

ISSN 0233-4755

Том 41, Номер 1

Январь-Февраль 2024



БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

*Журнал мембранной
и клеточной биологии*



40 лет журналу



СОДЕРЖАНИЕ

Том 41, номер 1, 2024

ОБЗОРЫ

Сенсоры внутриклеточных нуклеиновых кислот, активирующие STING-зависимую продукцию интерферонов в иммунокомпетентных клетках

Л. В. Смольянинова, О. Н. Солопова

3

Клеточная модель для анализа роли IRBIT в регуляции IP₃-рецептора I типа

*Е. Е. Копылова, И. С. Масулис, О. А. Рогачевская, Е. Н. Кочкина, Ю. А. Ковалицкая,
М. Ф. Быстрова, С. С. Колесников*

24

Молекулярная модель транслокации норфлоксацина через канал OmpF порина *Yersinia pseudotuberculosis*

*Д. К. Чистюлин, Е. А. Зелепуга, В.Л. Новиков, Н.Н. Баланева, В.П. Глазунов, Е.А. Чингизова,
В. А. Хоменко, О. Д. Новикова*

36

α 1-Адренорецепторы регулируют пейсмекерную функцию синоатриального узла сердца, оказывая влияние на хлорный трансмембранный транспорт

Я. А. Воронина, А. В. Федоров, М. А. Челомбитько, У. Е. Пиунова, В. С. Кузьмин

58

Активация гистамином сорбции фактора комплемента C3/C3b на поверхности эндотелиальных клеток как одна из причин повреждения эндотелия при COVID-19

П. П. Авдонин, Ю. В. Маркитантова, Е. Ю. Рыбакова, Н. В. Гончаров, П. В. Авдонин

73

Модуляция адгезии и миграции клеток N1H/3T3 в коллагеновых материалах производными таксифолина

Ю. В. Шаталин, М. И. Кобякова, В. С. Шубина

82

CONTENTS

Vol. 41, No. 1, 2024

REVIEWS

Sensors of Intracellular Nucleic Acids Activating STING-Dependent Production of Interferons in Immunocompetent Cells <i>L. V. Smolyaninova, O. N. Solopova</i>	3

Cellular Model for the Analysis of IRBIT-Dependent Regulation of the Type 1 IP ₃ Receptor <i>E. E. Kopylova, I. S. Masulis, O. A. Rogachevskaja, E. N. Kochkina, Y. A. Kovalitskaya, M. F. Bystrova, S. S. Kolesnikov</i>	24
Molecular Model of Norfloxacin Translocation Through the <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> OmpF Porin Channel <i>D. K. Chistyulin, E. A. Zelepuga, V. L. Novikov, N. N. Balaneva, V. P. Glazunov, E. A. Chingizova, V. A. Khomenko, O. D. Novikova</i>	36
α 1-Adrenergic Receptors Control the Activity of Sinoatrial Node by Modulating Transmembrane Transport of Chloride Anions <i>Y. A. Voronina, A. V. Fedorov, M. A. Chelombitko, U. E. Piunova, V. S. Kuzmin</i>	58
Activation of Complement Factor C3/C3b Deposition on the Surface of Endothelial Cells by Histamine As one of the Causes of Endothelium Damage in COVID-19 <i>P. P. Avdonin, Yu. V. Markitantova, E. Yu. Rybakova, N. V. Goncharov, P. V. Avdonin</i>	73
New Materials Based on Collagen and Taxifolin Derivatives: Production and Properties <i>Yu. V. Shatalin, M. I. Kobyakova, V. S. Shubina</i>	82

УДК 577.3

СЕНСОРЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, АКТИВИРУЮЩИЕ STING-ЗАВИСИМУЮ ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРФЕРОНОВ В ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ

© 2024 г. Л. В. Смольянинова^{а, *}, О. Н. Солопова^а

^аЛаборатория биоресурсной коллекции клеточных линий и первичных опухолей, НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей, НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина

Минздрава России, Москва, 115478 Россия

*e-mail: smolyaninova@larisa1@gmail.com

Поступила в редакцию 31.07.2023 г.

Подписана в печать 03.10.2023 г.

Принята к публикации 06.10.2023 г.

В настоящее время белки-сенсоры чужеродной ДНК или РНК, играющие важную роль во врожденном иммунитете, вызывают большой интерес как новый способ иммунотерапии рака. Агонисты этих белков способны активировать в иммунных клетках сигнальные каскады, вызывающие продукцию цитокинов, в частности интерферонов I типа, обладающих мощным цитотоксическим эффектом. В обзоре рассмотрено функционирование цитоплазматических сенсоров нуклеиновых кислот, таких как cGAS, STING, IFI16, AIM2, DAI, DDX41, DNA-PK, MRE-11, TREX1, участвующих в активации продукции различных цитокинов.

Ключевые слова: сенсоры ДНК/РНК, цитокины, интерфероны, cGAS, STING, иммунные клетки

Список сокращений: а.о. – аминокислотные остатки; а.п. – аминокислотная последовательность; дцДНК – двухцепочечная ДНК; мтДНК – митохондриальная ДНК; оцДНК – одноцепочечная ДНК; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; AIM2 (absent in melanoma 2) – белок 2, отсутствующий при меланоме; cGAMP – циклический гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфат; cGAS – циклическая гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфат синтаза; CC – двойные спирали; CDN – циклические динуклеотиды; CTT – С-концевой фрагмент; DAI (DNA-dependent activator of IFN regulatory factors) – ДНК-зависимый активатор интерферон-регулируемых факторов; DDX41 (DEAD-box helicase 41) – DEAD-бокс-хеликаза 41; DM – димеризующий мотив; DNA-PK (DNA-dependent serine/threonine protein kinase) – ДНК-зависимая серин/треониновая протеинкиназа; HELIC – хеликазный домен; HIV – вирус иммунодефицита человека; HSV1, HSV2 – вирус простого герпеса 1 и 2 типа; IFI16 (IFN γ -inducible protein 16) – индуцируемый гамма-интерфероном белок 16; IFN – интерферон; IL – интерлейкин; IRF3 (IFN regulatory factor 3) – регуляторный фактор интерферона 3; ISGs – интерферон-стимулируемые гены; LBD – лиганд-связывающий домен; MEFs – мышечные эмбриональные фибробласты; MRE-11 (meiotic recombination 11 homolog A) – гомолог А белка мейотической рекомбинации 11; NBD – нуклеотид-связывающий домен; non-CDN – малые молекулы, не относящиеся к циклическим динуклеотидам; OB – олигонуклеотид/олигосахарид связывающие складки; PAMPs – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны; PM – фосфорилируемый мотив; Poly I:C – полиинозиновая-полицитидиловая кислота; PPII – полипролиновый домен; PRRs – рецепторы опознавания паттерна; PYD – пириновый домен; RAD50 (DNA repair protein RAD50) – белок репарации дцДНК; RNAi – РНК-интерференция; SIV – вирус иммунодефицита африканских обезьян; STING (stimulator of interferon genes) – стимулятор генов интерферона; TBK1 (TANK-binding kinase 1) – TANK-связывающая киназа 1; TBM – мотив для связывания протеинкиназы TBK1; TNF – фактор некроза опухолей; TREX1 (three prime repair exonuclease 1) – 3'-концевая репаративная экзонуклеаза 1; VSV – вирус везикулярного стоматита; ZBDs ($Z\alpha$ и $Z\beta$) – Z-ДНК-связывающие домены; ZBP1 (Z-DNA-binding protein 1) – Z-ДНК связывающий белок 1.

DOI: 10.31857/S0233475524010015, EDN: ztzoee

ВВЕДЕНИЕ

В клетках нашего организма заложены механизмы защиты от присутствия в цитоплазме чужеродной патогенной ДНК или РНК, или собственной ДНК, активирующие системы врожденного иммунитета. Появление в цитоплазме одноцепочечной и двуцепочечной ДНК (оцДНК и дцДНК) и РНК может происходить по ряду причин: инфицирование ДНК вирусами; инфицирование РНК-содержащими ретровирусами, которые активируют собственное воспроизведение посредством ретротранскриптазы; выход бактерий из эндосом; активация сигнального пути регулируемой клеточной смерти, что приводит к разрушению митохондрий и выходу в цитоплазму митохондриальной ДНК (мтДНК); реактивация эндогенных ретровирусных последовательностей; генетические мутации, приводящие к активации нуклеаз; образование микроядер в результате митотических дефектов; повреждение ДНК при лучевой терапии; аккумуляция ДНК в результате фагоцитоза, микропиноцитоза или поглощение ДНК-обогащенных экзосом [1]. Удаление чужеродной ДНК/РНК из клеток требуется для эффективного функционирования клеток и поддержания их нормальной жизнедеятельности. Активация защитных механизмов в присутствии патогенов реализуется с участием рецепторов опознавания паттерна (pattern-recognition receptors, PRRs), к которым относятся мембранные и цитоплазматические белки. У млекопитающих определены несколько классов PRRs, которые направлены на узнавание внеклеточных патогенов (мембранные — Toll-подобные рецепторы (TLRs) и лектиновые рецепторы С-типа (CLRs)) и внутриклеточных патогенов (цитоплазматические — RIG-I-подобные рецепторы (RLRs), Nod-подобные рецепторы (NLRs), AIM2-подобные рецепторы (ALRs)).

При участии PRRs, выступающих в качестве сенсоров не изолированных в ядре нуклеиновых кислот, активируются внутриклеточные сигнальные механизмы для локализации и устранения опасных сигналов. PRRs в ходе эволюции были отобраны по специфичности к бактериальным липополисахаридам, гликопротеинам, содержащим остатки маннозы, пептидам, липотейхоевым кислотам, липопротеинам. Кроме этой специфичности PRRs распознают нуклеиновые кислоты вирусов, бактерий, грибов и нуклеиновые кислоты собственных поврежденных клеток. Нуклеиновые кислоты патогенов включают короткие консервативные молекулярные мотивы, узнаваемые PRRs и называемые патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (pathogen-associated molecular

patterns, PAMPs). Отличие патогенной ДНК от собственной ДНК происходит, как предполагается, на основании таких факторов как длина, 3D-структура и последовательность ДНК, внутриклеточная локализация ДНК, статус метилирования ДНК, ассоциация ДНК с гистонами или негистоновыми хроматин-связывающими белками (см. подробные механизмы отличия патогенной от собственной ДНК в обзоре [2]).

Одноцепочечные/двуцепочечные ДНК и РНК патогенов активируют в клетках млекопитающих сигнальные каскады cGAS–STING и RLR–MAVS, изучению которых посвящено много работ в последние десятилетия [3]. Ответом на активацию этих сигнальных путей является продукция клетками провоспалительных цитокинов, следствием чего является воспаление, а также антиген-специфичный адаптивный иммунный ответ. В нашем обзоре мы опишем функционирование цитоплазматических белков-сенсоров нуклеиновых кислот, таких как cGAS, STING, IFI16, AIM2, DAI, DDX41, DNA-PK, MRE-11, TREX1, ассоциированных с сигнальным каскадом cGAS–STING и продукцией провоспалительных цитокинов, в частности интерферонов (IFN) I типа (рис. 1).

Существование разнообразных цитоплазматических белков-сенсоров, активирующих защитные механизмы с участием cGAS–STING сигнального пути, позволяет клеткам эффективно реагировать на проникновение различных патогенов (бактерий, вирусов), а использование агонистов этих сенсоров является в настоящее время одной из стратегий терапии злокачественных новообразований.

Сигнальный путь cGAS–STING включает несколько этапов межбелковых взаимодействий. Первоначально при появлении в клетке оц/дцДНК или РНК фермент циклическая гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфат синтаза (cGAS) взаимодействует с нуклеиновыми кислотами (независимо от типа последовательности), что приводит к каталитической реакции образования вторичного мессенджера — циклического динуклеотида гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфат (cGAMP) из АТФ и ГТФ. Вторичный мессенджер cGAMP является высокоаффинным лигандом белка эндоплазматического ретикулума (ЭПР) STING (stimulator of interferon genes), способен при связывании со STING вызывать его конформационные перестройки, образование гомодимеров и самоактивацию. Активный STING при участии TRAP-транслокон комплекса, а также белков COPII (cytoplasmic coat protein complex-II) и TRAP β (translocon-associated protein β) переходит из ЭПР в аппарат Гольджи [4]. При переходе из

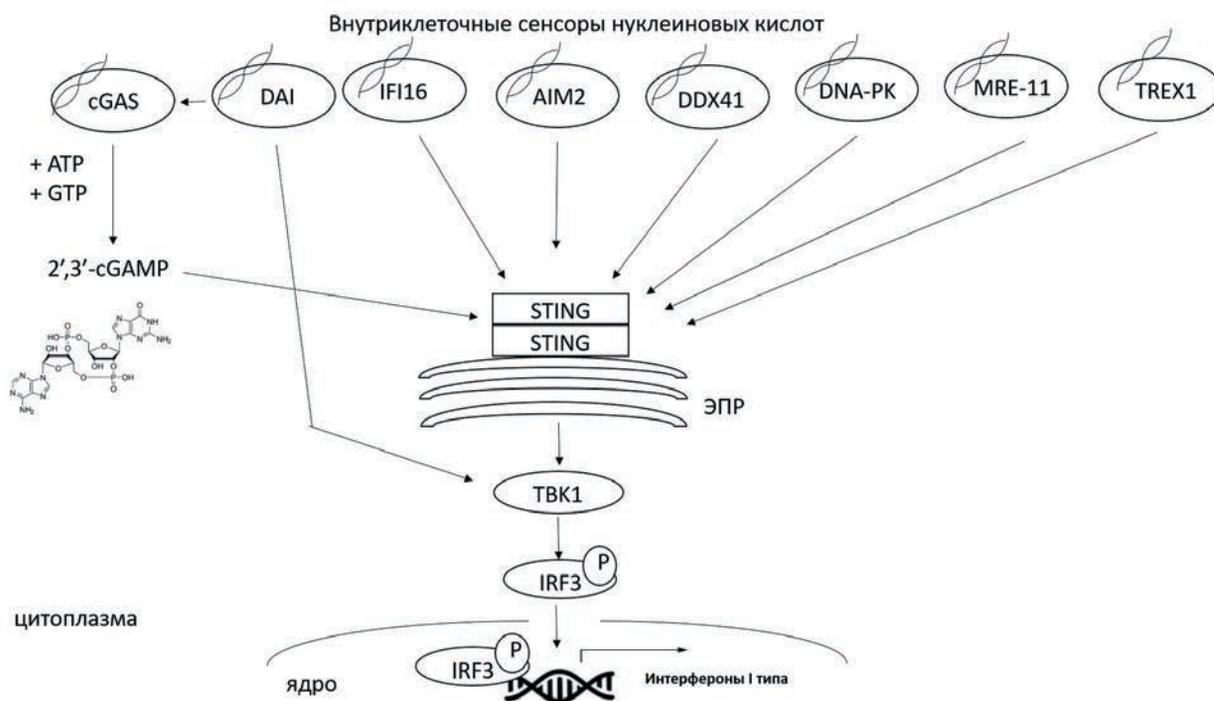


Рис. 1. Цитоплазматические сенсоры нуклеиновых кислот, участвующие в активации STING сигнального пути и вызывающие продукцию интерферонов I типа. cGAS — cyclic GMP-AMP synthase, DAI — DNA-dependent activator of IRFs, IFI16 — IFN γ -inducible protein 16, AIM2 — absent in melanoma 2, DDX41 — DEAD-box helicase 41, DNA-PK — DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit, TREX1 — three prime repair exonuclease 1, STING — stimulator of interferon genes, TBK1 — TANK-binding kinase 1, IRF3 — IFN regulatory factor 3, ЭПР — эндоплазматический ретикулум.

