.78, 2.76–2.67, 2.66–2.59 (3м, 4Н, 2 –CH₂– (D)), 2.40–2.33 (м, 4Н, 2 –CH₂–C(O)), 2.32–2.25 (м, 4Н, C(O)CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)), 2.08–2.01 (м, 8Н, 2 CH₂CH=CHCH₂), 1.68–1.60 (м, 8Н,

2 CH₂–CH₂–C(O), C(O)CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)), 1.41–1.28 (м, 40Н, –CH₂–), 0.91 (т, *J* 7.1, 6Н, 2 –CH₃); HRESIMS: найдено *m/z* 1707.3105, рассчитано для C₁₄₈H₂₅₅N₁₂O₇₄P, [*M* – 2H]^{2–} 1707.3093.

Соединение (**15**): исходные количества реагентов: соединение (**12**) (3.0 мг, 0.87 мкмоль), соединение (**16**) (0.84 мг, 0.87 мкмоль), Et₃N (0.13 мкл, 0.96 мкмоль), время протекания реакции 48 ч, элюент для колоночной хроматографии CHCl₃–MeOH–H₂O, 2 : 6 : 1, выход 55% (2.1 мг), *R_f* 0.43 (CHCl₃–MeOH–H₂O, 2 : 6 : 1). ¹H-ЯМР (700 МГц, CD₃OD–CDCl₃–D₂O, 6 : 3 : 2, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 5.40–5.34 (м, 4Н, 2 HC=CH), 5.29–5.25 (м, 1Н, –OCH₂–CHO–CH₂O–), 4.71–4.64 (м, 3Н, 3 α-Н(D)), 4.60–4.57 (м, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.22 (дд, *J* 7.5, 12.1, 1Н, м, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.02–3.84 (м, 4Н, РО–CH₂–CH₂–NH–, CH₂–ОР), 3.10–3.04, 2.95–2.85, 2.78–2.59 (3м, 6Н, 3 –CH₂– (D)), 2.40–2.33 (м, 4Н, 2 –CH₂–C(O), 2.32–2.25 (м, 4Н, C(O)CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)), 2.09–2.01 (м, 8Н, 2 CH₂CH=CHCH₂), 1.68–1.59 (м, 8Н, 2 CH₂–CH₂–C(O), C(O)CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)), 1.41–1.28 (м, 40Н, –CH₂–), 0.91 (т, *J* 7.1, 6Н, 2 –CH₃); HRESIMS: найдено *m/z* 2150.9899, рассчитано для C₁₈₃H₃₁₃N₁₆O₉₆P, [*M* – 2H]^{2–} 2150.9880; найдено *m/z* 1433.6585, рассчитано для C₁₈₃H₃₁₃N₁₆O₉₆P, [*M* – 3H]^{3–} 1433.6563; найдено *m/z* 1074.9926, рассчитано для C₁₈₃H₃₁₃N₁₆O₉₆P, [*M* – 4H]^{4–} 1074.9904.

Получение нГЛ (19**).** К смеси 4.4 мг (5.9 мкмоль) DSPE (**18**) и 0.5 мл CH₂Cl₂ добавляли раствор 5.5 мг (5.4 мкмоль) активированного эфира тетрасахарида А (тип 2) (**17**) в 0.5 мл DMF, 0.1 мкл (0.8 мМ) Et₃N и 0.5 мл CH₃CN. Через 48 ч смесь концентрировали и соупаривали с 1 мл толуола 4 раза до полного удаления DMF. Полученный остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (элюция CHCl₃–EtOH–H₂O, 6 : 5 : 0.7). Фракции, содержащие чистый продукт, концентрировали, подвергали лиофильной сушке из воды, полученный остаток растворяли в 1 мл H₂O, титровали 50 мМ водным раствором NaHCO₃ до pH 6.5 и снова подвергали лиофильной сушке, в результате получили целевой нГЛ (**19**) в виде белой пены с выходом 75% (6.7 мг), *R_f* 0.29 (CHCl₃–EtOH–H₂O, 6 : 5 : 0.7). ¹H-ЯМР (700 МГц, CD₃OD–CDCl₃ 1 : 1, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 5.26–5.23 (м, 1Н, –OCH₂–CHO–CH₂O–), 4.45 (дд, *J* 12.1, 3.2, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.20 (дд, *J* 6.7, 12.0, 1Н, –ССООНСН–CHO–CH₂O–), 4.04–3.93 (м, 2Н, РО–CH₂–CH₂–NH–), 3.96–3.89 (м, 2Н, CH₂–ОР), 2.36–2.30 (м, 4Н, 2 –CH₂–C(O), 2.28–2.22 (м, 4Н, C(O)CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)), 1.68–1.59 (м, 8Н,

2 $\text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—C(O)}$, $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)}$, 1.37–1.25 (м, 56H, $-\text{CH}_2-$), 0.89 (т, J 7.1, 6H, 2 $-\text{CH}_3$); HRESIMS: найдено m/z 1645.9442, рассчитано для $\text{C}_{78}\text{H}_{143}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{P}$, $[\text{M} - \text{H}]^-$ 1645.9452; найдено m/z 822.4696, рассчитано для $\text{C}_{78}\text{H}_{143}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{P}$, $[\text{M} - 2\text{H}]^{2-}$ 822.4690.

Получение нГЛ (23). К раствору 31 мг (0.091 ммоль) дисукцинимидного эфира адипиновой кислоты (20) и 2.5 мкл (0.018 ммоль) Et_3N в смеси 2 мл CHCl_3 и 50 мкл DMF при перемешивании по каплям добавляли раствор DPyPE (21) (10 мг, 0.012 ммоль) в 0.2 мл CHCl_3 . Через 2 ч смесь концентрировали, а остаток подвергали гель-фильтрации (Sephadex LH-20, элюция $\text{CHCl}_3\text{—MeOH}$, 1 : 1, 0.1% AcOH), в результате получили 12.1 мг (95%) активированного эфира (22) в виде белой пены, R_f 0.70 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{—EtOH—H}_2\text{O}$, 6 : 5 : 0.5).

К раствору аминопропилгликозида тетрасахарида А (тип 2) (6) (7.7 мг, 0.010 ммоль) в 0.4 мл DMSO добавляли раствор активированного эфира (22) (12.1 мг, 0.012 ммоль) в 0.4 мл CH_2Cl_2 и Et_3N (1.7 мкл, 0.012 ммоль). Через 2 ч реакционную смесь подвергали гель-хроматографии (Sephadex LH-20, элюция $\text{CHCl}_3\text{—MeOH}$, 1 : 1), фракции, содержащие требуемый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (элюция $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{—EtOH—H}_2\text{O}$, 6 : 5 : 0.5). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали лиофильной сушке из воды. Полученный остаток растворяли в 1 мл воды, титровали 50 мМ водным раствором NaHCO_3 до pH 6.5 и снова подвергали лиофильной сушке, в результате получили целевой нГЛ (23) в виде белой пены с выходом 54% (9.2 мг), R_f 0.33 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{—EtOH—H}_2\text{O}$, 6 : 5 : 0.5). ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{CD}_3\text{OD—CDCl}_3$, 1 : 2, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 5.27–5.22 (м, 1H, $-\text{OCH}_2\text{—CHO—CH}_2\text{O—}$), 4.46–4.42 (м, 1H, $-\text{CCOONCH—CHO—CH}_2\text{O—}$), 4.21–4.16 (м, 1H, $-\text{CCOONCH—CHO—CH}_2\text{O—}$), 4.01–3.96 (м, 2H, $\text{PO—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH—}$), 3.95–3.89 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{—OR}$), 2.38–2.30 (м, 2H, 2 $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{—CHN—C(O)}$), 2.28–2.19 (м, 4H, $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)}$), 2.16–2.08 (м, 2H, 2 $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{—CHN—C(O)}$) 1.97–1.89 (м, 2H, 2 $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{—CH}_2\text{—C(O)}$), 1.68–1.62 (м, 4H, $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)}$), 1.53 (дп, J 13.3, 6.7, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.41–1.04 (м, 40H, 18 $-\text{CH}_2-$, 4 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$), 0.96–0.92 (м, 6H, 2 $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{—CHN—C(O)}$), 0.89–0.83 (м, 24H, 8 $-\text{CH}_3$); HRESIMS: найдено m/z 1702.0046, рассчитано для $\text{C}_{82}\text{H}_{151}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{P}$, $[\text{M} - \text{H}]^-$ 1702.0078; найдено m/z 850.4993, рассчитано для $\text{C}_{82}\text{H}_{151}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{P}$, $[\text{M} - 2\text{H}]^{2-}$ 850.5003; найдено m/z 1704.0192, рассчитано для $\text{C}_{82}\text{H}_{151}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{P}$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1704.0224; найдено m/z 1726.0018, рассчитано для $\text{C}_{82}\text{H}_{151}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{P}$, $[\text{M} +$

$+\text{Na}]^+$ 1726.0043; найдено m/z 1747.9830, рассчитано для $\text{C}_{82}\text{H}_{151}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{P}$, $[\text{M} - \text{H} + 2\text{Na}]^+$ 1747.9862.

Получение нГЛ (25). К раствору аминопропилгликозида тетрасахарида А (тип 2) (6) (2.0 мг, 2.5 мкмоль) в 0.5 мл DMF добавляли раствор холестерилхлорформата (24) (1.4 мг, 3.0 мкмоль) в 0.2 мл CH_2Cl_2 и 0.4 мкл (3 мкмоль) Et_3N . Через час реакционную смесь концентрировали и соупаривали 2 раза с *o*-ксилолом до полного удаления DMF. Остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (элюция $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{—EtOH—H}_2\text{O}$, 6 : 5 : 1), фракции, содержащие чистый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали гель-хроматографии (Sephadex LH-20, элюция $\text{CHCl}_3\text{—MeOH}$, 1 : 1). Чистые фракции снова объединяли, концентрировали и подвергали лиофильной сушке из воды, в результате получили 95% (3.2 мг) продукта в виде белой пены, R_f 0.45 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{—EtOH—H}_2\text{O}$, 6 : 5 : 1). ^1H -ЯМР (700 МГц, $\text{CD}_3\text{OD—CDCl}_3$, 1 : 1, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 5.39 (м, 1H; $=\text{CH}$), 4.43 (м, 1H, OCH), 2.38–2.28 (м, 2H, $=\text{CH—CH}_2-$), 2.00 (м, 1H), 1.89 (м, 1H), 1.68–1.27 (м, 14H), 1.20–0.97 (м, 13H), 0.94 (д, 3H, J 6.6 Гц; CH_3), 0.88 (д, 3H, J 6.6 Гц; CH_3), 0.87 (д, 3H, J 6.6 Гц; CH_3), 0.71 (с, 3H; CH_3); HRESIMS: найдено m/z 1202.6785, рассчитано для $\text{C}_{59}\text{H}_{99}\text{N}_3\text{O}_{22}$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1202.6793; найдено m/z 1224.6604, рассчитано для $\text{C}_{59}\text{H}_{99}\text{N}_3\text{O}_{22}$, $[\text{M} + + \text{Na}]^+$ 1224.6612; найдено m/z 1240.6385, рассчитано для $\text{C}_{59}\text{H}_{99}\text{N}_3\text{O}_{22}$, $[\text{M} + \text{K}]^+$ 1240.6352.

Получение нГЛ (27). К раствору аминопропилгликозида тетрасахарида А (тип 2) (6) (5.8 мг, 7.3 мкмоль) в 0.5 мл DMF добавляли раствор активированного эфира (26) (4.7 мг, 7.5 мкмоль) в 0.2 мл DMF и 2.0 мкл (15 мкмоль) Et_3N . Через 3 ч реакционную смесь подвергали гель-хроматографии (Sephadex LH-20, элюция $\text{CHCl}_3\text{—MeOH}$, 2 : 1). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли, концентрировали и подвергали лиофильной сушке из воды, в результате получили 8.6 мг (71%) продукта (27) в виде белой пены, R_f 0.23 ($\text{CHCl}_3\text{—MeOH—H}_2\text{O}$, 19 : 8 : 1). ^1H -ЯМР (700 МГц, CD_3OD , 30°C): δ 5.38 (м, 1H; $=\text{CH}$), 4.36 (м, 1H; OCH), 3.09 (т, 2H, J 6.9 Гц; CH_2N аминновалериановой кислоты), 2.20 (т, 2H, J 7.5 Гц; CH_2CO аминновалериановой кислоты), 2.05 (м, 1H), 1.97 (м, 1H), 1.87 (м, 1H), 1.73 (м, 1H), 1.64–1.27 (м, 16H), 1.12–0.97 (м, 13H), 0.94 (д, 3H, J 6.6; CH_3), 0.881 (д, 3H, J 6.6; CH_3), 0.877 (д, 3H, J 6.6; CH_3), 0.72 (с, 3H; CH_3); HRESIMS: найдено m/z 1301.7477, рассчитано для $\text{C}_{64}\text{H}_{108}\text{N}_4\text{O}_{23}$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1301.7477; найдено m/z 1323.7294, рассчитано для $\text{C}_{64}\text{H}_{108}\text{N}_4\text{O}_{23}$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 1323.7297; найдено m/z 1339.7034, рассчитано для $\text{C}_{64}\text{H}_{108}\text{N}_4\text{O}_{23}$, $[\text{M} + \text{K}]^+$ 1339.7036; найдено m/z 651.3777, рассчитано для $\text{C}_{64}\text{H}_{108}\text{N}_4\text{O}_{23}$, $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 651.3775.

Получение нГЛ (30). К тщательно перемешиваемому раствору активированного эфира (26) (46.7 мг, 0.0745 ммоль) в смеси DMF и CHCl_3 (1.5 мл и 0.5 мл) добавляли раствор CMG(2)-диамина (28) (304 мг, 0.298 ммоль) в смеси H_2O и *i*-PrOH (1.4 мл и 1 мл) и 1 М NaHCO_3 (0.596 мл, 0.596 ммоль). Смесь перемешивали в течение часа, затем нейтрализовали 34 мл AcOH и упаривали досуха. Колоночной хроматографией на силикагеле (элюция CHCl_3 – MeOH – H_2O , 2 : 6 : 1 $\rightarrow$ 1 : 3 : 1), гель-хроматографией (Sephadex LH-20, элюция MeOH – H_2O , 1 : 2) и лиофильной сушкой из воды получали 48 мг (41% в расчете на эфир (26)) амина (29) в виде белой пены, R_f 0.61 (CHCl_3 – MeOH – H_2O , 1 : 3 : 1). ^1H -ЯМР (700 МГц, D_2O – CD_3OD , 2 : 1): δ 5.40 (м, 1H; =CH холестерина), 4.40 (м, 1H; OCH холестерина), 4.29–3.90 (32H; 4 CH_2COO , 12 NCH_2CO ; CMG), 3.38 (м, 4H; $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.12 (т, J 6.5, 2H; CH_2N остатка аминовалериановой кислоты), 2.36 (т, J 7.5; CH_2CO остатка аминовалериановой кислоты), 2.33 (м, 2H; O–C– CH_2 –C=C холестерина), 2.06, 1.99 и 1.88 (м, 5H; холестерин и остаток аминовалериановой кислоты), 1.66–0.96 (31H; холестерин и остаток аминовалериановой кислоты), 0.90 (д, J 6.6, 3H; CH_3 холестерина), 0.89 (д, J 6.2, 3H; CH_3 холестерина), 0.73 (с, 3H; CH_3 холестерина); HRESIMS: m/z найдено 766.8646, рассчитано для $\text{C}_{67}\text{H}_{105}\text{N}_{15}\text{O}_{23}$ [$M + 2\text{Na}$] $^{2+}$ 766.8646.