ЭПР в аппарат Гольджи происходит высвобождение С-концевого фрагмента STING, где расположен сайт фосфорилирования (Ser366). Фосфорилирование по этому сайту осуществляется протеинкиназой TBK1 (TANK-binding kinase 1) и приводит к устойчивой активации STING. Кроме фосфорилирования STING подвергается пальмитированию, что способствует образованию агрегатов STING с TBK1 и формированию STING–TBK1-сигнаლოსомы [5]. Далее TBK1 в составе STING-сигнаლოსомы фосфорилирует транскрипционный фактор IRF3 (IFN regulatory factor 3), что приводит к его димеризации и транслокации в ядро, где он связывается с промотерами интерфероновых генов I типа. Кроме индукции интерферонов I типа STING–TBK1-сигналосома также может быть вовлечена в экспрессию других провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-6 (IL-6) и фактор некроза опухолей (TNF) за счет фосфорилирования I κ B α , ингибитора транскрипционного фактора NF- κ B, и дальнейшего его полиубиквитилирования и деградации. Деградация I κ B α способствует активации и переходу в ядро NF- κ B, регулирующего экспрессию разных цитокинов [6].

Известно, что активация сигнального пути cGAS–STING и продукция цитокинов может снижать темпы прогрессии опухолей [7], оказывая влияние на специфический противоопухолевый иммунитет, что делает его привлекательной мишенью для разработки STING-таргетированной терапии рака. Следует, однако, отметить, что гиперпродукция цитокинов (в частности интерферонов I типа) может быть причиной развития аутоиммунных заболеваний, а также длительного воспаления при разных заболеваниях, что следует учитывать при применении STING-направленных препаратов. Таким образом, поиск и изучение не только агонистов (активаторов), но и антагонистов (ингибиторов) STING может стать актуальным направлением современных исследований. Кроме того, недавно было показано, что STING также принимает участие в регуляции Сар-зависимой трансляции мРНК путем прямого связывания с протеинкиназой PERK в ЭПР при фиброзе легких и почек, что расширяет перечень заболеваний для лечения которых могут быть применены STING-таргетированные препараты [8].

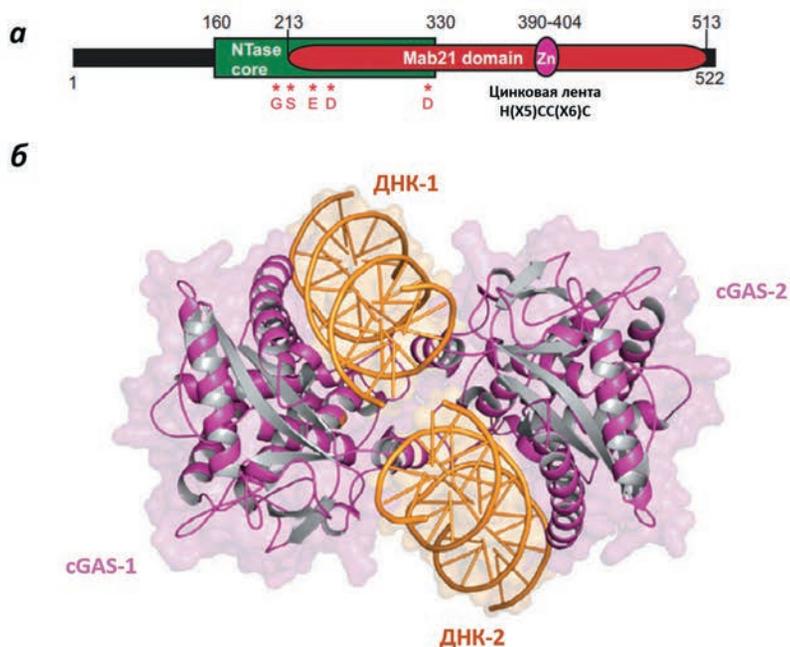


Рис. 2. Схема доменной организации cGAS человека (а) и модель комплекса cGAS–ДНК (2:2) (б), в составе которого каждый мономер cGAS взаимодействуют с ДНК (адаптировано из [10, 11], используется с разрешения издательства). а — N-конец обозначен черным цветом, С-конец состоит из нуклеотидилтрансферзного домена (NTase core) (зеленый цвет) и Mab21-домена (красный цвет), включающего структуру «цинковая лента» (H(X5) CC(X6) C). Красными звездочками отмечены аминокислотные остатки (G212, S213, E225, D227 домена).

cGAS

Белок cGAS впервые был обнаружен как сенсор ДНК в цитоплазме клеток L929 и THP-1 [9]. cGAS имеет молекулярную массу 60 кДа и представляет собой циклическую GMP–AMP-синтазу из семейства нуклеотидилтрансфераз, преимущественно локализуется в цитоплазме, а также может находиться в ядре. cGAS состоит из неструктурированного N-конца (1–160 а.о.) и высококонсервативного С-конца (161–522 а.о.) (рис. 2). Предполагается, что остатки лизина и аргинина, входящие в состав N-концевого фрагмента, участвуют в связывании ДНК. Кроме этого, N-конец служит для присоединения cGAS к плазматической мембране. С-конец cGAS содержит два сильно консервативных домена — нуклеотидилтрансферзный домен (160–330 а.о.), необходимый для ферментативной активности, и Mab21-домен (213–513 а.о.), включающий мотив «цинковая лента», который участвует в связывании ДНК и димеризации cGAS, и остаток лейцина, регулирующий синтез циклических динуклеотидов [12]. В отсутствие ДНК cGAS находится в автоингибированном состоянии. При нахождении нуклеиновых кислот в цитоплазме

cGAS димеризуется и формируется комплекс cGAS–ДНК (2:2).

Внутри комплекса cGAS–ДНК происходят конформационные изменения, и осуществляется переход cGAS в активное состояние и каталитический синтез циклического гуанозинмонофосфата–аденозинмонофосфата 2',3'-cGAMP из АТФ и ГТФ. 2',3'-cGAMP является смешанным фосфодиэфиром с уникальной связью между 2'-ОН группой GMP и 5'-фосфатным остатком AMP и 3'-ОН группой AMP с 5'-фосфатным остатком GMP (см. формулу на рис. 1). 2',3'-cGAMP выступает в роли вторичного мессенджера и связывается с белком ЭПР STING, вызывая его активацию и последующую продукцию интерферонов I типа [13]. Взаимодействие между нуклеиновыми кислотами и ДНК-связывающими доменами cGAS происходит посредством формирования связи между положительно заряженными аминокислотными остатками (а.о.) и отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК, что позволяет связывать дцДНК в независимости от ее последовательности. cGAS может активироваться и при взаимодействии с оцДНК, способной сформировать внутренние дуплексные структуры, а также при взаимодействии с оцДНК в Y-форме

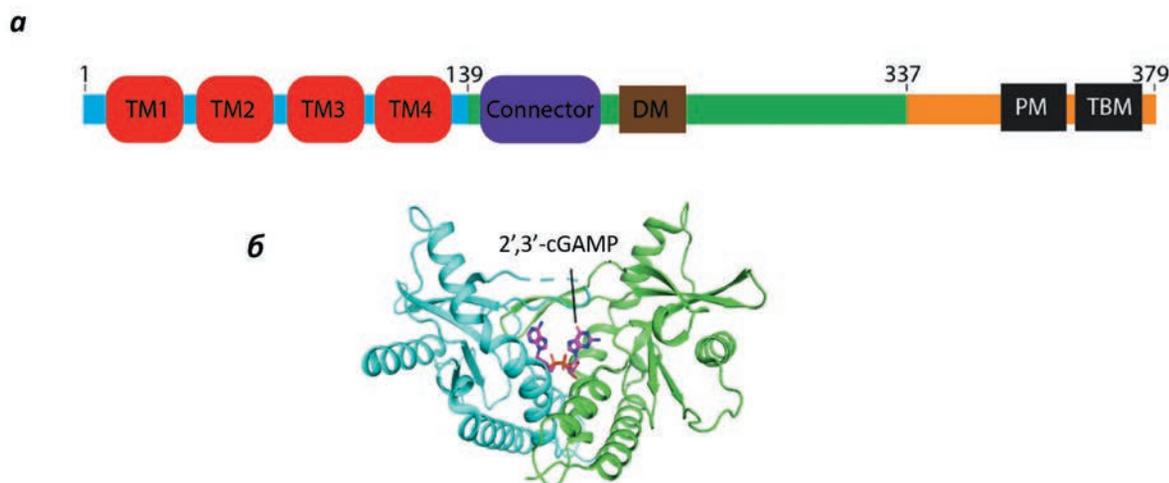


Рис. 3. Схема доменной организации белка человека STING (а) и модель комплекса лиганд–STING (б) (адаптировано из [27], используется с разрешения издательства). а — N-концевой участок выделен голубым цветом, LBD (лиганд-связывающий домен) выделен зеленым цветом, СТТ (С-концевой фрагмент) выделен оранжевым цветом; б — взаимодействие между лигандом 2',3'-cGAMP и лиганд-связывающим доменом белка свиньи STING происходит в частично открытой конформации.

[14]. дцРНК может связываться с белком сGAS, но в отличие от дцДНК, это не приводит к его активации, что позволяет предположить, что для активации требуются специфические структурные перестройки в молекуле фермента, вызываемые дцДНК, а не дцРНК [15]. Предполагается, что В-форма ДНК связывается с активационной петлей сGAS и сдвигает ее, что приводит к перегруппировке активного сайта и активации сGAS, в то время как А-форма дцРНК не способна сдвинуть активационную петлю и не может активировать сGAS [16]. Для активации сGAS *in vitro* достаточно коротких дцДНК (примерно 15 п.о.), но для активации сGAS в клетках необходимы более длинные фрагменты ДНК (свыше 20 п.о.). Длинные фрагменты ДНК формируют с сGAS более стабильные структуры димеров с более высокой ферментативной активностью [17]. Для оцДНК связывающая способность составляет $K_d \sim 1.5 \text{ мкМ}$, а для дцДНК $K_d \sim 87.6 \text{ нМ}$ [18]. сGAS узнает такие ДНК-содержащие вирусы: вирус коровьей оспы, вирус простого герпеса 1 и 2 типа (HSV1 и HSV2), цитомегаловирус, аденовирусы, вирус папилломы человека и мышинный гаммагерпесвирус 68, а также РНК-содержащие вирусы: вирус мышинного лейкоза, вирус иммунодефицита африканских обезьян (SIV), вирус иммунодефицита человека (HIV), вирус лихорадки Западного Нила, вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус денге, а также грамположительные и грамотрицательные бактерии [19]. Интересно отметить, что при инфицировании

дендритных клеток РНК-содержащим вирусом HIV-1 сGAS функционирует не самостоятельно, а в комплексе с белком PQBP1, что, по всей видимости, требуется для усиления узнаваемости обратно транскрибируемой ДНК ретровируса [20]. Известно, что активность сGAS регулируется за счет посттрансляционных модификаций, таких как, например, фосфорилирование по Ser305 (у человека) и по Ser291 (у мышей) протеинкиназой Akt [21], а также глутамилирование TTLL4 и TTLL6 [22], приводящих к ингибированию активности сGAS. Белок сGAS может присутствовать в ядре, однако автореактивность к собственной ДНК подавлена из-за взаимодействия с хроматином [23]. сGAS связан с гистонами 2А-2В, что предотвращает формирование димеров сGAS [24].

Sun и соавторы показали, что фермент сGAS, катализируя образование вторичного мессенджера 2',3'-cGAMP, участвует в продукции интерферона через белок STING [9]. Инфицирование клеток с нокаутом сGAS ДНК вирусами не вызвало активацию IRF3 и продукцию интерферона β (IFN- β), а в клетках с оверэкспрессией сGAS ДНК-вирусы активировали IRF3 и индуцировали STING-зависимую продукцию IFN- β .

В настоящее время предпринимаются попытки синтезировать агонисты сGAS — циклические нуклеотиды, олигонуклеотиды, которые бы имели высокую биостабильность, фармакинетику, безопасность и высокий потенциал в стимуляции иммунного ответа в опухолевом микроокружении

и невысокую стоимость при комбинированной иммунотерапии [25].

STING

Белок STING считается одной из ключевых молекул, участвующих в реакции на патогены и активирующий провоспалительные цитокины при адаптивном иммунном ответе. Впервые STING был обнаружен в экспериментах с применением скрининговой системы экспрессии, в которой примерно 5500 человеческих и 9000 мышиных полноразмерных комплементарных кДНК, содержащих репортерный ген люциферазы под промотором IFN- β -Luc, были трансфицированы в клетки HEK293T, для того чтобы определить участников альтернативного TRL-независимого сигнального пути врожденного иммунитета, сопровождающегося продукцией интерферонов [26]. В результате этой работы был идентифицирован белок STING (молекулярный вес 42 кДа, 379 а.о.), который преимущественно располагался в ЭПР. STING закорен в ЭПР N-концевым фрагментом, включающим четыре трансмембранных домена (TM1–TM4). В структуре STING присутствует лиганд-связывающий домен (LBD), содержащий участок для взаимодействия (Connectog) и димеризующий мотив (DM), и C-концевой фрагмент (CTT), включающий фосфорилируемый мотив (PM) и мотив для связывания протеинкиназы TBK1 (TBM) (рис. 3).