К раствору активированного эфира (17) (11.3 мг, 0.0111 ммоль) в 1 мл DMSO добавляли производное (29) (13.3 мг, 8.56 мкмоль) и Et_3N (1.2 мкл, 8.6 мкмоль) тремя равными порциями каждые 2 ч. Через 14 ч после добавления последней порции (29) реакционную смесь подвергали гель-хроматографии (Sephadex LH-20, H_2O –*i*-PrOH, 2 : 1, 0.5% $\text{Py} \cdot \text{HOAc}$), выделенный продукт лиофилизировали из воды 2 раза, затем растворяли в 1 мл воды, титровали 50 мМ водным раствором NaHCO_3 до pH 6.5 и снова подвергали лиофильной сушке, в результате получали 53% (11.2 мг) целевого нГЛ (30) в виде белой пены, R_f 0.38 (CHCl_3 – MeOH – H_2O , 2 : 6 : 1). ^1H -ЯМР (700 МГц, D_2O – CD_3OD , 2 : 1, кроме сигналов, соответствующих спейсерированному тетрасахариду А (тип 2), приведенных выше): δ 5.44 (с, 1H; =CH холестерина), 4.38 (м, 1H; OCH холестерина), 4.29–3.90 (м, 32 H; 4 CH_2COO , 12 NCH_2CO из CMG(2)), 3.13 (т, 2H, J 6.9, 6.9 Гц; CH_2N аминовалериановой кислоты), 2.36 (м, 5H; CH_2CO аминовалериановой кислоты и 3H холестерина), 2.27 (м, 2H), 2.02–1.76 (м, 6H), 1.67–1.29 (м, 17H), 1.22–0.95 (м, 13H), 0.887 (д, 3H, J 6.6; CH_3 холестерина), 0.883 (д, 3H, J 6.6; CH_3 холестерина), 0.72 (с, 3H; CH_3 холестерина). ^{13}C -ЯМР (176 МГц, D_2O – CD_3OD , 2 : 1): δ 176.64, 176.62, 176.6, 176.0, 175.6, 175.0, 174.5, 174.0 (C=O), 171.8–170.6 (C=O CMG(2)), 157.6 (N(C=O)O), 147.7 (C=CH Chol), 130.0 (C=C Chol), 101.2 (C-1 Gal β), 100.3 (C-1

Fuc α), 98.7 (C-1 GlcNAc β), 91.5 (C-1 GalNAc α), 76.5, 75.8, 75.4, 75.3, 72.5, 72.3, 71.8, 71.2, 70.1, 68.7, 68.0, 67.9, 67.6, 66.8, 63.2, 61.4, 61.2, 60.2, 55.5, 53.0, 52.5, 52.4, 49.6, 48.0 (метанол), 42.3, 40.8, 39.4, 38.5 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 36.4, 36.1, 35.4, 35.1, 31.8, 28.6, 27.7, 25.0, 24.6, 22.4, 22.1, 21.9, 20.9, 18.9, 18.5, 15.2 (C-6 Fuc α), 14.2 (CH_3 Chol); HRESIMS: найдено m/z 1239.0330, рассчитано для $\text{C}_{104}\text{H}_{162}\text{N}_{18}\text{O}_{45}\text{Na}_4$, [$M + 2\text{H}$] $^{2+}$ 1239.0354; найдено m/z 1261.0159, рассчитано для $\text{C}_{104}\text{H}_{162}\text{N}_{18}\text{O}_{45}\text{Na}_4$, [$M + 2\text{Na}$] $^{2+}$ 1261.0174; найдено m/z 848.3431, рассчитано для $\text{C}_{104}\text{H}_{162}\text{N}_{18}\text{O}_{45}\text{Na}_4$, [$M + 3\text{Na}$] $^{3+}$ 848.3413.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирована серия из восьми аналогов гликолипидов, содержащих константный углеводный фрагмент – тетрасахарид А (тип 2), но отличающихся строением липидного участка и спейсера (его длины, что особенно важно); кроме того, синтезированы варианты гликолипидов с кластером из одинаковых углеводных фрагментов – 2–4 остатков тетрасахарида А (тип 2).

Столь представительный набор встраиваемых в мембрану проб дает возможность изучения функционирования природных гликофинголипидов клетки – кинетики встраивания в клетку, распределения встроенных гликолипидов в мембране, включения их в клеточные микровезикулы и многого другого.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 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.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reitsma S., Slaaf D.W., Vink H., Van Zandvoort M.A.M.J., Oude Egbrink M.G.A. // Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 2007. V. 454. P. 345–359. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0212-8>
2. 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>

3. Marcus D.M., Cass L.E. // *Science*. 1969. V. 164. P. 553–555.
<https://doi.org/10.1126/science.164.3879.553>
4. 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>
5. Miller-Podraza H. // *Chem. Rev.* 2000. V. 100. P. 4663–4681.
<https://doi.org/10.1021/cr990347o>
6. Koscielak J. // *Transfus. Med.* 2001. V. 11. P. 267–279.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3148.2001.00317.x>
7. Karlsson H., Johansson L., Miller-Podraza H., Karlsson K.A. // *Glycobiology*. 1999. V. 9. P. 765–778.
<https://doi.org/10.1093/glycob/9.8.765>
8. Morales-Serna J.A., Boutureira O., Díaz Y., Matheu M.I., Castillón S. // *Carbohydr. Res.* 2007. V. 342. P. 1595–1612.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.03.028>
9. Korchagina E.Y., Henry S.M. // *Biochem.* 2015. V. 80. P. 857–871.
<https://doi.org/10.1134/S0006297915070068>
10. 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>
11. Henry S. // *ISBT Sci. Ser.* 2020. V. 15. P. 303–309.
<https://doi.org/10.1111/voxs.12545>
12. Ryzhov I.M., Bovin N.V. // *Mendeleev Commun.* 2019. V. 29. P. 597–612.
<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2019.11.001>
13. Ryzhov I.M., Korchagina E.Y., Popova I.S., Tyrtyshev 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. 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>
15. Barr K., Korchagina E., Ryzhov I., Bovin N., Henry S. // *Transfusion*. 2014. V. 54. P. 2477–2484.
<https://doi.org/10.1111/trf.12661>
16. Perry H., Bovin N., Henry S. // *Transfusion*. 2019. V. 59. P. 2131–2140.
<https://doi.org/10.1111/trf.15247>
17. Lee R.T., Lee, Y.C. // *Bioconjug. Chem.* 1997. V. 8. P. 762–765.
<https://doi.org/10.1021/bc9700796>
18. Chiu S.W., Jakobsson E., Mashl R.J., Scott H.L. // *Biophys. J.* 2002. V. 83. P. 1842–1853.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)73949-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73949-0)
19. Smondyrev A.M., Berkowitz M.L. // *Biophys. J.* 1999. V. 77. P. 2075–2089.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77049-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77049-9)
20. 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>
21. Tyrtyshev 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>
22. Азев В.Н., Байдакова Л.К., Чулин А.Н., Тузиков А.Б., Кислицын П.Г., Молчанов М.В., Мирошников А.И. // *Биоорг. химия*. 2023. Т. 49. № 4. С. 411–421.
<https://doi.org/10.31857/S0132342323040279>
23. 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 Synthetic Analogs of Glycolipids Containing A (Type 2) Tetrasaccharide

D. O. Petrakova*, M. S. Savchenko*, I. S. Popova*, 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

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

Glycolipids are the components of cellular membrane containing glycan and lipid parts. Transport of glycolipids from membrane and *vice versa* from extracellular space into the membrane is possible. This opens opportunity for modification of cellular membrane via embedding of glycolipids. In practice, synthetic analogs of glycolipids are significantly more convenient than natural glycolipids for such application, as the properties of the synthetic analogs can be varied and other bioactive components besides glycans can be introduced into their structure. This research describes synthesis of the eight synthetic glycolipids containing the same glycan part – A (type 2) tetrasaccharide but varying in the composition of lipid part or including several glycan residues. Obtained set of synthetic glycolipids will allow to study the influence of structural variations on the ability to present tetrasaccharide antigen on the cellular surface.

Keywords: glycolipid, glycocluster, dioleoylphosphatidylethanolamine, distearoylphosphatidylethanolamine, diphytanoylphosphatidylethanolamine, cholesterol



УДК 578.74:577.112.6:577.115.7

СИНТЕЗ ЛИПОСОМ, КОНЬЮГИРОВАННЫХ С CpG-ОЛИГОНУКЛЕОТИДОМ И НАГРУЖЕННЫХ НАБОРОМ Т-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ ВИРУСА SARS-CoV-2¹

© 2023 г. Д. С. Третьякова*, Т. Л. Ажикина*, И. А. Болдырев*,
Е. В. Свищевская*, Е. Л. Водовозова*.*

*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 17.01.2023 г.