Лиганд-связывающий домен подвергается конформационным изменениям при связывании с эндогенным вторичным мессенджером 2',3'-cGAMP. Связывание STING с 2',3'-cGAMP в отличие от других изомеров, таких как, например, 3',2'-cGAMP и 2',2'-cGAMP, происходит в наиболее предпочтительной конформации, которая позволяет с наименьшей энтропией и высокой аффинностью реализовать их взаимодействие. Константа связывания со STING для 2',3'-cGAMP \sim 4 нМ и в 300 раз ниже, чем для 3',2'-cGAMP и 3',3'-cGAMP, и в 75 раз ниже, чем для 2'2'-cGAMP [28]. Показано, что STING может напрямую связываться с ДНК без участия других белков, но аффинность такого связывания (Kd \sim 200–300 мкМ) ниже, чем у cGAS (Kd \sim 88 нМ) [29]. Мономеры STING формирует гомодимеры в клетках. При связывании лигандов с мономерами STING происходит образование тетрамеров и олигомеров высшего порядка [30]. После образования тетрамеров происходит перемещение STING из ЭПР в ЭПР–Гольджи промежуточный компартмент и аппарат Гольджи. В аппарате Гольджи происходит присоединение пальмитиновой кислоты

к цистеиновым остаткам STING (Cys88 и Cys91), что оказывает влияние на активацию STING [31]. Для активации STING также необходимо фосфорилирование C-концевого домена протеинкиназой TBK1 [32]. Далее TBK1, предположительно находясь в составе STING–TBK1-сигнасомы, фосфорилирует транскрипционный фактор IRF3. В состоянии фосфорилирования IRF3 образует гомодимеры, которые транслоцируются в ядро и регулируют транскрипцию IFN- β [33].

Активность STING регулируется путем убиквитилирования. Присоединение убиквитина по разным сайтам STING (Lys63 — E3-лигазы TRIM56 и TRIM32; Lys27 — Grp78/AMFR и INSIG1) либо вызывает продукцию интерферона [34, 35], либо ингибирует продукцию интерферона и вызывает деградацию STING (Lys48 — RNF5 и TRIM30a) [36, 37].

Участие STING в активации продукции интерферонов было исследовано на нокаутных по STING^{-/-} мышах [38]. В клетках MEFs (мышинные эмбриональные фибробласты), выделенных из STING^{-/-} мышей, при заражении вирусом ветряночного стоматита наблюдалось образование большего вирусного потомства по сравнению с клетками дикого типа. В STING^{-/-} MEFs индуцированная оверэкспрессия STING после трансфекции плазмиды pcDNA mSTING приводила к увеличению уровня мРНК *Ifnb* и белка IFN- β . В макрофагах STING^{-/-}, полученных из костного мозга, действии полиинозиновой-полицитидиловой кислоты (poly I: C), но не инфицирование грамотрицательными бактериями *F.tularensis*, вызывало повышение экспрессии мРНК *Ifnb*. У нокаутных STING^{-/-} мышей некоторые виды бактерий (*L. monocytogenes*), вирусов (HSV1) и ДНК, не содержащих CpG, не вызывали продукцию интерферонов, а приводили к продукции интерлейкинов (IL-1 β). Это указывает на специфичность врожденного ответа на разные типы патогенов у разных типов клеток, в которых активируются либо STING-зависимые, либо TLR-зависимые сигнальные пути [39]. Участие TBK1 в STING-зависимом сигнальном пути также было показано на TBK1^{-/-} мышах. В клетках MEFs, полученных от TBK1^{-/-} мышей, сигнальный путь с участием STING не активировался [38]. Роль STING, как вышестоящего звена в сигнальном пути STING–TBK1–IRF3, была показана в экспериментах с оверэкспрессией STING в клетках HEK293T. Повышение экспрессии STING приводило к димеризации IRF3 и стимулировало продукцию интерферонов и других генов первичного иммунного ответа (*Ifnb1*, *Ifna4*, *Ifna6*, *Isgf3g*, *Irf2*, *Irf6*) [40].

В опухолевом микроокружении эндотелиальные клетки, наряду с дендритными клетками

и фибробластами, являются основным источником STING-зависимой продукции IFN- β [41]. IFN- β является эффективным антиангиогенным цитокином, который может подавлять пролиферацию или выживаемость эндотелиальных клеток, а также формирование капиллярной сети в опухолевом микроокружении, и вовлекается в противоопухолевый иммунитет. Показано влияние интерферонов (IFN- α и IFN- β) в противоопухолевом иммунитете и на другие типы иммунных клеток. Так, например, при связывании с клетками, несущими рецепторы к интерферону, интерферон снижает уровень кислотности в эндосомально-лизосомальном компартменте дендритных клеток, усиливает презентацию антигенов дендритными клетками, повышает продукцию хемокинов (CXCL9 и CXCL10) антигенпрезентирующими клетками, усиливает миграцию CD8⁺ Т-клеток и натуральных киллеров [42].

Активация STING-зависимого сигнального пути, приводящего к продукции интерферонов, в опухолевом микроокружении потенциально может способствовать эффективной противоопухолевой терапии при использовании агонистов STING циклических динуклеотидов (CDN, cyclic dinucleotide) или других малых молекул, не относящихся к циклическим динуклеотидам (non-CDN). Одним из первых агонистов STING, примененных в клинических испытаниях для иммунотерапии рака, был циклический динуклеотид ADU-S100 (MIW815). Этот агонист эффективно активировал STING *in vitro* и *in vivo* у мышей и при локальном введении инициировал CD8⁺ Т-клеточный ответ, что приводило к острой продукции цитокинов и локальному сосудистому коллапсу, и регрессии опухолей [43, 44]. Клинические испытания I фазы показали, что при монотерапии данный агонист хорошо переносится пациентами с солидными опухолями и лимфомами, и у пациентов наблюдается системная иммунная активация (повышение уровня воспалительных цитокинов, клональная экспансия Т-клеток периферической крови) [45]. Предполагается, что комбинация ADU-S100 с ингибиторами контрольных точек может привести к повышению эффективности иммунотерапии, но для подтверждения этой гипотезы требуются дальнейшие клинические испытания. Другим перспективным агонистом STING, дошедшим до клинических испытаний, был DMXAA (ASA404 или Vadimezan), аналог ксантена. DMXAA действует двунаправленно и способен вызывать апоптоз эндотелиальных опухолевых клеток, что приводит к разрушению сосудов в опухоли и прекращению снабжения кровью опухолевых узлов, и активации продукции провоспалительных

цитокинов посредством STING. Успешные I и II фазы клинических испытания привели к III фазе, которая показала отрицательный результат из-за того что изоформы STING у мышей и у человека имеют структурные различия в сайте связывания с DMXAA. Эти различия не позволяют STING связываться с DMXAA в клетках человека. Дальнейшие перспективы использования данного соединения или его модификаций при терапии рака связывают с его применением в комбинированной терапии с препаратами анти-ангиогенеза, радиотерапией и другими подходами [46]. В настоящее время к перспективным агонистам STING относится соединение diABZI (non-CDN), показавшее хороший эффект при терапии опухоли толстой кишки. Так, у мышей с сингенной опухолью толстой кишки при внутривенном введении наблюдается полная и длительная регрессия опухоли [47]. Интересно отметить, что в литературе описан еще один эффективный non-CDN агонист STING, MSA-2, показавший эффективность не только при внутриопухолевом и подкожном введении мышам, но и при пероральном введении. MSA-2 имеет высокую клеточную проницаемость и аффинность к STING. В кислой среде в опухолевых клетках MSA-2 формирует нековалентно связанные димеры, которые взаимодействуют со STING. Комбинированная терапия MSA-2 с анти-PD1 показала большую эффективность [48].

Таким образом, исследование механизмов действия агонистов STING—TBK1—IRF3 сигнального пути с целью выявления наиболее перспективных соединений для терапии разных типов рака является крайне актуальной задачей и, как описано выше, в наши дни некоторые соединения уже дошли до клинических испытаний, но поиск новых эффективных агонистов для терапии рака продолжается.

IFI16 и AIM2

Белки IFI16 и AIM2, относящиеся к семейству PYHIN (также известные как p200 или HIN200), другие важные сенсоры нуклеиновых кислот, которые встают на защиту клеток при вторжении вирусов, бактерий и других патогенов, или собственной aberrантной цитоплазматической ДНК. У большинства белков этого семейства в структуре N-концевого фрагмента находится пириновый домен (PYD), обеспечивающий белок-белковые взаимодействия, а C-концевой фрагмент включает один или два HIN200-домена, участвующие в связывании ДНК.

Белок IFI16 был одним из первых обнаруженных цитоплазматических сенсоров ДНК (IFN γ -inducible protein 16), который реагирует на

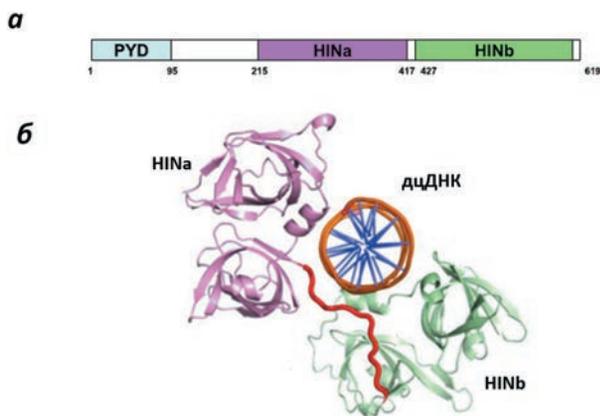


Рис. 4. Схема доменной организации белка IFI16 мыши (а) и модель комплекса дцДНК с HINa- и HINb-доменами, связанными между собой линкером (красный цвет) (б) (адаптировано из [51], используется с разрешения издательства).

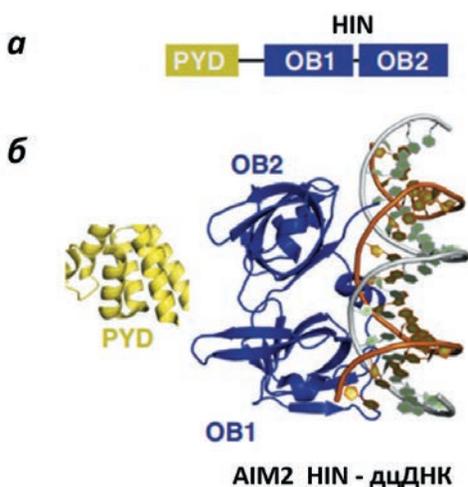


Рис. 5. Схема доменной организации AIM2 (а) и модель структуры PYD-домена (лимонный цвет) и комплекса дцДНК–AIM2 (б) (адаптировано из [63], используется с разрешения издательства). OB1, OB2 — олигонуклеотид/олигосахарид связывающие складки в составе HIN200-домена.

присутствие в цитоплазме оцДНК и дцДНК [49]. IFI16 локализуется преимущественно в ядре и в небольшом количестве в цитоплазме [50]. Структура доменной организации IFI16 представлена на рис. 4. В состав IFI16 входит N-концевой PYD-домен и два тандемных домена: HINa и HINb, содержащие олигонуклеотид/олигосахарид связывающие складки (OB).

Показано, что связывание дцДНК с HIN-доменами происходит по механизму кооперативного связывания

и зависит от длины ДНК [52, 53]. Связывание с оцДНК или с дцДНК происходит в основном за счет электростатического взаимодействия. IFI16 способен узнавать разную топологию ДНК [54]. Оба домена HINa и HINb связывают ДНК, но аффинность связывания различается [55]. HINa связывает ДНК быстрее, чем HINb. HINb связывает GC-богатые ДНК сильнее, чем HINa. Домен HINb взаимодействует с двумя цепочками ДНК, в то время как HINa взаимодействует с одной цепочкой ДНК. Предполагается два способа связывания ДНК с HIN-доменами. Первый способ — линкер, соединяющий две олигонуклеотид/олигосахарид связывающие складки внутри домена, используется в качестве троса для связывания с ДНК, второй способ — петли внутри двух олигонуклеотид/олигосахарид связывающих складок HIN-домена используются для связывания ДНК [56, 57]. Предполагается, что разные способы взаимодействия с ДНК, а также связь ДНК с разными доменами (взаимодействие с HINa ослабляет экспрессию IFN- β , а взаимодействие с HINb усиливает IFN- β [58]), могут приводить к двум разным иммунным ответам, а также в зависимости от типа вирусов, проникающих в клетку, IFI16 активирует различные способы борьбы с вирусами. При попадании генетического материала вирусов в ядро IFI16 перемещается к периферии ядра, ближе к ядерным порам, где связывает проникающую в ядро вирусную ДНК через HIN-домены и олигомеризуется через PYD-домен [59]. Известны следующие реакции в клетках в ответ на проникновение разных вирусов с участием IFI16: активация STING-зависимого интерферонового ответа (при инфекции HSV-1); формирование провоспалительного олигомерного комплекса белков — инфламмосомы (при KSHV-инфекции); активация каспазы-1, инициирующей пироптоз (при HI-инфекции) [50, 60]. В макрофагах при подавлении экспрессии IFI16 при стимуляции синтетической ДНК нарушалась продукция сGAMP, а при оверэкспрессии IFI16 усиливалась продукция сGAMP, что дало основание предполагать, что IFI16 функционирует как кофактор сGAS, оказывая влияние на продукцию сGAMP и дальнейший STING-зависимый сигнальный каскад [61].

AIM2 (absent in melanoma 2) — другой белок из этого семейства, преимущественно экспрессируется в эпителиальных клетках кишечника, кератиноцитах и моноцитарных линиях, способен распознавать ДНК из разных источников (собственную ДНК, бактериальную и вирусную ДНК). Показано, что AIM2 узнает вирус коровьей оспы и мышинный цитомегаловирус [62]. Структурно AIM2 включает два домена: N-концевой пириновый домен

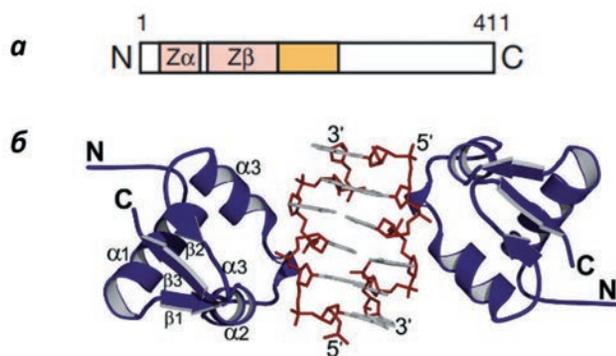


Рис. 6. Схема доменной организации ZBP1 (а) и модель структуры комплекса Z-ДНК с двумя молекулами ZBP1 (б) (адаптировано из [71, 74], используется с разрешения издательства). а — Розовым показаны Zα- и Zβ-домены, связывающие Z-форму ДНК; желтым показан D3-регион, участвующий в связывании правозакрученной В-формы ДНК. б — дцДНК (коричневый цвет), молекулы ZBP1 (фиолетовый цвет).

(PYD) и С-концевой HIN200-домен, соединенных длинным линкером (рис. 5). HIN200-домен, заряжен положительно и связывает отрицательно заряженную ДНК [64].

Предполагается, что PYD-домен в состоянии покоя блокирует HIN-домен посредством межмолекулярных взаимодействий, что предотвращает олигомеризацию PYD-доменов. В случае связывания дцДНК PYD-домен вытесняется из взаимодействия с HIN-доменом и может взаимодействовать с адаптерным белком инфламماسомы ASC, также имеющим в своем составе PYD-домен [56]. Sohn и соавторы предложили другую модель взаимодействия ДНК с AIM2. Они предполагают, что PYD-домен не вовлечен в автоингибирование AIM2, а, наоборот, участвует в связывании с ДНК и последующей олигомеризации PYD-доменов для формирования AIM2-инфламماسомы [65]. Исследование структуры HIN-домена AIM2 со связанной ДНК показало, что ДНК взаимодействует с AIM2 через сахарофосфатный остов, то есть независимо от последовательности ДНК [56]. Сахарофосфатные остатки обеих цепочек ДНК (В-форма) взаимодействуют с аргинином и лизином HIN-домена через электростатическую связь. Например, для стимуляции продукции цитокинов (IL-1β) при связывании ДНК с AIM2 требуется минимальная длина ДНК ~ 80 п.о. Результаты криоэлектронных исследований показали, что одну молекулу ДНК связывает множество молекул

AIM2, которые способны взаимодействовать друг с другом через PYD-домены и формировать длинные спиральные нити с полой правосторонне закрученной структурой. Внутренний диаметр такой нити составляет ~ 20 Å, а наружный диаметр ~ 90 Å [66]. Нити, сформированные белком AIM2, являются иницирующим фактором для дальнейшей сборки инфламماسомы — супрамолекулярного мультибелкового комплекса, включающего адаптерный белок ASC, способный взаимодействовать с CARD-доменом прокаспазы-1. После сборки инфламماسомы происходит автокаталитическое расщепление прокаспазы-1 до каспазы-1, которая конвертирует про-IL-18 и про-IL-1β в их активные формы, что приводит к воспалительному ответу и пироптозу [67].

Участие AIM2 в сигнальном каскаде STING пока остается плохо изученным. В ряде работ продукция интерферонов наблюдалась в AIM2-дефицитных моделях. В спленocyтaх AIM2-дефицитных мышей наблюдается повышенная экспрессия IFN-β и других IFN-индуцируемых генов [68]. В антигенпрезентирующих клетках (мышинные макрофаги и дендритные клетки) при стимуляции ДНК *in vitro* наблюдалась активация AIM2-инфламماسомы, каспазы-1 и снижение продукции IFN-β [69]. Предполагается, что эффективным дополнением стратегии повышения Т-клеточного ответа при терапии рака за счет активации сигнального каскада STING, приводящего к продукции IFN-β в опухолевом микроокружении, может стать ингибирование индукции AIM2-инфламماسомы. Действительно было показано, что, например, продукция цитокина IL-1R ингибирует продукцию IFN-β, а ингибирование AIM2-зависимой продукции интерлейкинов может повысить продукцию интерферонов [70].

DAI (ZBP1)

Поиск цитоплазматических сенсоров ДНК, которые способны активировать сигнальный путь TBK1–IRF3, привел к идентификации DAI (DNA-dependent activator of IRFs), известного также как ZBP1 [71]. ZBP1 локализуется в цитоплазме и ассоциирован со стрессовыми гранулами и тельцами, участвующими в обороте мРНК [72]. Структура ZBP1 включает три ДНК-связывающих домена, расположенных на N-конце, и домены, участвующие в связывании TBK1 и IRF3, расположенные на С-конце [73]. N-конец состоит из 2 tandemных Z-ДНК-связывающих доменов (Zα и Zβ, ZBDs) и третьего ДНК-связывающего региона (D3), способного связывать правозакрученную В-форму ДНК [71] (рис. 6).

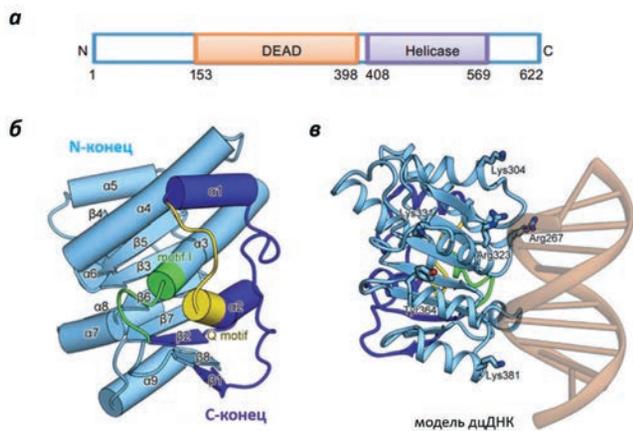


Рис. 7. Схема доменной организации DDX41 (а), модель структуры закрытой конформации DEAD-домена (б) и докинг модель комплекса DEAD-домена, связанного с дцДНК (в) (адаптировано из [85, 86], используется с разрешения издательства).

Структура ZBDs состоит из трех α -спиралей и трех β -складок, в составе которых находятся консервативные аминокислотные остатки, вовлеченные в связывание с Z-конформацией ДНК. Показано, что в узнавании доменами ZBDs зигзаг формы ДНК принимает участие $\alpha 3$ -спираль и β -складки ($\beta 2$ и $\beta 3$) [74–76]. Важную роль играют положительно заряженные или полярные аминокислотные остатки, а также прямые ионные взаимодействия, водородные связи, образуемые фосфатными остатками остова ДНК и гидрофобные взаимодействия (Trp, Thr, Pro) [77]. Исследования показали, что оба домена Z α и Z β одновременно связываются с Z-формой ДНК. При исследовании Z β -домена белка человека была показана уникальная кристаллическая структура домена, формируемая для узнавания Z-формы ДНК, а также способность этого домена осуществлять конвертацию В-формы в Z-форму [74]. Предполагается, что с одной молекулой дцДНК могут связаться 2 молекулы DAI, что приводит к димеризации DAI и усилению иммунного ответа. Для активации сильного иммунного ответа в ответ на ДНК необходимо наличие всех трех доменов в составе DAI [78].

Такаока и соавторы продемонстрировали индукцию генов интерферонов I типа в ответ на дцДНК в мышечных фибробластах L929 с повышенным уровнем экспрессии DAI, а в клетках со сниженной экспрессией DAI ингибирование их индукции [71]. После связывания дцДНК с DAI, DAI копреципитирует одновременно с протеинкиназой ТВК1 и с транскрипционным фактором IRF3, что указывает на его прямую или непрямую ассоциацию с этими

белками. Предполагается, что формирование данного комплекса ZBP1(DAI)–ТВК1–IRF3 активирует IRF3 и вызывает транслокацию IRF3 в ядро.

Дальнейшие исследования на DAI-дефицитных мышцах и эмбриональных фибробластах показали нормальный уровень продукции интерферонов в ответ на вирусную ДНК [79]. Снижение экспрессии ZBP1 не оказывало влияние на активацию IRF3–ТВК1 сигнального пути и продукцию IFN- β в клетках A549 и HepG2 [80, 81]. В разных типах клеток экспрессия ZBP1 варьирует, а регуляция ZBP1 сигнальных каскадов представляется довольно сложной, поскольку наряду с активацией IRF3 в клетках активируется NF- κ B за счет присутствия в составе ZBP1 RHIMs-мотивов, вовлеченных в активацию протеинкиназ RIPK1 и RIPK3 [82]. Так, например, в кардиомиоцитах при действии доксорубина происходит выход мтДНК в цитоплазму, что вызывает повышение экспрессии *Zbp1*, интерферонов I типа и других интерферон-стимулируемых генов (interferon-stimulating genes, ISGs). При снижении экспрессии *Ifnar*^{-/-}, *Sting*^{-/-}, и *Zbp1*^{-/-} в кардиомиоцитах эффект доксорубина на экспрессию ISGs отсутствует. Выход мтДНК в цитоплазму кардиомиоцитов приводит к формированию комплекса ZBP1–сGAS–RIPK1–RIPK3, фосфорилированию STAT1 и интерфероновому ответу. Формирование комплекса ZBP1–сGAS происходит за счет связывания N-концевого RHIM-домена ZBP1 с ДНК-связывающим доменом сGAS. Предполагается, что этот комплекс задействован в поддержании интерфероновой реакции клетками при митохондриальной дисфункции [83]. Это дает основание полагать, что сигнальная ось ZBP1–сGAS–STING вовлечена в интерфероновый ответ в клетках сердца, а влияние на этот путь может снизить доксорубин-индуцированную кардиотоксичность. Происходит ли формирование подобного комплекса между ZBP1 и сGAS в иммунокомпетентных клетках еще предстоит выяснить. Таким образом, ZBP1 (DAI) может быть крайне необходимым сенсором ДНК для активации интерфероновой реакции, но активироваться в клетках в зависимости от их типа.

DDX41

DDX41 (DEAD-box helicase 4) РНК-хеликаза — цитоплазматический сенсор нуклеиновых кислот, который участвует в узнавании вирусов, например, вируса HSV-1 и аденовируса, в разных типах клеток: в миелоидных дендритных клетках и мышечных дендритных клетках из костного мозга и других. DDX41 относится к семейству DExD/H-box РНК-хеликаз, вовлеченных

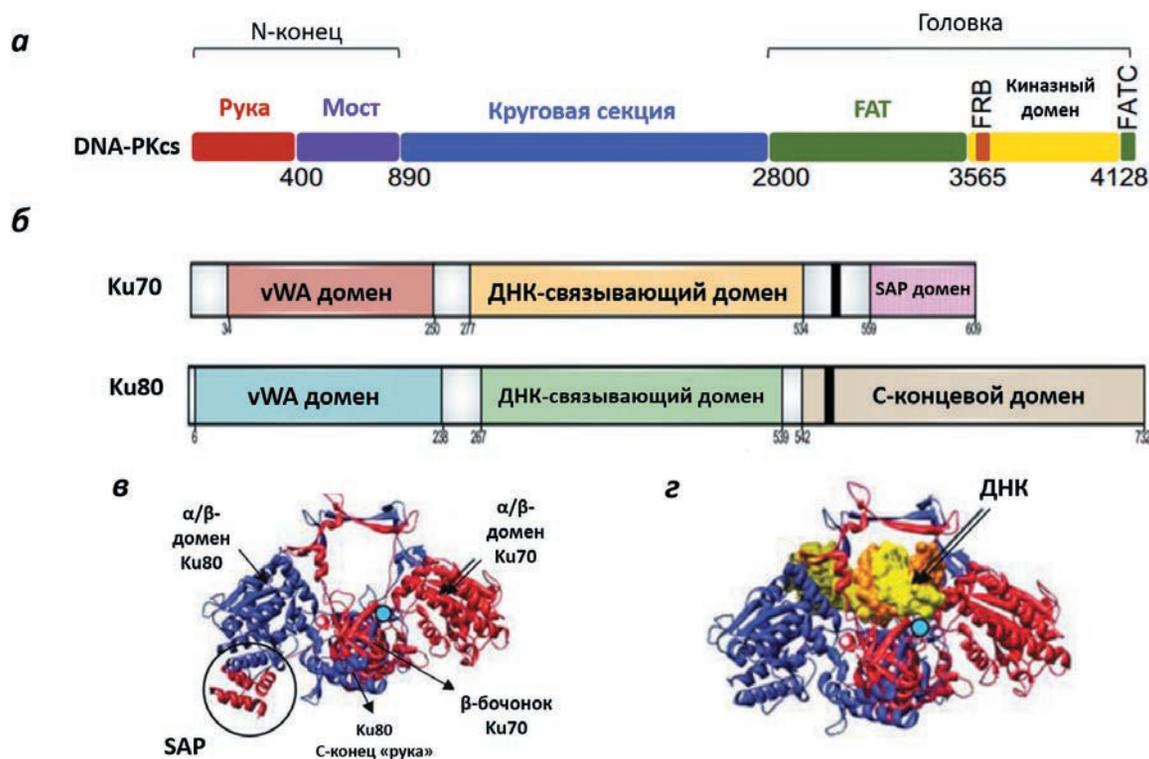


Рис. 8. Схема доменной организации DNA-PKcs (а) и субъединиц Ku70, Ku80 человека (б), модель вторичной структуры димерного комплекса субъединиц Ku80 (фиолетовый цвет) и Ku70 (красный цвет) (в) и комплекса ДНК (желто-оранжевый цвет) с гетеродимером Ku70–Ku80 (г) (адаптировано из [94–96], используется с разрешения издательства). Аминокислота, после которой начинается специфичная для субъединицы Ku70 аминокислотная последовательность, отмечена голубой заполненной точкой.

в продукцию интерферонов I типа [84]. В структуре белка DDX41 присутствуют хеликазный домен (HELIC) и домен DEAD/H-box, имеющие разные функциональные мотивы (рис. 7).

Домен HELIC содержит консервативные I- и Q-мотивы, которые участвуют в связывании и гидролизе АТФ, а DEAD-домен содержит такие мотивы, как Q-мотив, Р-петлю, Ia-мотив, Ib-мотив, мотив II, мотив III. Считается, что Р-петля в составе DEAD-домена связывает дцДНК и циклические динуклеотиды, а также согласно модели молекулярного моделирования (докинг модель) предполагается, что в формирование сайта связывания ДНК вовлечены аминокислотные остатки: Arg267, Lys304, Tyr364, Lys381, расположенные на С-конце. Домен HELIC, вероятнее всего, способен ингибировать связывание между DEAD/H-box-доменом и его лигандами [87]. Предполагается прямое взаимодействие DDX41 со STING, которое приводит к повышению продукции интерферона I типа. Zhang и соавторы выявили, что из большого числа членов семейства DEAD/H-box-хеликаз только при нокауте DDX41 в миелоидных дендритных

клетках и моноцитах человека значительно снижается продукция IFN- β в ответ на трансфекцию poly(dA-dT). Интересно, что при заражении клеток РНК-вирусами, такой эффект не был обнаружен. DDX41 является сенсором бактериальных вторичных мессенджеров cGMP и sAMP, появление которых в цитоплазме приводит к активации интерферон-зависимого иммунного ответа [88]. В моноцитах и макрофагоподобных клетках с нокаутом DDX41 нарушалась активация cGAS и STING [89]. На основании этих данных было сделано заключение о том, что DDX41 является STING-зависимым сенсором ДНК. Однако в зависимости от типа клеток и типа вируса, вовлечение DDX41 в те или иные сигнальные пути может отличаться. Так, например, было показано, что подавление экспрессии DDX41 с помощью РНК-интерференции (RNAi) в клетках hTERT не сильно влияло на продукцию IFN- β при заражении клеток вирусной ДНК (HSV1 или бакуловиром) [90].