После доработки 21.01.2023 г.

Принята к публикации 23.01.2023 г.

Описан синтез липидного конъюгата иммуностимуляторного олигодезоксирибонуклеотида CpG-ODN (PD-CpG-DOPE). Получены липосомы, нагруженные композицией Т-клеточных эпитопов коронавируса SARS-CoV-2 (7 пептидов) и несущие в мембране конъюгат PD-CpG-DOPE, в том числе препарат лиофилизированных липосом, пригодный для длительного хранения. В экспериментах *in vitro* на клетках перитонеального экссудата мышей показана тенденция к увеличению иммуногенности липосом с пептидами при введении в липидный бислой конъюгата PD-CpG-DOPE, по сравнению с добавлением (коммерческого) фосфоротиоатного производного CpG-ODN в растворе.

Ключевые слова: Т-клетки, эпитопы, SARS-CoV-2, вакцины, пептиды, липосомы, CpG-ODN

DOI: 10.31857/S0132342323040437, **EDN:** OEDGQI

ВВЕДЕНИЕ

Пептидные вакцины представляют интерес в качестве альтернативы вакцинам на основе полноразмерных антигенов или других молекул патогенного происхождения, которые могут содержать онкогенные последовательности; они безопаснее вакцин на основе белков или РНК в отношении аллергических и аутоиммунных реакций (обзоры [1, 2]). Для предотвращения преждевременной деградации пептиды можно заключать в наноразмерные носители, в том числе липосомы [2–4]. Иммуногенность вакцин на основе липосом с инкапсулированными или связанными с поверхностью специфическими пептидами показана в доклинических исследованиях [5–8].

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Вадима Тихоновича Иванова.

Сокращения: APCs – антиген-презентирующие клетки (antigen-presenting cells); Chol – холестерин; CpG-ODN – олигодезоксирибонуклеотид, содержащий мотивы CpG; DOPE – 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфэтаноламин; ePC – яичный фосфатидилхолин; Mal – 3-малеимидопропионил; MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex); PD-CpG-DOPE – липидный конъюгат олигодезоксирибонуклеотида (с немодифицированными фосфодиэфирными связями); SARS-CoV-2 – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2; TLRs – Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors).

Автор для связи (тел.: 8 (495) 330-66-10; эл. почта: elvod@lipids.ibch.ru).

Адьювантные свойства липосом как таковых можно усилить (или направить по пути того или иного типа иммунного ответа) с помощью иммуностимуляторов – специфических лигандов, которые вызывают активацию рецепторов антиген-презентирующих клеток (APCs), распознающих патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs) [3, 4, 9]. Одними из PAMPs являются неметирированные CpG-мотивы бактериальных ДНК, т.к. они гораздо реже содержатся в хромосомах эукариот. CpG-мотивы синтетических олигонуклеотидов (CpG-ODN) распознаются рецептором TLR-9, который экспрессируется в мембранах эндосом В-клеток, моноцитов, НК-клеток, дендритных клеток и макрофагов [5, 10]. В результате стимулируется выработка провоспалительных цитокинов и хемокинов, повышается экспрессия MHCII и костимуляторных молекул (CD40, CD80, CD83, CD86).

Различные варианты CpG-ODN широко используются в доклинических исследованиях в форме фосфоротиоатных производных, устойчивых к действию нуклеаз, но запрещенных для применения в клинике из-за токсичности. Инкапсулирование CpG-ODN во внутренний водный объем липосом (или других систем доставки лекарств) позволяет частично решить проблему ферментативной устойчивости фосфодиэфирных связей [5, 11, 12]. В то же время желательно, чтобы CpG-ODN был экспонирован снаружи вакцин-

ной конструкции для взаимодействия с рецептором на поверхности APCs [13]. Химическая конъюгация с макромолекулами значительно увеличивает устойчивость олигонуклеотидов (ODN) к действию нуклеаз [5, 14–16], например, конъюгат CpG-ODN с белком-антигеном предложено сорбировать на поверхности катионных липосом [17]. Другая стратегия – встраивание в бислой липосом конъюгата CpG-ODN с липидом [18, 19].

Недавно на основании анализа публикаций результатов полногеномного иммуноинформатического анализа Т-клеточных эпитопов коронавируса SARS-CoV-2 (штамм Ухань), а также ряда клинических исследований иммунодоминантных эпитопов у выздоравливающих после заболевания COVID-19 пациентов нами были отобраны и синтезированы нонамерные эпитопы CD8⁺-Т-лимфоцитов из состава структурных, вспомогательных и неструктурных белков вируса (13 пептидов) и 15-мерный эпитоп CD4⁺-Т-лимфоцитов из S-белка [20]. В результате анализа специфической эффективности нескольких композиций из 6–7 пептидов и их липосомальных формуляций в тестах на выработку IFN-γ (интерферон гамма) и TNF-α (фактор некроза опухоли альфа) спленоцитами после иммунизации интактных мышей в сочетании с фосфоротиоатным производным CpG-ODN были выявлены две перспективные формуляции [20].

Цель данной работы – синтез липидного конъюгата PD-CpG-ODN (олигонуклеотид с фосфодиэфирными связями), встраивание его в мембрану липосом, несущих одну из выявленных формуляций пептидов во внутреннем водном объеме, и первичная оценка иммуногенности полученных липосом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что для сохранения иммуностимуляторной активности 3'-модификация PD-CpG-ODN предпочтительна по сравнению с 5'-модификацией из-за большей устойчивости радикала ODN к действию экзонуклеаз [21]. Липидное производное PD-CpG-ODN 1826 (TCCATGACGTTCCCTGACGTT) – олигонуклеотида, специфичного к TLR-9 мыши, – синтезировали конъюгацией 3'-SH-модифицированного ODN с *N*-maleimido-пропионильным производным 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (Mal-DOPE, рис. 1a). Для деблокирования SH-группы исходный реагент PD-CpG-ODN, модифицированный по 3'-фосфату гексил-6-дителигексан-1-олом, обрабатывали избытком трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP) при pH 7.0, затем подкисляли уксусной кислотой и выделяли 3'-SH-PD-CpG-ODN гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-15 в водно-метанольной фазе при pH ~3.5. Продукт вводили в реакцию с 8-кратным избытком Mal-DOPE в системе вода–изопропанол 2 : 1 (или 1 : 1), при этом изначально гетерогенный раствор стал про-

зрачным при доведении pH до 6.0–6.5. Избыток липида экстрагировали 10-кратным объемом подкисленного этилацетата, высаживая целевой продукт центрифугированием. Структура полученного конъюгата PD-CpG-DOPE подтверждена спектром ¹H-ЯМР.

Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях также свидетельствует об образовании конъюгата ODN (молекулярные массы PD-CpG-DOPE и исходного реагента PD-CpG-ODN равны 7149 и 6386 соответственно без учета катионов) (рис. 1б). Полоса на уровне чуть ниже полосы исходного реагента PD-CpG-ODN (рис. 1б, дорожки 1, 2), вероятнее всего, свидетельствует о примеси в нем немодифицированного олигонуклеотида, который на 266 Да легче. Эта примесь обнаруживается и в исходном PD-CpG-ODN (рис. 1б, дорожки 3, 4). Важно отметить, что эффективность проявления липидного конъюгата ODN бромистым этидием должна быть ниже, чем исходного реагента или немодифицированного ODN из-за образования мицелл, затрудняющих формирование двухцепочечных фрагментов ДНК.

Липосомы с композицией из семи пептидов (их перечень и принадлежность к вирусным белкам приведены в сноске 1 к табл. 1) получали методом экструзии через поры 200 нм, как описано ранее [20]. Формировали бислой из яичного фосфатидилхолина (ePC), холестерина (Chol) и 0.2 мольн. % PD-CpG-DOPE. Высокий процент холестерина (33%) обеспечивает формирование прочной мембраны липосом с жидкокристаллической упорядоченной фазой липидного бислоя [22]. Изотонический раствор сахарозы вместо хлорида натрия вводили в буфер как для повышения растворимости пептидов, так и в качестве криопротектора для получения лиофилизата липосом.

Характеристики липосом с инкапсулированными пептидами приведены в табл. 1. Для определения включения пептидов в липосомы использовали ультрафильтрацию в варианте ступенчатой диафильтрации: дисперсии концентрировали в ~2 раза, разбавляли до исходного объема, вновь концентрировали и затем еще дважды повторяли цикл. Эффективность загрузки липосом составила ~50% от исходно взятого количества пептидов, что коррелирует с результатами других авторов [6, 7, 23–25]. При получении вакцины обычно не освобождают от свободных антигенов (белков, пептидов) во избежание потерь целевого материала за счет сорбции при гель-фильтрации или ультрафильтрации и при последующем концентрировании [7, 24, 25].

Включение PD-CpG-DOPE в липосомы (без пептидов), по данным ультрафильтрации, составило 97%; возможно, примесь немодифицированного ODN (см. выше) внесла вклад в 3% потерь в водную фазу. Анализ фракций после гель-хроматографии липосом L_{P-CpG-DOPE} с помощью электрофореза в ПААГ также подтвердил вклю-

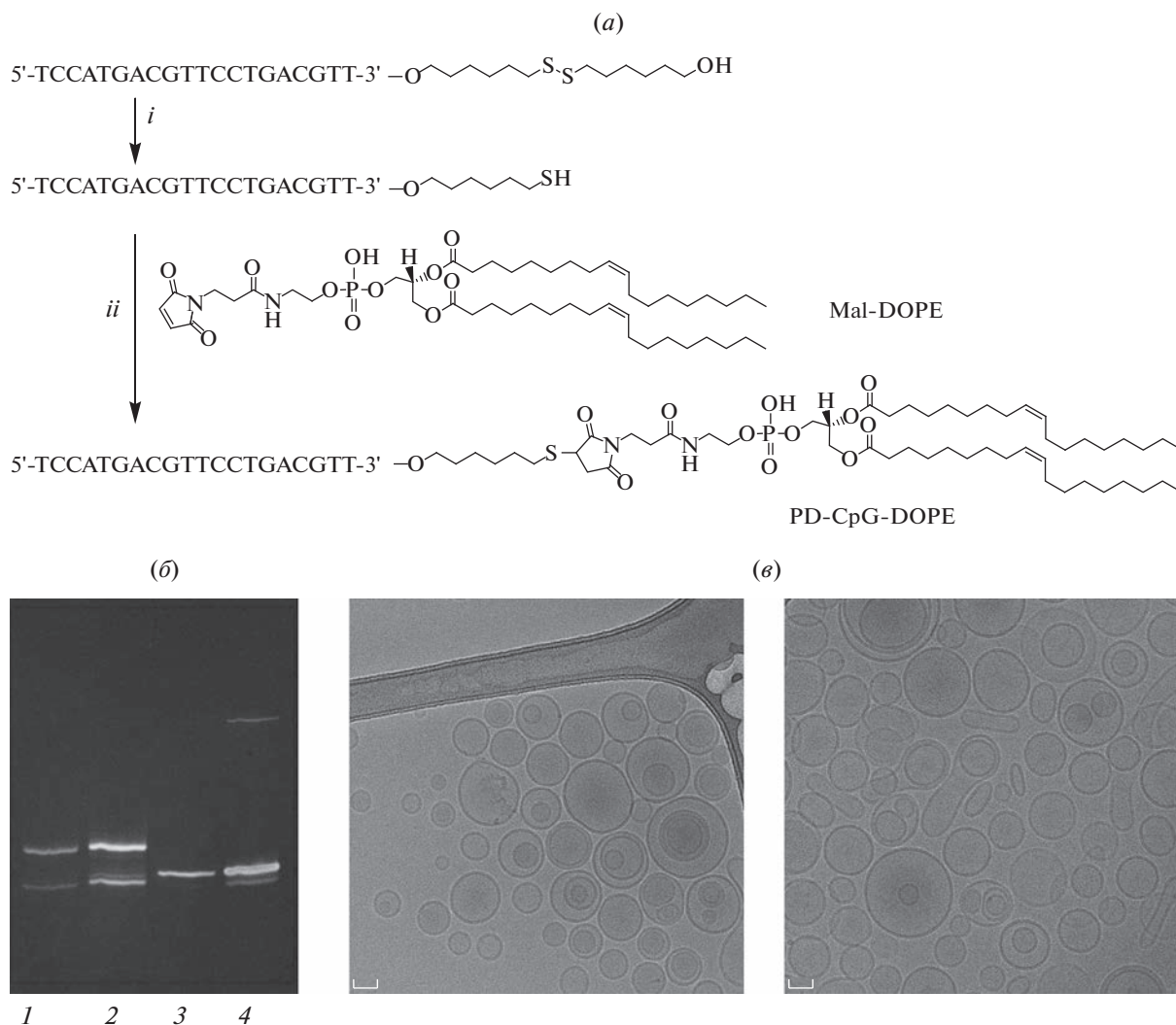


Рис. 1. (a) – Синтез липидного конъюгата PD-CpG-ODN (PD-CpG-DOPE): *i* – TCEP, pH 7.0; *ii* – H₂O–*i*PrOH, 2 : 1, pH 6.5; (б) – электрофореграммы PD-CpG-DOPE (дорожки 1, 2 – разведения отличаются в 10 раз) и исходного реагента PD-CpG-ODN (дорожки 3, 4), 12%-ный ПААГ, денатурирующие условия – 7 М мочевины; (в) – криоэлектронные микрофотографии липосом, нагруженных пептидами и несущих PD-CpG-DOPE (**L_P-CpG-DOPE**), до (слева) и после лиофилизации и регидратации (справа). Масштабный отрезок – 50 нм.

чение конъюгата ODN в липосомы (данные не приведены).

Для длительного хранения дисперсии липосом подвергали лиофилизации, а затем восстанавливали регидратацией соответствующим объемом воды. По характеристикам липосом после лиофилизации и регидратации, приведенным в табл. 1, можно заключить, что лиофилизация – подходящий метод хранения вакцинных конструкций, т.к. восстановленные формуляции липосом не претерпели существенных изменений в размерах и включении пептидов. Анализ структуры липосом с помощью криогенной просвечивающей электронной микроскопии также подтверждает сохранение их целостности, отдельных невезикулярных частиц не наблюдается (рис. 1в).

Оценку иммуногенности композиции пептидов и липосомальных формуляций *in vitro* прово-

дили на клетках перитонеального экссудата конвенциональных мышей. После стимуляции клеток препаратами в течение 48 ч анализировали экспрессию маркера активации макрофагов, дендритных клеток и В-клеток CD80 методом проточной цитометрии. Все исследуемые препараты стимулировали экспрессию CD80 (рис. 2).

Максимальный эффект, как и ожидалось, показала композиция пептидов вне липосом, т.к. в эксперименте *in vitro* обеспечивается прямой контакт антигенов с APCs (кроме того, отсутствуют пептидазы биологических жидкостей). В ряду липосом наблюдается тенденция к последовательному росту иммуногенности при добавлении в формуляции пептидов и ODN. Максимальную экспрессию CD80 вызвала формуляция липосом, конъюгированных с CpG-олигонуклеотидом **L_P-CpG-DOPE**.