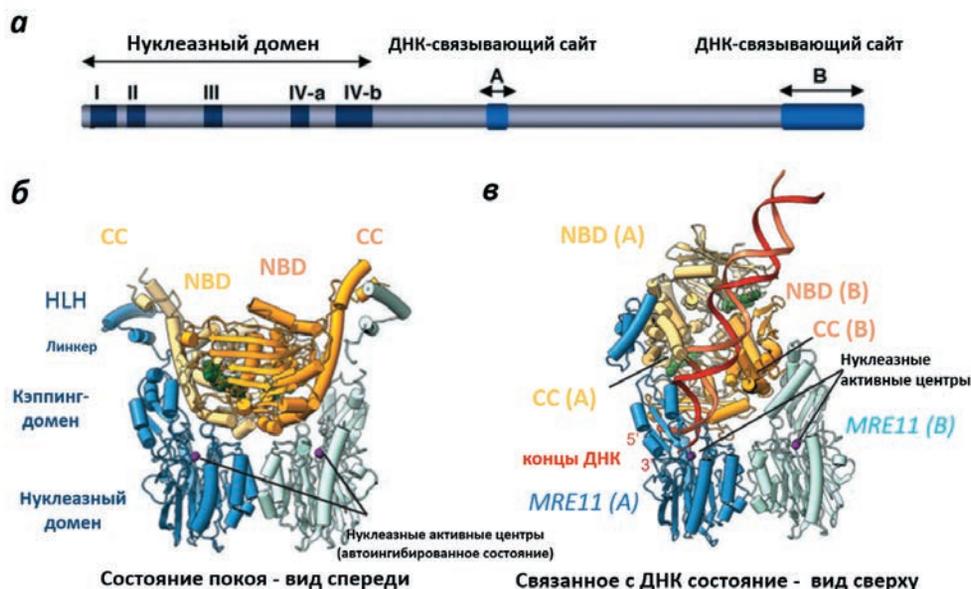


Рис. 9. Схема доменной организации MRE-11 (а) и модель комплекса *E. coli* MRE11–RAD50 в состоянии покоя (б) и в связанном с ДНК состоянии (в) (адаптировано из [102, 103], используется с разрешения издательства). Связывание ДНК вызывает сдвиг в нуклеотид-связывающих доменах (NBD) и перестройки в MRE-11, что приводит к формированию канала в области активных центров и зажиму концов ДНК. HLH — спираль-петля-спираль, CC — двойная спираль.

DNA-РК и MRE-11

Белок ДНК-зависимая протеинкиназа DNA-РК (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit) вовлечен в репарацию разрывов и повреждений ДНК. При нахождении в ядре DNA-РК участвует в репарации разрывов дцДНК [91], а при нахождении в цитоплазме участвует в иммунном ответе при проникновении патогенов [92]. DNA-РК относится к семейству Ser/Thr PIKK-протеинкиназ, способных к автофосфорилированию и фосфорилированию других эффекторов репарации [93]. DNA-РК представляет собой гетеротримерный белковый комплекс (460 кДа), который включает три субъединицы: Ku70 (70 кДа), Ku80 (86 кДа) и каталитическую субъединицу DNA-РКcs.

Субъединица DNA-РКcs состоит из нескольких доменов: N-концевого участка, включающего руку (красный цвет), мост (темно-фиолетовый цвет) и круговую секцию (сине-фиолетовый цвет); головки, включающей FAT (FRAP–ATM–TRRAP) (зеленый цвет), FRB (FKBP12-rapamycin-binding) (оранжевый цвет), киназный (желтый цвет) и FATC (FAT C-terminal) (темно-зеленый цвет) домены (рис. 8а). Сайты связывания с Ku-субъединицами располагаются в разных доменах на участках

102–210, 2178–2248 и 2374–2394 аминокислотной последовательности (а.п.). Участки 892–1289 и 1503–1538 а.п., расположенные в круговой секции, связывают ДНК [97]. Субъединицы Ku70 и Ku80 имеют схожую доменную структуру: N-концевой α/β -домен; центральный домен, состоящий из β -бочонков; и специфический C-концевой домен «рука», состоящий из спиралей (рис. 8б). N-концевой α/β -домен относится к семейству vWA (Willebrand factor A) доменов, включающих 6-цепочечные β -листы в складке Россмана, и участвует в ДНК репарации, но не принимает участие в прямом связывании ДНК, а также участвует в белок-белковых взаимодействиях. Центральный домен состоит из 7-цепочечных антипараллельных β -бочонков и участвует в связывании ДНК и гетеродимеризации. Связывание с ДНК не зависит от последовательности и имеет более высокую аффинность к дцДНК по сравнению к оцДНК. C-концевой домен участвует в узнавании ДНК и взаимодействии с DNA-РКcs и структурно различается у субъединиц Ku70 и Ku80. На C-конце субъединицы Ku70 присутствует ДНК-связывающий домен SAP (SAF-A/B, Acinus, and PIAS) (5 кДа). Предположительно этот домен стабилизирует взаимодействие Ku70 с ДНК [96] (рис. 8в). C-концевой

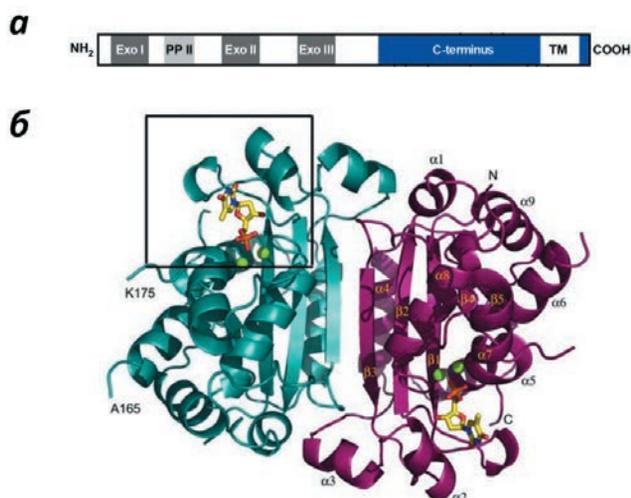


Рис. 10. Схема доменной организации TREX1 (а) и модель структуры гомодимера TREX1 (б) (адаптировано из [106, 107], используется с разрешения издательства). б — Мономеры TREX1 обозначены голубым и фиолетовым цветами. Черным квадратом выделена область активного центра, где связываются ионы магния (зеленые сферы) и нуклеотид dTMP (желто-оранжевая структура), а также происходит связывание оцДНК. В составе мономера присутствует неупорядоченная петля (166–174 а.о.), принимающая участие в связывании с дцДНК. Положение петли обозначено Ala165 и Lys175.

домен субъединицы Ku80 (CTD) (19 кДа) вовлечен во взаимодействие с DNA-ПКcs. Субъединицы Ku70 и Ku80 формируют гетеродимер, который совместно с третьей субъединицей DNA-ПКcs образуют тройной комплекс, связывающий ДНК (рис. 8г, DNA-ПКcs на рисунке не представлена). Аффинность связывания с ДНК падает в отсутствие гетеродимера Ku70/Ku80 [98].

Участие субъединиц Ku70, Ku80 и DNA-ПКcs в активации сигнального пути cGAS–STING и продукции интерферонов малоизучены. Ferguson и соавторы показали, что в цитоплазме фибробластов, являющихся первичной мишенью вирусов, наблюдается высокая базовая экспрессия белка DNA-ПК, и при проникновении чужой ДНК он выступает как PRRs, связывая ДНК, запускает транскрипцию генов интерферонов I типа, цитокинов и хемокинов с участием IRF3, TBK1 и STING [92]. Известно, что субъединица Ku70 вовлечена в процесс репарации ДНК и играет роль в связывании ДНК длиной свыше 500 п.о. и активации продукции интерферонов III типа посредством IRF1 и IRF7 [99]. При исследовании, выполненном на клетках с дефицитом STING,

было показано, что DNA-ПК реагирует на ДНК и активирует независимый от STING сигнальный путь SIDSP. У мышей с недостаточной экспрессией DNA-ПКcs наблюдаются нарушения в продукции цитокинов в условиях стимуляции вирусной ДНК, но не вирусной РНК [100]. Таким образом, какие механизмы активации cGAS–STING сигнального пути приводят к продукции провоспалительных цитокинов с участием DNA-ПК, еще предстоит выяснить.

Белок MRE-11 участвует в репарации разрывов дцДНК, гомологичной рекомбинации и поддержании длины теломеров. Данный белок обладает 3’–5’ экзонуклеазной и эндонуклеазной активностью и взаимодействует с белком репарации ДНК RAD50 [101]. MRE-11 состоит из нуклеазного домена, включающего четыре высококонсервативных фосфодиэстеразных мотива, и двух ДНК-связывающих доменов: ДНК-связывающий сайт А (407–421 а.о.) с кластером положительно заряженных а.о. и ДНК-связывающий сайт В (644–692 а.о.) с кластером отрицательно-заряженных а.о. (рис. 9а).

На рис. 9б представлена модель комплекса димеров RAD50 (оранжевый/желтый цвета) и MRE-11 (голубой/синий цвета) в покоем состоянии. В мономерах RAD50 показаны нуклеотид-связывающие домены (NBD) и двойные спирали (CC). В мономере MRE-11 обозначены несколько доменов: нуклеазный домен с аутоингибированными активными сайтами, кэппинг-домен, линкер и С-концевой HLH (helix-loop-helix, спираль-петля-спираль) домен, связывающий RAD50. Криоэлектронная структура показывала, что в состоянии покоя ATP–RAD50 блокирует нуклеазный домен MRE-11. В условиях связывания ДНК нуклеазный домен освобождается и образуется канал, где происходит нуклеазная реакция на концах ДНК [103] (рис. 9в).

Известно, что белок MRE-11, являясь сенсором ДНК, способен активировать STING [104]. Показано, что при мутациях в нуклеазном домене MRE-11 стимуляция клеток ДНК вызывает более сильный иммунный ответ. Это дает основание полагать, что MRE-11 может функционировать не только как сенсор ДНК, но и как регулятор, запускающий или подавляющий иммунный ответ. В свою очередь, RAD в составе комплекса RAD50–MRE-11 также может связывать CARD9, что приводит к вовлечению в сигнальный каскад Vcl-10 и активации NF-κB, а также к продукции IL-1β в ответ на связывание с ДНК [105]. Для установления детального механизма участия комплекса RAD50–MRE-11 в STING-зависимом сигнальном

пути, вызывающем продукцию цитокинов, необходимы дальнейшие исследования.

TREX1

Многие сенсоры нуклеиновых кислот расположены в цитоплазме, где появление ДНК является неблагоприятным сигналом. Так, появление в цитоплазме собственной ДНК в результате дефектов различных механизмов удаления ДНК из цитоплазмы, может вызывать активацию провоспалительных сигнальных каскадов. В устранении нуклеиновых кислот, накапливающихся в цитоплазме и вызывающих активацию сигнальных каскадов врожденного иммунитета, принимает участие экзонуклеаза TREX1 (three prime repair exonuclease 1).

Белок TREX1 относится к семейству DEDD-экзонуклеаз, имеющих в составе консервативный Asp—Glu—Asp—Asp-мотив и обладающих 3'-экзонуклеазной активностью. Белки из этого семейства удаляют лишние нуклеотиды с 3'-конца оцДНК при репликации и/или репарации. Структурно TREX1 (молекулярный вес 32 кДа, 314 а.о.) состоит из трех доменов с экзонуклеазной активностью (экзонуклеазный домен I, II, и III) и полипролинового домена (PPII), расположенных на N-конце, а также C-концевой области (80 а.о., с большим количеством Leu), включающей один трансмембранный домен, который участвует в клеточной локализации фермента в ЭПР (преимущественно в перинуклеарном пространстве) (рис. 10а). TREX1 функционирует в качестве гомодимера, причем структура сформированного димера TREX1 уникальна среди белков этого семейства и определяет его каталитическую активность [106–108] (рис. 10б). Известно, что C-конец TREX1 способен взаимодействовать с гликозилирующим комплексом (OST) и комплексом репарации ДНК (SET).

TREX1 вовлечен в иммунную регуляцию в ответ на вирусную инфекцию. При инфицировании HIV1 в клетках снижалось количество вирусной ДНК за счет работы TREX1, что предотвращало активацию STING-зависимого сигнального пути [109]. Предполагается, что TREX1 выступает в роли отрицательного регулятора врожденного иммунного ответа путем деградации aberrантной ДНК (оцДНК, ретроэлементы и др.), препятствуя ее накоплению в цитоплазме и отменяя стимуляцию STING-опосредованной продукции интерферонов I типа в иммунных и опухолевых клетках [110]. При мутациях в гене *Trex1* или подавлении экспрессии *Trex1* у мышей происходит повышение продукции интерферона и развитие серьезных аутоиммунных заболеваний (системная красная

волчанка, амиотрофический латеральный склероз и др.) [111–113].

Вопрос о том, как TREX1 способен активировать сигнальный путь cGAS—STING остается малоизученным. Возможно, между TREX1 и STING существует какое-то прямое или не прямое взаимодействие, поскольку и TREX1, и STING локализируются в ЭПР. Однако важно отметить, что TREX1 в качестве субстрата использует оцДНК, тогда как STING преимущественно активируется дцДНК. Получение животных с одновременным нокаутом TREX1 и STING поможет понять степень взаимодействия между этими белками, а также установить роль TREX в активации STING-зависимой продукции интерферонов. Несмотря на то, что механизмы участия TREX в индукции интерферона требуют более детального изучения, в настоящее время разработка ингибиторов TREX1 является одной из стратегий активации сигнальных путей, приводящих к продукции провоспалительных цитокинов. Уже был синтезирован ингибитор TREX1, CPI-381, и исследовано его влияние на активацию сигнального каскада cGAS—STING в условиях *in vitro* и противоопухолевое действие в условиях *in vivo*. CPI-381 вызывал продукцию cGAMP в клетках B16F1 после трансфекции ДНК. В клетках THP-1 наблюдалась повышенная экспрессия ключевых интерферон-стимулируемых генов. В клетках B16F10, MB49, MC38, CT26 с нокаутом TREX повышалась секреция IFN- β . У мышей с сингенной опухолью, вызванной клетками MC38, отмечалось снижение роста опухолей, как при лечении CPI-381, так и в комбинации с анти-PD1-терапией [114].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разнообразие внутриклеточных сенсоров нуклеиновых кислот, участвующих в активации cGAS—STING сигнального пути, индуцирующего иммунный ответ, открывает широкие возможности для применения агонистов или антагонистов этих сенсоров с целью повышения или снижения иммунного ответа при онкологических и других заболеваниях. Однако для использования этой стратегии в терапии рака на практике потребуются провести большое количество исследований, посвященных определению состояния молекулярно-генетического профиля cGAS—STING сигнального пути в разных типах опухолей, в связи с тем, что в некоторых типах рака (рак толстой кишки и меланома) STING-зависимый сигнальный путь подавлен из-за генетических мутаций или эпигенетической регуляции промоторов STING/cGAS, что приводит к невозможности продукции цитокинов и их участию в иммунологическом надзоре [115]. Таким

образом, для разработки STING-таргетированной терапии могут потребоваться персонализированные протоколы, учитывающие особенности cGAS–STING сигнального пути конкретных пациентов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 075–15–2021–1060 от 28.09.2021 г. и НИР в рамках ГЗ на выполнение государственных работ в сфере научной деятельности ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по теме: «Разработка нового класса противоопухолевых препаратов, основанных на таргетной стимуляции сигнального пути STING в злокачественных новообразованиях» (№ 123021500025–1).

Соответствие принципам этики. Для данной статьи авторами не проводились эксперименты с участием людей или животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zahid A., Ismail H., Li B., Jin T. 2020. Molecular and structural basis of DNA sensors in antiviral innate immunity. *Front Immunol.* **11**, 613039. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.613039>
- Bartok E., Hartmann G. 2020. Immune sensing mechanisms that discriminate self from altered self and foreign nucleic acids. *Immunity.* **53** (1), 54–77. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.014>
- Ablasser A., Hur S. 2020. Regulation of cGAS- and RLR-mediated immunity to nucleic acids. *Nat. Immunol.* **21**, 17–29. doi 10.1038/s41590–019–0556–1
- Jiang M., Chen P., Wang L., Li W., Chen B., Liu Y., Wang H., Zhao S., Ye L., He Y., Zhou C. 2020. cGAS-STING, an important pathway in cancer immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.* **13**, 81. <https://doi.org/10.1186/s13045–020–00916-z>
- Zhou J., Zhuang Z., Li J., Feng Z. 2023. Significance of the cGAS-STING pathway in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **24** (17), 13316. <https://doi.org/10.3390/ijms241713316>
- Chen Q., Sun L., Chen Z.J. 2016. Regulation and function of the cGAS–STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat. Immunol.*, **17**, 1142–1149. <https://doi.org/10.1038/ni.3558>
- Li Q., Tian S., Liang J., Fan J., Lai J., Chen Q. 2021. Therapeutic development by targeting the cGAS-STING Pathway in autoimmune disease and cancer. *Front. Pharmacol.* **12**, 779425. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.779425>
- Zhang D., Liu Y., Zhu Y., Zhang Q., Guan H., Liu S., Chen S., Mei C., Chen C., Liao Z., Xi Y., Ouyang S., Feng X.-H., Liang T., Shen L., Xu P. 2022. A non-canonical cGAS-STING-PERK pathway facilitates the translational program critical for senescence and organ fibrosis. *Nat. Cell Biol.* **24** (5), 766–782. <https://doi.org/10.1038/s41556–022–00894-z>
- Sun L., Wu J., Du F., Chen X., Chen Z.J. 2013. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science.* **339**, 786–791. <https://doi.org/10.1126/science.1232458>
- Wu X., Wu F.-H., Wang X., Wang L., Siedow J.N., Zhang W., Pei Z.-M. 2014. Molecular evolutionary and structural analysis of the cytosolic DNA sensor cGAS and STING. *Nucleic Acids Res.* **42** (13), 8243–8257. <https://doi.org/10.1093/nar/gku569>
- Zhou W., Whiteley A.T., de Oliveira Mann C.C., Morehouse B.R., Nowak R.P., Fischer E.S., Gray N.S., Mekalanos J.J., Kranzusch P.J. 2018. Structure of the human cGAS-DNA complex reveals enhanced control of immune surveillance. *Cell.* **174** (2), 300–311, e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.026>
- Wang D., Zhao H., Shen Y., Chen Q. 2022. A variety of nucleic acid species are sensed by cGAS, implications for its diverse functions. *Front. Immunol.* **13**, 826880. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.826880>
- Wu J., Sun L., Chen X., Du F., Shi H., Chen C., Chen Z.J. 2013. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science.* **339** (6121), 826–830. <https://doi.org/10.1126/science.1229963>
- Herzner A.-M., Hagmann C.A., Goldeck M., Wolter S., Kübler K., Wittmann S., Gramberg T., Andreeva L., Hopfner K.-P. Mertens C., Zillinger T., Jin T., Xiao T.S., Bartok E., Coch C., Ackermann D., Hornung V., Ludwig J., Barchet W., Hartmann G., Schlee M. 2015. Sequence-specific activation of the DNA sensor cGAS by Y-form DNA structures as found in primary HIV-1 cDNA. *Nat. Immunol.* **16** (10), 1025–1033. <https://doi.org/10.1038/ni.3267>
- Gentili M., Kowal J., Tkach M., Satoh T., Lahaye X., Conrad C., Boyron M., Lombard B., Durand S., Kroemer G., Loew D., Dalod M., Théry C., Manel N. 2015. Transmission of innate immune signaling by packaging of cGAMP in viral particles. *Science.* **349** (6253), 1232–1236. <https://doi.org/10.1126/science.aab3628>
- Zhang X., Wu J., Du F., Xu H., Sun L., Chen Z., Brautigam C.A., Zhang X., Chen Z.J. 2014. The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop. *Cell Rep.* **6** (3), 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.003>
- Li X., Shu C., Yi G., Chaton C.T., Shelton C.L., Diao J., Zuo X., Kao C.C., Herr A.B., Li P. 2013. Cyclic GMP-AMP synthase is activated by double-stranded DNA-induced oligomerization. *Immunity.* **39**(6), 1019–1031. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.019>

18. Kranzusch P. J., Lee A.S.-Y., Berger J.M., Doudna J.A. 2013. Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity. *Cell Rep.* **3** (5), 1362–1368. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.008>
19. Huérfano S., Šroller V., Bruštková K., Horníková L., Forstová J. 2022. The interplay between viruses and host DNA sensors. *Viruses.* **14** (4), 666. <https://doi.org/10.3390/v14040666>
20. Yoh S. M., Schneider M., Seifried J., Soonthornvacharin S., Akleh R.E., Olivieri K.C., De Jesus P.D., Ruan C., de Castro E., Ruiz P.A., Germanaud D., des Portes V., García-Sastre A., König R., Chanda S.K. 2015. PQBP1 is a proximal sensor of the cGAS-dependent innate response to HIV-1. *Cell.* **161** (6), 1293–1305. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.050>
21. Seo G. J., Yang A., Tan B., Kim S., Liang Q., Choi Y., Yuan W., Feng P., Park H.-S., Jung J.U. 2015. Akt kinase-mediated checkpoint of cGAS DNA sensing pathway. *Cell Rep.* **13** (2), 440–449. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.007>
22. Xia P., Ye B., Wang S., Zhu X., Du Y., Xiong Z., Tian Y., Fan Z. 2016. Glutamylation of the DNA sensor cGAS regulates its binding and synthase activity in antiviral immunity. *Nat. Immunol.* **17** (4), 369–378. <https://doi.org/10.1038/ni.3356>
23. Jiang H., Xue X., Panda S., Kawale A., Hooy R.M., Liang F., Sohn J., Sung P., Gekara N.O. 2019. Chromatin-bound cGAS is an inhibitor of DNA repair and hence accelerates genome destabilization and cell death. *EMBO J.* **38** (21), e102718. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102718>
24. Michalski S., Mann C.C. de O., Stafford C.A., Witte G., Bartho J., Lammens K., Hornung V., Hopfner K.-P. Structural basis for sequestration and autoinhibition of cGAS by chromatin. *Nature.* **587** (7835), 678–682. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2748-0>
25. Zhou S., Su T., Cheng F., Cole J., Liu X., Zhang B., Alam S., Liu J., Zhu G. 2023. Engineering cGAS-agonistic oligonucleotides as therapeutics and vaccine adjuvants for cancer immunotherapy. *bioRxiv*, 2023.07.13.548237. <https://doi.org/10.1101/2023.07.13.548237>. Preprint
26. Ishikawa H., Barber G.N. 2008. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signaling. *Nature.* **455**, 674–678. <https://doi.org/10.1038/nature07317>
27. Hussain B., Xie Y., Jabeen U., Lu D., Yang B., Wu C., Shang G. 2022. Activation of STING based on its structural features. *Front. Immunol.* **13**, 808607. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.808607>
28. Zhang X., Shi H., Wu J., Zhang X., Sun L., Chen C., Chen Z.J. 2013. Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Mol. Cell.* **51**, 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.022>
29. Kato H., Takeuchi O., Mikamo-Satoh E., Hirai R., Kawai T., Matsushita K., Hiiragi A., Dermody T.S., Fujita T., Akira S. 2008. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.* **205** (7), 1601–1610. <https://doi.org/10.1084/jem.20080091>
30. Shang G., Zhang C., Chen Z.J., Bai X.-C., Zhang X. 2019. Cryo-EM structures of STING reveal its mechanism of activation by cyclic GMP-AMP. *Nature.* **567**, 389–393. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0998-5>
31. Mukai K., Konno H., Akiba T., Uemura T., Waguri S., Kobayashi T., Barber G.N., Arai H., Taguchi T. 2016. Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi. *Nat. Commun.* **7**, 11932. <https://doi.org/10.1038/ncomms11932>
32. Liu S., Cai X., Wu J., Cong Q., Chen X., Li T., Du F., Ren J., Wu Y.-T., Grishin N.V., Chen Z.J. 2015. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science.* **347** (6227), eaat8657. <https://doi.org/10.1126/science.aaa2630>
33. Agalioti T., Lomvardas S., Parekh B., Yie J., Maniatis T., Thanos D. 2000. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN β promoter. *Cell.* **103** (4), 667–678. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00169-0)
34. Zhang J., Hu M.M., Wang Y.Y., Shu H.B. 2012. TRIM32 protein modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting MITA/STING protein for K63-linked ubiquitination. *J. Biol. Chem.* **287**, 28646–28655
35. Tsuchida T., Zou J., Saitoh T., Kumar H., Abe T., Matsuura Y., Kawai T., Akira S. 2010. The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA. *Immunity* **33**, 765–776. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.013>
36. Zhong B., Zhang L., Lei C., Li Y., Mao A.-P., Yang Y., Wang Y.-Y., Zhang X.-L., Shu H.-B. 2009. The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA. *Immunity.* **30**, 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.008>
37. Wang Y., Lian Q., Yang B., Yan S., Zhou H., He L., Lin G., Lian Z., Jiang Z., Sun B. 2015. TRIM30a is a negative-feedback regulator of the intracellular DNA and DNA virus-triggered response by targeting STING. *PLoS Pathog.* **11**, e1005012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005012>
38. Ishikawa H., Barber G.N. 2008. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signaling. *Nature.* **455** (7213), 674–678. <https://doi.org/10.1038/nature07317>
39. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* **408**, 740–745

40. Abe T., Harashima A., Xia T., Konno H., Konno K., Morales A., Ahn J., Gutman D., Barber G.N. 2013. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Mol. Cell.* **50** (1), 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.039>
41. Demaria O., Gassart A.D., Coso S., Gestermann N., Di Domizio J., Flatz L., Gaide O., Michielin O., Hwu P., Petrova T.V., Martinon F., Modlin R.L., Speiser D.E., Gilliet M. 2015. STING activation of tumor endothelial cells initiates spontaneous and therapeutic antitumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112** (50), 15408–15413. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512832112>
42. Padovan E., Spagnoli G.C., Ferrantini M., Heberer M. 2002. IFN- α 2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8⁺ effector T cells. *J. Leukoc. Biol.* **71** (4), 669–676. <https://doi.org/10.1189/jlb.71.4.669>
43. Glickman L. H., Kanne D.B., Kasibhatla S., Li J., Pferdekamper A.M.C., Gauthier K.S., Deng W., Desbien A.L., Katibah G.E., Leong J.J., Sung L., Metchette K., Ndubaku C., Zheng L., Cho C., Feng Y., McKenna J.M., Tallarico J.A., Bender S.L., Dubensky T.W., McWhirter S.M. 2016. STING activation in the tumor microenvironment with a synthetic human STING-activating cyclic dinucleotide leads to potent anti-tumor immunity. *Cancer Res.* **76** (14_Supplement), 1445. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2016-1445>
44. Sivick K. E., Desbien A.L., Glickman L.H., Reiner G.L., Corrales L., Surh N.H., Hudson T.E., Vu U.T., Francica B.J., Banda T., Katibah G.E., Kanne D.B., Leong J.J., Metchette K., Brumfiel J.R., Ndubaku C.O., McKenna J.M., Feng Y., Zheng L., Bender S.L., Cho C.Y., Leong M.L., van Elsas A., Dubensky Jr.T.W., McWhirter S.M. 2018. Magnitude of therapeutic STING activation determines CD8⁺ T cell-mediated anti-tumor immunity. *Cell Rep.* **25**, 3074–3085. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.047>
45. Meric-Bernstam F., Sweis R.F., Hodi F.S., Messersmith W.A., Andtbacka R.H.I., Ingham M., Lewis N., Chen X., Pelletier M., Chen X., Wu J., Dubensky T.W., McWhirter S.M., Muller T., Nitya N., Jason J.L. 2022. Phase I dose-escalation trial of MIW815 (ADU-S100), an intratumoral STING agonist, in patients with advanced/ metastatic solid tumors or lymphomas. *Clin. Cancer Res.* **28**, 677–688. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-1963>
46. Adli A. D.F., Jahanban-Esfahlan R., Seidi K., Samandari-Rad S., Zarghami N. 2018. An overview on Vademecan (DMXAA), the vascular disrupting agent. *Chem. Biol. Drug Des.* **91** (5), 996–1006. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13166>
47. Ramanjulu J. M., Pesiridis G.S., Yang J., Concha N., Singhaus R., Zhang S.-Y., et al. 2018. Design of amidobenzimidazole STING receptor agonists with systemic activity. *Nature.* **564** (7736), 439–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0705-y>
48. Liu J., Huang X., Ding J. 2021. Identification of MSA-2: An oral antitumor non-nucleotide STING agonist. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 18. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00459-2>
49. Jakobsen M. R., Bak R.O., Andersen A., Berg R.K., Jensen S.B., Jin T., Laustsen A., Hansen K., Ostergaard L., Fitzgerald K.A., Xiao T.S., Mikkelsen J.G., Mogensen T.H., Paludan S.R. 2013. IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110** (48), E4571–E4580. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311669110>
50. Kerur N., Veettil M.V., Sharma-Walia N., Bottero V., Sadagopan S., Otageri P., Chandran B. 2011. IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe.* **9** (5), 363–375. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.008>
51. Fan X., Jiang J., Zhao D., Chen F., Ma H., Smith P., Unterholzner L., Xiao T.S., Jin T. 2021. Structural mechanism of DNA recognition by the p204 HIN domain. *Nucleic Acids Research.* **49** (5), 2959–2972. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab076>
52. Morrone S. R., Wang T., Constantoulakis L.M., Hooy R.M., Delannoy M.J., Sohn J. 2014. Cooperative assembly of IFI16 filaments on dsDNA provides insights into host defense strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111** (1), E62–E71. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313577111>
53. Stratmann S. A., Morrone S.R., van Oijen A.M., Sohn J. 2015. The innate immune sensor IFI16 recognizes foreign DNA in the nucleus by scanning along the duplex. *Elife.* **4**, e11721. <https://doi.org/10.7554/eLife.1172>
54. Ni X., Ru H., Ma F., Zhao L., Shaw N., Feng Y., Ding W., Gong W., Wang Q., Ouyang S., Cheng G., Liu Z.-J. 2016. New insights into the structural basis of DNA recognition by HINa and HINb domains of IFI16. *J. Mol. Cell Biol.* **8** (1), 51–61. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv053>
55. Unterholzner L., Keating S.E., Baran M., Horan K.A., Jensen S.B., Sharma S., Sirois C.M., Jin T., Latz E., Xiao T.S., Fitzgerald K.A., Paludan S.R., Bowie A.G. 2010. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol.* **11**, 997–1004. <https://doi.org/10.1038/ni.1932>
56. Jin T., Perry A., Jiang J., Smith P., Curry J.A., Unterholzner L., Jiang Z., Horvath G., Rathinam V.A., Johnstone R.W., Hornung V., Latz E., Bowie A.G., Fitzgerald K.A., Xiao T.S. 2012. Structures of the HIN domain: DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity.* **36** (4), 561–571. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.014>
57. Ru H., Ni X., Zhao L., Crowley C., Ding W., Hung L.-W., Shaw N., Cheng G., Liu Z.-J. 2013. Structural basis for termination of AIM2-mediated signaling