Таблица 1. Характеристики липосом с инкапсулированными пептидами¹

Образец	Состав (липиды, мольн. %)	ζ -Потенциал (мВ) $\pm$ SD ²	До лиофилизации			После лиофилизации и регидратации		
			диаметр (нм) $\pm$ SD ³	PDI $\pm$ SD ³	включение пептидов (%) $\pm$ SE ⁴	диаметр (нм) $\pm$ SD ³	PDI $\pm$ SD ³	включение пептидов (%) ⁴
L _K	ePC–Chol, 67 : 33	–2.8 $\pm$ 0.5	185.2 $\pm$ 1.3	0.112 $\pm$ 0.020	—	170.2 $\pm$ 2.6	0.090 $\pm$ 0.018	—
L _P	ePC–Chol, 67 : 33, пептиды	н.о.	191.2 $\pm$ 1.9	0.075 $\pm$ 0.021	55.6 $\pm$ 4.4	168.0 $\pm$ 4.0	0.095 $\pm$ 0.022	51.9
L _P -CpG-DOPE	ePC–Chol–PD-CpG-DOPE, 67 : 33 : 0.2, пептиды	–18.9 $\pm$ 1.7	180.4 $\pm$ 1.4	0.052 $\pm$ 0.014	48.5 $\pm$ 5.2	161.1 $\pm$ 1.6	0.056 $\pm$ 0.022	43.5

¹ VGYLQPRTF (S-белок, 267–275 а.о.), YVYSRVKNL (белок оболочки E, 56–64 а.о.), KTFPPTEPK (нуклеокапсидный белок N, 361–369 а.о.), ATEGALNTPK (N-белок, 134–143 а.о.), ATSRTLSYYK (M-белок, 171–179 а.о.), TTDPSFLGRY (Orf1a, 1637–1646 а.о.), SYGFQPTNGVGYQPY (S-белок, 494–508 а.о.).

² По данным измерений на установке Litesizer 500 (Anton Paar GmbH, Австрия) для липосом без пептидов; буфер 10 mM KCl, 1 mM K₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, pH 7.0.

³ По данным измерений на установке Brookhaven 90PLUS Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corp., США).

⁴ Рассчитано по формуле: $[1 - (\text{масса невключившихся пептидов в смывах после ультрафильтрации}) / (\text{масса исходно взятых пептидов для инкапсулирования в липосомы})] \times 100\%$. По данным измерения оптической плотности при 273 нм, $n = 3-5$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. Пептиды получены твердофазным синтезом с применением стратегии Fmoc/*трет*-бутил на тритилхлоридполистирольном полимере, как описано в работе Kryukova et al. [26], и любезно предоставлены Н.С. Егоровой (ИБХ РАН). Олигонуклеотид CpG-ODN 1826 (фосфоротиоатное производное) любезно предоставлен В.А. Гушиным (“НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи”). 2,5-Диоксопирролидин-1-ил-3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)про-

паноат синтезировали, как описано Magano et al. [27]. Использовали PD-CpG-ODN 1826, 3'-модифицированный гексил-6-дитиогексанолом, производства ООО “Синтол” (Россия); фосфатидилхолин яичного желтка (ePC, Lipoid E PC S), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE) и холестерин (Chol) производства Lipoid GmbH (Heidelberg, ФРГ) квалификации USP (United States Pharmacopeia); сахарозу и этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA; Panreac, Испания); сефарозу CL-4В и сефадекс G-15 (Pharma-

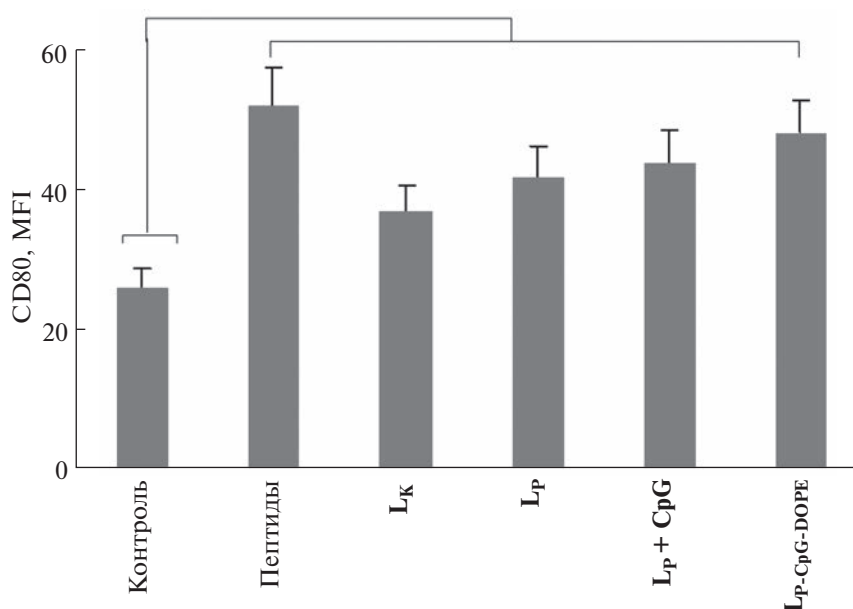


Рис. 2. Влияние препаратов липосом на экспрессию CD80 клетками перитонеального экссудата мышей. Обозначения образцов приведены в табл. 1. Образец L_P + CpG – липосомы с пептидами (L_P) и добавленным раствором CpG-ODN 1826 (фосфоротиоатное производное) в количестве, эквивалентном содержанию в образце L_P-CpG-DOPE. Показаны средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) $\pm$ SE. Достоверные отличия ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) отмечены скобками.

cia, США); силикагель 90 (КСКГ 0.063–0.200 мм, ООО “ХромЛаб”, Россия); остальные реагенты производства фирм Sigma и Flow Laboratories (США). Для ультрафильтрации использовали концентраторы Vivaspin 2 300000 MWCO (Sartorius, ФРГ; 2300 об/мин). Растворители очищали стандартными методами; упаривание проводили в вакууме при температуре не выше 40°C. ТСХ выполняли на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, Германия). ¹H-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Avance 700 (Bruker, США) с рабочей частотой 700 МГц при постоянной температуре образца 303 К; химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.), в качестве внутреннего стандарта использовали остаточные сигналы протонов растворителя CD₃OD (3.325 м.д.).

Синтез липидного конъюгата PD-СрG-ODN 1826 (PD-СрG-DOPE). Малеимидное производное диолеоилфосфатидилэтаноламина (Mal-DOPE) получали, вводя в реакцию 237 мг (0.32 ммоль) DOPE, 86.8 мг (0.384 ммоль) 2,5-диоксопирролидин-1-ил-3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропаноата и 38.8 мг (0.384 ммоль) триэтиламина в 5 мл сухого хлороформа. Перемешивали реакционную смесь в течение ночи. Продукт выделяли хроматографией на колонке с силикагелем (2.4 × 20 см) в системе CH₂Cl₂–MeOH, 8 : 2. Выход 93%. Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃/CD₃OD 1 : 1; δ, м.д.; КССВ – J, Гц): 7.598 (с; CHCl₃), 6.77 (с, 2H; CH=CH малеимида), 5.34 (м, 4H; 2 CH=CH DOPE), 5.25 (м, 1H; H-2 глицерина), 4.43 (дд, J 12.0, 3.3, 1H; OCH глицерина), 4.19 (дд, J 12.0, 6.7, 1H; OCH' глицерина), 4.00 (т, J 6.0, 2H; CH₂O этаноламина), 3.91 (м, 2H; POCH₂ глицерина), 3.81 (т, J 7.1, 7.1, 2H; CH₂ βAla), 3.40 (т, J 6.0, 2H; NCH₂ этаноламина), 3.344 (м, J 1.6; CD₃OD), 2.51 (т, J 7.1, 7.1, 2H; CH₂CO βAla), 2.33 (м, 4H; 2 COCH₂ DOPE), 2.03 (м, 8H; 2 CH₂–CH=CH–CH₂ DOPE), 1.62 (м, 4H; 2 COCH₂CH₂ DOPE), 1.30 (м, 40H; 20 CH₂ DOPE), 0.89 (т, J 7.0, 7.0, 6H; 2 CH₃ DOPE).

Исходный 3'-модифицированный реагент PD-СрG-ODN (8 мг, 1.253 мкмоль) растворяли в 540 мкл H₂O, добавляли 290 мкл водного раствора ТСЕР·HCl с концентрацией 50 мг/мл (50 мкмоль) и 150 мкл 1 М NaHCO₃ (до pH ~7). Перемешивали реакционную смесь в течение 1 ч, выделялся тиогексанол (запах). Затем добавляли 4 мкл AcOH, наносили смесь на колонку с сефадексом G-15 (1.0 × 15 см), уравновешенную системой H₂O–MeOH, 2 : 1, с 0.1% AcOH и элюировали деблокированный 3'-SH-PD-СрG-ODN в свободном объеме; состав фракций контролировали на пластинках для ТСХ под УФ-лампой. Продукт высушивали в вакууме (7 Па), растворяли в 600 мкл H₂O и добавляли раствор 9 мг Mal-DOPE в 300 мкл изопропанола. К реакционной смеси добавляли 1 М NaHCO₃ до pH 6.5 (~50 мкл) и перемешивали 1.5 ч. Реакционную смесь разбавляли 10 мл этилацетата с 30 мкл AcOH, осадок целевого

продукта отделяли центрифугированием при 4000–5000 g (8–10 мин). Осадок экстрагировали еще дважды 10 мл этилацетата с 30 мкл AcOH. Полноту экстракции контролировали ТСХ. Спектр ¹H-ЯМР (D₂O/CD₃OD, 1 : 1; δ, м.д.): 8.40–7.48 (м, 23H; 7 H₆ T, 4 H₈ G, 6 H₆ C, 3 H₂ и 3 H₈ A), 6.37–5.86 (м, 26H; 6 H₅ C, 20 H_{1'} 2-дезоксирибозы), 5.31 (м, 5H; 2 CH=CH и 2-CH глицерина), 5.05–4.82 (м, ~20H; 20 H_{3'} 2-дезоксирибозы), 4.46–3.75 (м, ~69H; 20 H_{4'} и 20 H_{5'} и 20 H_{5''} 2-дезоксирибозы, 4H глицерина, OCH₂CH₂N, NCH₂ βAla, CH₂S-CH), 3.39 (м, 4H; OCH₂ C₆-линкера, OCH₂CH₂N), 3.325 (м, CD₃OD), 3.29 (м, 2H; CH₂CO цикл сукцинил), 2.82–1.97 (м, ~60H; 20 H_{2'} и H_{2''} 2-дезоксирибозы, 8 CH₂ DOPE, CH₂CO βAla, CH₂S линкера), 1.91–1.77 (м, 21H; 7 Me₅ T), 1.64–1.55 (м, 8H; 4 CH₂ линкера), 1.31 (м, ~40H; 20 CH₂ Ole), 0.90 (м, 6H; 2 CH₃ Ole). Химические сдвиги протонов азотистых оснований и 2-дезоксирибозы коррелируют с данными Germann [28].

Электрофорез PD-СрG-DOPE. Для анализа эффективности образования липидного конъюгата ODN использовали электрофоретическое разделение продуктов реакции в 12%-ном ПААГ (соотношение акриламид – N,N'-метиленбисакриламид 29 : 1) в 1× TBE-буфере. К образцам добавляли 2× буфер для нанесения, содержащий бромфеноловый синий, 1× TBE, формамид (50%, v/v; Sigma, Германия). Перед нанесением образцы прогревали 5 мин при 90°C, затем остужали во льду. Разделение в ПААГ проводили при 20°C и напряженности электрического поля 15–20 В/см. ODN-конъюгаты визуализировали вымачиванием геля в растворе бромистого этидия (0.5 мкг/мл в 1× TBE) с последующим фотографированием в УФ-свете при 260 нм.

Получение липосомальных формуляций пептидов. Индивидуальные пептиды в виде солей с трифторуксусной кислотой растворяли в фосфатном буфере с изотоническим раствором сахарозы PB-Suc, pH 7.2 (6.25 mM Na₂HPO₄, 1.3 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 240 mM сахароза, H₂O_{dd}). Готовили раствор смеси пептидов, где конечная концентрация каждого из пептидов составляла 1 mM. Раствор замораживали в жидком азоте (–196°C) и хранили при –20°C до применения.

Раствор ePC–Chol (67 : 33, мольн.) в трет-бутаноле замораживали и лиофилизировали 12 ч при давлении ~3 Па (лиофильная сушилка ИНЕЙ-4; ИБП РАН, Россия). В случае формуляции L_{TP}-СрG-DOPE в раствор липидов добавляли 0.2 мольн. % конъюгата PD-СрG-DOPE (аликвота из раствора 10 мг/мл в tBuOH–H₂O, 60 : 40). Дальнейшие процедуры получения липосом, определения их размеров и эффективности включения пептидов проводили, как описано ранее [20]. Включение PD-СрG-DOPE в липосомы (без пептидов) оценивали, измеряя оптическую плотность при 260 нм в смывах после ультрафильтрации; молярный коэффициент

экстинкции CpG-ODN ($181\,100\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) рассчитывали с помощью калькулятора на сайте <https://www.novoprolabs.com/tools/oligo-calculation>.

Липосомальные формуляции в концентрациях, предназначенных для вакцинаций ($\sim 40\text{ мкг/мл}$ по суммарным липидам), сохраняли стабильность не менее трех недель при $4\text{--}8^\circ\text{C}$. Криогенную просвечивающую электронную микроскопию выполняли на установке Titan Krios 60-300 (Thermo Fisher Scientific, США) в ФГБУ “Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”.

Выделение клеток перитонеального экссудата мышей. Самок мышей линии C57BL/6 весом $18\text{--}20\text{ г}$, полученных из Филиала “Столбовая” ФГБУН НЦБТ ФМБА России, содержали в конвенциональных условиях без ограничения в воде и корме. Мышей подвергали цервикальной дислокации, обрабатывали целиком 70% -ным спиртом, вскрывали стерильно в ламинаре. В перитонеальную полость вводили 2 мл холодного физраствора, промывали полость и извлекали перитонеальный экссудат. Экссудат от пяти мышей пулировали, отмывали 2 раза физиологическим раствором и переводили в культуральную среду RPMI-1640, содержащую антибиотики и L-глутамин (ПанЭко, Россия). Клетки экссудата помещали в 24 -луночные планшеты (Costar, США), добавляли 10% (по объему) препаратов (см. рис. 2 и табл. 1) и инкубировали 48 ч . После инкубации клетки экссудата отмывали в физиологическом растворе и переводили в фосфатный буфер (0.5% БСА, 0.01% NaN_3) для цитометрического анализа.

Проточная цитометрия. Окрашивание осуществляли антителами против маркеров мыши CD80-PE, CD11b-PerCP, CD11c-APC (BioLegend, США) в титрах $1 : 2000$ при 4°C в течение 1 ч . Мертвые клетки выявляли с помощью красителя DAPI. Проточную цитометрию проводили на приборах MACSQuant Tyro Sorter (Miltenei, Германия) и FCSCalibur (BD, США). Для обсчета результатов использовали программу FlowJo (США).

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Excel и t -критерия Стьюдента. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика синтеза липидного конъюгата олигонуклеотидного иммуностимулятора CpG-ODN (с фосфодиэфирными связями, PD-CpG-DOPE). Получены липосомы, нагруженные композицией Т-клеточных эпитопов коронавируса SARS-CoV-2 (7 пептидов) и несущие конъюгат PD-CpG-DOPE в мембране. В экспериментах с макрофагами мышей *in vitro* наблюдалась тенденция к увеличению иммуногенности данных липосом по сравнению с липосомами, нагруженными той же пептидной композицией, но без PD-CpG-DOPE, а с добавленным фосфо-