- by p202. *Cell Res.* **23** (6), 855–858.
<https://doi.org/10.1038/cr.2013.52>
58. Buenrostro J. D., Giresi P.G., Zaba L.C., Chang H.Y., Greenleaf W.J. 2013. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat. Methods.* **10** (12), 1213–1218.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2688>
 59. Lum K. K., Howard T.R., Pan C., Cristea I.M. 2019. Charge-mediated pyrin oligomerization nucleates antiviral IFI16 sensing of herpesvirus DNA. *mBio.* **10** (4), e01428–19.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01428-19>
 60. Doitsh G., Galloway N.L.K., Geng X., Yang Z., Monroe K.M., Zepeda O., Hunt P.W., Hatano H., Sowinski S., Muñoz-Arias I., Greene W.C. 2014. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature.* **505** (7484), 509–514.
<https://doi.org/10.1038/nature12940>
 61. Jönsson K., Laustsen A., Krapp C., Skipper K., Thavachelvam K., Hotter D., Egedal J.H., Kjolby M., Mohammadi P., Prabakaran T., Sørensen L.K., Sun C., Jensen S.B., Holm C.K., Lebbink R.J., Johannsen M., Nyegaard M., Mikkelsen J.G., Kirchhoff F., Paludan S.R., Jakobsen M.R. 2017. IFI16 is required for DNA sensing in human macrophages by promoting production and function of cGAMP. *Nat. Commun.* **8**, 14391.
<https://doi.org/10.1038/ncomms14391>
 62. Rathinam V. A., Jiang Z., Waggoner S.N., Sharma S., Cole L.E., Waggoner L., Vanaja S.K., Monks B.G., Ganesan S., Latz E., Hornung V., Vogel S.N., Szomlanyi-Tsuda E., Fitzgerald K.A. 2010. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat. Immunol.* **11** (5), 395.
<https://doi.org/10.1038/ni.1864>
 63. Hauenstein A. V., Zhang L., Wu H. 2015. The hierarchical structural architecture of inflammasomes, supramolecular inflammatory machines. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **31**, 75–83.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.03.014>
 64. Sharma M., de Alba E. 2021. Structure, activation and regulation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2), 872.
<https://doi.org/10.3390/ijms22020872>
 65. Morrone S. R., Matyszewski M., Yu X., Delannoy M., Egelman E.H., Sohn J. 2015. Assembly-driven activation of the AIM2 foreign-dsDNA sensor provides a polymerization template for downstream ASC. *Nat. Commun.* **6**, 7827.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8827>
 66. Lu A., Li Y., Yin Q., Ruan J., Yu X., Egelman E., Wu H. 2015. Plasticity in PYD assembly revealed by cryo-EM structure of the PYD filament of AIM2. *Cell Discovery.* **1**, 15013.
<https://doi.org/10.1038/celldisc.2015.13>
 67. Hornung V., Ablasser A., Charrel-Dennis M., Bauernfeind F., Horvath G., Caffrey D.R., Latz E., Fitzgerald K.A. 2009. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature.* **458**, 514–518.
 68. Panchanathan R., Duan X., Shen H., Rathinam V.A.K., Erickson L.D., Fitzgerald K.A., Choubey D. 2010. Aim2 deficiency stimulates the expression of IFN-inducible Ifi202, a lupus susceptibility murine gene within the Nba2 autoimmune susceptibility locus. *J. Immunol.* **185** (12), 7385–7393.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002468>
 69. Corrales L., Woo S.-R., Williams J.B., McWhirter S.M., Dubensky Jr T.W., Gajewski T.F. 2016. Antagonism of the STING pathway via activation of the AIM2 inflammasome by intracellular DNA. *J. Immunol.* **196** (7), 3191–3198.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502538>
 70. 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 3rd C.E., Sher A. 2014. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature.* **511** (7507), 99–103.
<https://doi.org/10.1038/nature13489>
 71. Takaoka A., Wang Z., Choi M.K., Yanai H., Negishi H., Ban T., Lu Y., Miyagishi M., Kodama T., Honda K., Ohba Y., Taniguchi T. 2007. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature.* **448**, 501–505.
<https://doi.org/10.1038/nature06013>
 72. Deigendesch N., Koch-Nolte F., Rothenburg S. 2006. ZBP1 subcellular localization and association with stress granules is controlled by its Z-DNA binding domains. *Nucleic Acids Res.* **34** (18), 5007–5020.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl575>
 73. Ha S. C., Quyen D.V., Hwang H.-Y., Oh D.-B., Brown 2nd B.A., Lee S.M., Park H.-J., Ahn J.-H., Kim K.K., Kim Y.-G. 2006. Biochemical characterization and preliminary X-ray crystallographic study of the domains of human ZBP1 bound to left-handed Z-DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* **1764** (2), 320–323.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.12.012>
 74. Ha S. C., Kim D., Hwang H.-Y., Rich A., Kim Y.-G., Kim K.K. 2008. The crystal structure of the second Z-DNA binding domain of human DAI (ZBP1) in complex with Z-DNA reveals an unusual binding mode to Z-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105** (52), 20671–20676.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0810463106>
 75. Schwartz T., Behlke J., Lowenhaupt K., Heinemann U., Rich A. 2001. Structure of the DLM-1–Z-DNA complex reveals a conserved family of Z-DNA-binding proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **8**, 761–765.
 76. Athanasiadis A, Placido D., Maas S., Brown 2nd B.A., Lowenhaupt K., Rich A. 2005. The crystal structure of the Z-domain of the RNA-editing enzyme ADAR1 reveals distinct conserved surfaces among Z-domains. *J. Mol. Biol.* **351**, 496–507.

77. Schwartz T., Rould M.A., Lowenhaupt K., Herbert A., Rich A. 1999. Crystal structure of the Z-domain of the human editing enzyme ADAR1 bound to left-handed Z-DNA. *Science*. **284**, 1841–1845.
78. Wang Z., Choi M.K., Ban T., Yanai H., Negishi H., Lu Y., Tamura T., Takaoka A., Nishikura K., Taniguchi T. 2008. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105** (14), 5477–5482. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801295105>
79. Ishii K. J., Kawagoe T., Koyama S., Matsui K., Kumar H., Kawai T., Uematsu S., Takeuchi O., Takeshita F., Coban C., Akira S. 2008. TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature*. **451** (7179), 725–729. <https://doi.org/10.1038/nature06537>
80. Lippmann J., Rothenburg S., Deigendesch N., Eitel J., Meixenberger K., van Laak V., Slevogt H., Dje N'guessan P., Hippenstiel S., Chakraborty T., Flieger A., Suttorp N., Opitz B. 2008. IFN β responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI). *Cell Microbiol.* **10** (12), 2579–2588. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01232.x>
81. Pham T. H., Kwon K.M., Kim Y.-E., Kim K.K., Jin-Hyun Ahn. 2013. DNA sensing-independent inhibition of herpes simplex virus 1 replication by DAI/ZBP1. *J. Virol.* **87** (6), 3076–3086. <https://doi.org/10.1128/JVI.02860-12>
82. Rebsamen M., Heinz L.X., Meylan E., Michallet M.-C., Schroder K., Hofmann K., Vazquez J., Benedict C.A., Tschopp J. 2009. DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF- κ B. *EMBO Rep.* **10** (8), 916–922. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.109>
83. Lei Y., VanPortfliet J.J., Chen Y.-F., Bryant J.D., Li Y., Fails D., Torres-Odio S., Ragan K.B., Deng J., Mohan A., Wang B., Brahms O.N., Yates S.D., Spencer M., Tong C.W., Bosenberg M.W., West L.C., Shadel G.S., Shutt T.E., Upton J.W., Li P., West A.P. 2023. Cooperative sensing of mitochondrial DNA by ZBP1 and cGAS promotes cardiotoxicity. *Cell*. **186** (14), 3013–3032, e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.05.039>
84. Omura H., Oikawa D., Nakane T., Kato M., Ishii R., Ishitani R., Tokunaga F., Nureki O. 2016. Structural and Functional Analysis of DDX41: A bispecific immune receptor for DNA and cyclic dinucleotide. *Sci. Rep.* **6** (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep34756>
85. Jiang Y., Zhu Y., Qiu W., Liu Y.-J., Cheng G., Liu Z.-J., Ouyang S. 2017. Structural and functional analyses of human DDX41 DEAD domain. *Protein Cell.* **8** (1), 72–76. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0351-9>
86. Jiang Y., Zhu Y., Liu Z.-J., Ouyang S. 2017. The emerging roles of the DDX41 protein in immunity and diseases. *Protein Cell.* **8**(2), 83–89. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0303-4>
87. Zhang Z., Yuan B., Bao M., Lu N., Kim T., Liu Y.-J. 2011. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat. Immunol.* **12**(10), 959–965. <https://doi.org/10.1038/ni.2091>
88. Parvatiyar K., Zhang Z., Teles R.M., Ouyang S., Jiang Y., Iyer S.S., Zaver S.A., Schenk M., Zeng S., Zhong W., Liu Z.-J., Modlin R.L., Liu Y.-J., Cheng G. 2012. The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nat. Immunol.* **13**, 1155–1161.
89. Singh R. S., Vidhyasagar V., Yang S., Arna A.B., Yadav M., Aggarwal A., Aguilera A.N., Shinriki S., Bhanumathy K.K., Pandey K., Xu A., Rapin N., Bosch M., DeCoteau J., Xiang J., Vizeacoumar F.J., Zhou Y., Misra V., Matsui H., Ross S.R., Wu Y. 2022. DDX41 is required for cGAS-STING activation against DNA virus infection. *Cell Rep.* **39** (8), 110856. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110856>
90. Abe T., Harashima A., Xia T., Konno H., Konno K., Morales A., Ahn J., Gutman D., Barber G.N. 2013. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Mol. Cell.* **50** (1), 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.039>
91. Lieber M. R., Ma Y., Pannicke U., Schwarz K. 2003. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 712–720. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.039>
92. Ferguson B. J., Mansur D.S., Peters N.E., Ren H., Smith G.L. 2012. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *Elife*, **1**, e00047. <https://doi.org/10.7554/eLife.00047>
93. Hartley K. O., Gell D., Smith G.C., Zhang H., Divecha N., Connelly M.A., Admon A., Lees-Miller S P., Anderson C.W., Jackson S.P. 1995. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: A relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell*. **82**, 849–856. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90482-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90482-4)
94. Sharif H., Li Y., Dong Y., Dong L., Wang W.L., Mao Y., Wu H. 2017. Cryo-EM structure of the DNA-PK holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114** (28), 7367–7372. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707386114>
95. Abbasi S., Parmar G., Kelly R.D., Balasuriya N., Schild-Poulter C. 2021. The Ku complex: Recent advances and emerging roles outside of non-homologous end-joining. *Cell Mol. Life Sci.* **78** (10), 4589–4613. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03801-1>
96. Rivera-Calzada A., Spagnolo L., Pearl L.H., Llorca O. 2007. Structural model of full-length human Ku70-Ku80 heterodimer and its recognition of DNA and DNA-PKcs. *EMBO Rep.* **8**(1), 56–62. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400847>
97. Lees-Miller J.P., Cobban A., Katsonis P., Bacolla A., Tsutakawa S.E., Hammel M., Meek K., Anderson D.W., Lichtarge O., Tainer J.A., Lees-Miller S.P. 2021. Uncovering DNA-PKcs ancient phylogeny, unique sequence