ротиоатным CpG-ODN в растворе. С учетом возможности получения препаратов липосом длительного хранения с помощью лиофилизации формуляция с PD-CpG-DOPE может представлять интерес в качестве вакцинной конструкции. Кроме того, в композиции пептидов есть эпитопы, не относящиеся к S-белку, что открывает перспективу разработки вакцин для профилактики и лечения COVID-19, эффективность которых будет мало зависеть от мутаций вирусного генома.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-60478) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1049).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования и процедуры по рутинному уходу за животными проводили в соответствии с Международными руководящими принципами биомедицинских исследований на животных. Проведение данного исследования с использованием лабораторных животных было одобрено Комиссией по контролю за содержанием и использованием животных ИБХ РАН (протокол № 325 от 24.05.2021).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Apostolopoulos V., Bojarska J., Feehan J., Matsoukas J., Wolf W. // Front. Pharmacol. 2022. V. 13. P. 914467. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.914467>
2. Di Natale C., La Manna S., De Benedictis I., Brandi P., Marasco D. // Front Pharmacol. 2020. V. 11. P. 578382. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.578382>
3. Третьякова Д.С., Водовозова Е.Л. // Биол. мембраны. 2022. Т. 39. С. 85–106. [Tretiakova D.S., Vodovozova E.L. // Biochem. (Mosc.) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 2022. V. 16. P. 1–20.] <https://doi.org/10.1134/s1990747822020076>
4. Nisini R., Poerio N., Mariotti S., De Santis F., Fraziano M. // Front. Immunol. 2018. V. 9. P. 155. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00155>
5. Lee Y., Lee Y.S., Cho S.Y., Kwon H.J. // Adv. Protein Chem. Struct. Biol. 2015. V. 99. P. 75–97. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.03.004>
6. Heuts J., Varypataki E.M., van der Maaden K., Romeijn S., Drijfhout J.W., van Scheltinga A.T., Ossendorp F., Jiskoot W. // Pharm. Res. 2018. V. 35. P. 207. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2490-6>
7. Dhakal S., Cheng X., Salcido J., Renu S., Bondra K., Lakshmanappa Y.S., Misch C., Ghimire S., Feliciano-Ruiz N., Hogshead B., Krakowka S., Carson K., McDonough J., Lee C.W., Renukaradhya G.J. // Int. J. Nanomedicine. 2018. V. 13. P. 6699–6715. <https://doi.org/10.2147/ijn.s178809>
8. Белявцев А.Н., Шастина Н.С., Куприянов В.В., Николаева Л.И., Мельникова М.В., Колесанова Е.Ф.,

- Шимчишина М.Ю., Капустин И.В. // Биоорг. химия. 2022. Т. 48. С. 453–460. [Belyavtsev A.N., Shastina N.S., Kupriyanov V.V., Nikolaeva L.I., Melnikova M.V., Kolesanov E.F., Shimchishina M.Yu., Kapustin I.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. P. 621–627.] <https://doi.org/10.1134/S1068162022030049>
9. Gayed P.M. // Yale J. Biol. Med. 2011. V. 84. P. 131–138.
 10. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. // Nature. 2000. V. 408. P. 740–745. <https://doi.org/10.1038/35047123>
 11. Hanagata N. // Int. J. Nanomedicine. 2012. V. 7. P. 2181–2195. <https://doi.org/10.2147/ijn.s30197>
 12. Nikoofal-Sahlabadi S., Riahi M.M., Sadri K., Badiee A., Nikpoor A.R., Jaafari M.R. // Eur. J. Pharm. Sci. 2018. V. 119. P. 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.04.018>
 13. Lahoud M.H., Ahmet F., Zhang J.G., Meuter S., Policheni A.N., Kitsoulis S., Lee C.N., O'Keeffe M., Sullivan L.C., Brooks A.G., Berry R., Rossjohn J., Minter J.D., Vega-Ramos J., Villadangos J.A., Nicola N.A., Nussenzweig M.C., Stacey K.J., Shortman K., Heath W.R., Caminschi I. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 16270–16275. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208796109>
 14. Ignacio B.J., Albin T.J., Esser-Kahn A.P., Verdoes M. // Bioconjug. Chem. 2018. V. 29. P. 587–603. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00808>
 15. Levenson E.A., Kiick K.L. // Acta Biomater. 2014. V. 10. P. 1134–1145. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.11.022>
 16. Clauson R.M., Berg B., Chertok B. // Bioconjug. Chem. 2019. V. 30. P. 561–567. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00091>
 17. Chatzikleantous D., Schmidt S.T., Buffi G., Paciello I., Cunliffe R., Carboni F., Romano M.R., O'Hagan D.T., D'Oro U., Woods S., Roberts C.W., Perrie Y., Adamo R. // J. Control. Release. 2020. V. 323. P. 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.001>
 18. Andrews C.D., Provoda C.J., Ott G., Lee K.D. // Bioconjug. Chem. 2011. V. 22. P. 1279–1286. <https://doi.org/10.1021/bc100436y>
 19. Lai C., Duan S., Ye F., Hou X., Li X., Zhao J., Yu X., Hu Z., Tang Z., Mo F., Yang X., Lu X. // Theranostics. 2018. V. 8. P. 1723–1739. <https://doi.org/10.7150/thno.22056>
 20. Третьякова Д.С., Алексеева А.С., Онищенко Н.Р., Болдырев И.А., Егорова Н.С., Васина Д.В., Луцин В.А., Чернов А.С., Телегин Г.Б., Казаков В.А., Плющих К.С., Коновалова М.В., Свиричевская Е.В., Водовозова Е.Л. // Биоорг. химия. 2023. Т. 49. С. 48–64. [Tretiakova D.S., Alekseeva A.S., Onishchenko N.R., Boldyrev I.A., Egorova N.S., Vasina D.V., Gushchin V.A., Chernov A.S., Tegin G.B., Kazakov V.A., Plokhikh K.S., Konovalova M.V., Svirshchevskaya E.V., Vodovozova E.L. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. Suppl. 1. P. S23–S37.] <https://doi.org/10.1134/S1068162022060255>
 21. Meng W., Yamazaki T., Nishida Y., Hanagata N. // BMC Biotechnol. 2011. V. 11. P. 88. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-88>
 22. Mouritsen O.G., Jørgensen K. // Chem. Phys. Lipids. 1994. V. 73. P. 3–25. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0009-3084(94)90171-6)
 23. Mansourian M., Badiee A., Jalali S.A., Shariat S., Yazdani M., Amin M., Jaafari M.R. // Immunol. Lett. 2014. V. 162. P. 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.07.008>
 24. Schmidt S.T., Foged C., Korsholm K.S., Rades T., Christensen D. // Pharmaceutics. 2016. V. 8. P. 7. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8010007>
 25. Engler O.B., Schwendener R.A., Dai W.J., Wolk B., Pichler W., Moradpour D., Brunner T., Cerny A. // Vaccine. 2004. V. 23. P. 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.05.009>
 26. Kryukova E.V., Egorova N.S., Kudryavtsev D.S., Lebedev D.S., Spirova E.N., Zhmak M.N., Garifulina A.I., Kasheverov I.E., Utkin Y.N., Tsetlin V.I. // Front. Pharmacol. 2019. V. 10. P. 748. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00748>
 27. Magano J., Conway B.G., Farrand D., Lovdahl M., Maloney M.T., Pozzo M.J., Teixeira J.J., Rizzo J., Tumelty D. // Synthesis. 2014. V. 46. P. 1399–1406. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1340980>
 28. Germann M.W. // Nucleic Acids NMR Spectroscopy. Departments of Chemistry and Biology, Georgia State University, 2014. http://tesla.ccrcc.uga.edu/courses/BioNMR2014/lectures/pdfs/NMR_14_mwgL1.pdf

Synthesis of Liposomes Conjugated with CpG Oligonucleotide and Loaded with a Set of T-Cell Epitopes of the SARS-CoV-2 Virus

D. S. Tretiakova*, T. L. Azhikina*, I. A. Boldyrev*, E. V. Svirshchevskaya*, and E. L. Vodovozova*,#

*Phone: +7 (495) 330-66-10; e-mail: elvod@lipids.ibch.ru

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

The synthesis of lipid conjugate of immunostimulatory oligodeoxyribonucleotide CpG-ODN (PD-CpG-DOPE) is described. Liposomes loaded with a composition of T-cell epitopes of the SARS-CoV-2 virus (7 peptides) and carrying PD-CpG-DOPE conjugate in the membrane, including lyophilized liposomes suitable for long-term storage, were prepared. In vitro experiments on mouse peritoneal exudate cells showed a tendency to increase the immunogenicity of liposomes with peptides when PD-CpG-DOPE conjugate was introduced into the lipid bilayer, compared with the addition of the (commercial) phosphorothioate derivative of CpG-ODN in solution.

Keywords: T-cells, epitopes, SARS-CoV-2, vaccines, peptides, liposomes, CpG-ODN