- motifs and insights for human disease. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **163**, 87–108. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.09.010>
98. Yaneva M., Kowalewski T., Lieber M.R. 1997. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: Biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J.* **16**, 5098–5112
99. Zhang X., Brann T.W., Zhou M., Yang J., Oguariri R.M., Lidie K.B., Imamichi H., Huang D.-W., Lempicki R.A., Baseler M.W., Veenstra T.D., Young H.A., Lane H.C., Imamichi T. 2011. Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN. *J. Immunol.* **186** (8), 4541–4545
100. Burleigh K., Maltbaek J.H., Cambier S., Green R., Gale M., James R.C., Stetson D.B. 2020. Human DNA-PK activates a STING-independent DNA sensing pathway. *Sci. Immunol.* **5** (43), eaba4219. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aba4219>
101. Yuan S.-S.F., Hou M.-F., Hsieh Y.-C., Huang C.-Y., Lee Y.-C., Chen Y.-J., Lo S. 2012. Role of MRE11 in cell proliferation, tumor invasion, and DNA repair in breast cancer. *J. Natl. Cancer Institute.* **104** (19), 1485–1502. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs355>
102. Williams B., Bhattacharyya M.K., Lustig A.J. 2005. Mre 11 p nuclease activity is dispensable for telomeric rapid deletion. *DNA Repair (Amst).* **4** (9), 994–1005. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.04.016>
103. Käshammer L., Saathoff J.-H., Lammens K., Gut F., Bartho J., Alt A., Kessler B., Hopfner K.-P. 2019. Mechanism of DNA end sensing and processing by the Mre11-Rad50 complex. *Mol. Cell.* **76** (3), 382–394, e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.035>
104. Kondo T., Kobayashi J., Saitoh T., Maruyama K., Ishii K.J., Barber G.N., Komatsu K., Akira S., Kawai T. 2013. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110** (8), 2969–2974. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222694110>
105. Roth S., Rottach A., Lotz-Havla A.S., Laux V., Muschaweckh A., Gersting S.W., Gersting S.W., Muntau A.C., Hopfner K.-P., Jin L., Vanness K., Petrini J.H.J., Drexler I., Leonhardt H., Ruland J. 2014. Rad50-CARD9 interactions link cytosolic DNA sensing to IL-1 β production. *Nat. Immunol.* **15**, 538–545. <https://doi.org/10.1038/ni.2888>
106. Macaron G., Khoury J., Hajj-Ali R.A., Prayson R.A., Srivastava S., Ehlers J.P., Mamsa H., Liszewski M.K., Jen J.C., Bermel R.A., Ontaneda D. 2021. Novel de novo TREX1 mutation in a patient with retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations mimicking demyelinating disease. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **52**, 103015. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2021.103015>
107. Brucet M., Querol-Audí J., Serra M., Ramirez-Espain X., Bertlik K., Ruiz L., Lloberas J., Macias M.J., Fita I., Celada A. 2007. Structure of the dimeric exonuclease TREX1 in complex with DNA displays a proline-rich binding site for WW Domains. *J. Biol. Chem.* **282** (19), 14547–14557. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700236200>
108. Hemphill W. O., Simpson S.R., Liu M., Salsbury Jr F.R., Hollis T., Grayson J.M., Perrino F.W. 2021. TREX1 as a novel immunotherapeutic target. *Front. Immunol.* **12**, 660184. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.660184>
109. Yan N., Regalado-Magdos A.D., Stiggelbout B., Lee-Kirsch M.A., Lieberman J. 2010. The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nat. Immunol.* **11**, 1005–1013.
110. Stetson D. B., Ko J.S., Heidmann T., Medzhitov R. 2008. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell.* **134**, 587–598.
111. Yang Y. G., Lindahl T., Barnes D.E. 2007. Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell.* **131**, 873–886.
112. Lehtinen D. A., Harvey S., Mulcahy M.J., Hollis T., Perrino F.W. 2008. The TREX1 double-stranded DNA degradation activity is defective in dominant mutations associated with autoimmune disease. *J. Biol. Chem.* **283**, 31649–31656.
113. O’Driscoll M. 2008. TREX1 DNA exonuclease deficiency, accumulation of single stranded DNA and complex human genetic disorders. *DNA Repair.* **7**, 997–1003.
114. Salojin C., Gardberg A., Vivat V., Cui L., Lauer J., Cantone N., Stuckey J., Poy F., Almeciga I., Cummings R., Wilson J., Levell J., Rocnik J., Trojer P. 2021. The first-in-class small molecule TREX1 inhibitor CPI-381 demonstrates type I IFN induction and sensitization of tumors to immune checkpoint blockade. *J. Immunother. Cancer.* **9** (Suppl 2), A1–A1054. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-SITC2021.76>
115. Konno H., Yamauchi S., Berglund A., Putney R.M., Mulé J.J., Barber G.N. 2018. Suppression of STING signaling through epigenetic silencing and missense mutation impedes DNA damage mediated cytokine production. *Oncogene.* **37** (15), 2037–2051. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0120-0>

Sensors of Intracellular Nucleic Acids Activating STING-Dependent Production of Interferons in Immunocompetent Cells

© 2024 г. L. V. Smolyaninova^{1, *}, O. N. Solopova¹

¹Laboratory of Bioresource Collection of Cell Lines and Primary Tumors, Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478 Russia

*e-mail: smolyaninovalarisa1@gmail.com

Currently, foreign DNA or RNA sensor proteins, which play an important role in innate immunity, are of great interest as a new avenue for cancer immunotherapy. Agonists of these proteins can activate signaling cascades in immune cells that cause the production of cytokines, in particular type I interferons, which have a powerful cytotoxic effect. This review examines the functioning of cytoplasmic nucleic acid sensors such as cGAS, STING, IFI16, AIM2, DAI, DDX41, DNA-PK, MRE-11, and TREX1 involved in activating the production of various cytokines.

Keywords: DNA/RNA sensors, cytokines, interferons, cGAS, STING, immune cells

УДК 577.21

КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ АНАЛИЗА РОЛИ IRBIT В РЕГУЛЯЦИИ IP₃-РЕЦЕПТОРА I ТИПА

© 2024 г. Е. Е. Копылова^а, И. С. Масулис^{а, *}, О. А. Рогачевская^а, Е. Н. Кочкина^а, Ю. А. Ковалицкая^а, М. Ф. Быстрова^а, С. С. Колесников^а

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

*e-mail: irina.masulis@gmail.com

Поступила в редакцию 08.05.2023 г.

Подписана в печать 23.07.2023 г.

Принята к публикации 21.09.2023 г.

В геномах позвоночных три гена кодируют субъединицы IP₃-рецепторов, включая IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3. Хотя их первичные аминокислотные последовательности высоко гомологичны, гомотетрамерные IP₃ рецепторы, формируемые IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3 в мембране эндоплазматического ретикулума, заметно различаются по своим функциональным свойствам и регуляторным механизмам. В частности, активность IP₃R1 специфически регулируется белком IRBIT (IP₃R binding protein released with IP₃), который является конкурентом IP₃ за связывание с IP₃R1. В свою очередь, аффинность связывания IRBIT с IP₃R1 регулируется фосфорилированием. С использованием технологии CRISPR/Cas9 для редактирования генома клеток линии НЕК-293, в настоящей работе были получены две моноклональные клеточные линии для анализа роли IRBIT и ассоциированных регуляторных механизмов в контроле активности IP₃R1. В одной линии (НЕК-IP₃R1) были инактивированы гены IP₃R2 и IP₃R3, но оставлен функциональным IP₃R1. На основе этой линии была получена линия НЕК-IP₃R1/ΔIRBIT, в клетках которой был инактивирован ген IRBIT (АНСYL1). С использованием микрофотометрии и Ca²⁺-зонда Fluo-4 проведен сравнительный анализ агонист-индуцированной Ca²⁺-сигнализации в клетках этих линий на примере ацетилхолина (ACh). В частности, показано, что клетки обеих линий отвечают на ACh в широком диапазоне концентраций по принципу «все или ничего», и, что клетки НЕК-IP₃R1/ΔIRBIT менее чувствительны к этому агонисту по сравнению с клетками НЕК-IP₃R1.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, IP₃-рецептор, IRBIT, внутриклеточная Ca²⁺-сигнализация, клетки НЕК-293

DOI: 10.31857/S0233475524010023, **EDN:** znzmic

ВВЕДЕНИЕ

Паракринные и аутокринные регуляторные системы модулируют разнообразные клеточные функции при участии первичных медиаторов и их мишеней — молекулярных рецепторов, функционирующих на плазмалемме клеток. Эти рецепторы сопряжены с различными внутриклеточными сигнальными системами, среди которых фосфоинозитидный каскад вовлечен в трансдукцию многих агонистов. В основе его функционирования лежат стимул-зависимая активация фосфолипазы C (phospholipase C, PLC), катализируемый PLC гидролиз фосфолипида PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) и продукция двух вторичных медиаторов IP₃ (inositol 1,4,5-trisphosphate) и DAG (diacylglycerol) [1, 2]. Многие агонисты поверхностных рецепторов, включая гептаспиральные рецепторы (G-protein coupled receptors, GPCRs)

и рецептор тирозинкиназы (receptor-tyrosine kinases, RTK), инициируют мобилизацию внутриклеточного Ca²⁺ при участии фосфоинозитидного каскада в клетках самых разнообразных фенотипов [1–3]. Сигнальная роль IP₃ преимущественно сводится к стимуляции выброса депонированного Ca²⁺ через IP₃-рецепторы (IP₃R), которые являются внутриклеточными Ca²⁺-каналами, функционирующими в эндоплазматическом ретикулуме и некоторых других внутриклеточных органеллах [2, 4].

Геномы позвоночных содержат три гена, *IP3R1*, *IP3R2* и *IP3R3*, кодирующих субъединицы IP₃R. Несмотря на высокую степень гомологии первичных последовательностей, IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3 заметно различаются по своим биофизическим свойствам и характеризуются разными регуляторными механизмами и чувствительностью к IP₃ и Ca²⁺ [5, 6]. В частности, активность IP₃R1 контролируется

белком IRBIT, который ингибирует связывание IP₃ с этой изоформой [7].

В разных клетках обычно функциональны две и даже все три изоформы IP₃R, активность каждой из которых находится под контролем различных механизмов [8, 9]. Это затрудняет анализ специфической роли IP₃R данного типа в физиологии различных клеток. Представляется, что клеточные линии с единственной функциональной изоформой IP₃R могут быть эффективной модельной системой для анализа биофизических, фармакологических и функциональных свойств IP₃R различных подтипов.

Клетки линии HEK-293 широко используются как модельная гетерологическая система для экспрессии рекомбинантных белков и исследования рецепторных систем, механизмов внутриклеточной сигнализации и ионного транспорта. В этих клетках функционируют все три изоформы IP₃R [10]. Ранее нами обрабатывалась методология инактивации генов IP₃-рецепторов в клетках HEK-293 с использованием системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 [11]. В данной работе нами получена моноклональная линия клеток для анализа роли IRBIT в контроле активности IP₃R1. В исходной линии (HEK-IP₃R1) инактивированы гены *IP3R2* и *IP3R3*, но оставлен функциональным *IP3R1*. На основе этой линии получена линия HEK-IP₃R1/ Δ IRBIT, в клетках которой был инактивирован ген *IRBIT*. С использованием микрофотометрии проводился сравнительный анализ агонист-индуцированной Ca²⁺-сигнализации в клетках этих линий. Клетки стимулировались ацетилхолином (ACh), который был наиболее эффективным агонистом в том отношении, что инициировал Ca²⁺-ответы в наиболее представительной клеточной субпопуляции. В частности, показано, что клетки HEK-IP₃R1/ Δ IRBIT менее чувствительны к этому агонисту по сравнению с клетками HEK-IP₃R1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Создание экспрессионных кассет для системы CRISPR/Cas9

Редактирование клеточного генома с использованием технологии CRISPR/Cas9 позволяет манипулировать рецепторными, сигнальными и эффекторными белками и, следовательно, является эффективным подходом как к познанию их индивидуального вклада во внутриклеточные процессы, так и с точки зрения направленного изменения клеточных функций. Эта технология основывается на способности эндонуклеазы Cas9

направленно вносить двухцепочечные разрывы в геномный локус, комплементарный короткой последовательности РНК (РНК-гиду), обеспечивающей доставку редактирующего комплекса к выбранному участку. Прилегающий к РНК-гиду мотив РАМ в редактируемой области позволяет пространственно ориентировать фермент для оптимального гидролиза ДНК-мишени [12].

1.1. Конструкция для направленного редактирования генов *IP3R2* и *IP3R3*. В работе использована клеточная линия HEK-IP₃R1, которая была получена ранее как HEK293/ Δ IP₃R2/ Δ IP₃R3 [11]. Поиск оптимальных протоспейсеров проводился на последовательностях мРНК генов *IP3R2* (база данных GenBank NM_002223.4) и *IP3R3* (GenBank NM_002224.4). Для внесения редактирующего комплекса в клетки HEK-293 использован рGuide-it-tdTomato Vector, содержащий ген Cas9, слитый с красным флуоресцентным белком и позволяющий экспрессировать РНК-гид под контролем промотора U6. Дизайн нуклеотидных последовательностей для экспрессии РНК-гида для редактирования генов *IP3R2* и *IP3R3* описан в [11]. Олигонуклеотидные дуплексы клонировали по липким концам в коммерческую плазмиду рGuide-it-tdTomato Vector (Takara, США). Корректность полученных конструкций в плаزمидях рTomato/IP₃R2 и рTomato/IP₃R3 подтверждали секвенированием.

1.2. Конструкция AIO-GFP/IRBIT для направленного редактирования белка IRBIT. Для инактивации гена *IRBIT* (*AHCYL1*) использована генетическая конструкция на основе вектора AIO-GFP (Addgene), кодирующего Cas9-D10A с нулевой активностью в одной рамке считывания с зеленым флуоресцентным белком два РНК-гида, комплементарные близкорасположенным участкам ДНК в редактируемой области. Вектор AIO-GFP был предоставлен Steve Jackson (Addgene plasmid # 74119; <http://n2t.net/addgene:74119>). Для создания конструкции синтезировали две пары взаимно-комплементарных олигонуклеотидов: 5'-accgAGCAGGCAGAATTTGGACGC-3' и 5'-aaacGCGTCCAAATTCTGCCTGCT-3', соответствующие РНК-гиду со «смысловым» спейсером, и 5'-accgGTTGGTTTGCTGCTTCTCTC-3', и 5'-aacGAGAGAAGCAGCAAACCAAC-3', соответствующие РНК-гиду с «антисмысловым» спейсером. Для формирования дуплексов синтезированные олигонуклеотиды сначала фосфолирировали, а затем проводили отжиг. В вектор AIO-GFP последовательно клонировали сначала «антисмысловый» дуплекс по сайту BbsI (Thermo Scientific). Плазмидный клон анализировался на вставку нужного фрагмента ДНК путем ПЦР с колоний с прай-

мерами 5'-accgGTTGGTTTGCTGCTTCTCTC-3' и 5'-CTTGATGTA CTGCCAAGTGGGC-3'. Плазмиды из клонов, содержащих вставку протоспейсера, подвергали рестрикции по сайту BsaI (Thermo Scientific) и лигировали со «смысловым» дуплексом, наличие вставок в векторе также подтверждалось ПЦР с колоний (ScreenMix-HS (UDG), Евроген) с праймерами 5'-accgAGCAGGCAGAATTTGGACGC-3' и 5'-CTTGATGTA CTGCCAAGTGGGC-3' для «смыслового» спейсера. Наличие интегрированных спейсеров в полученной плазмиде pAIO/IRBIT подтверждали секвенированием (Евроген).

1.3. Синтез донорной матрицы для направленного внесения мутаций в редактируемый участок. Двухцепочечная матрица для гомологичной рекомбинации была создана с помощью реакции ПЦР по механизму «overlap extension» с применением мегапраймеров. Амплификация проводилась на геномной ДНК, выделенной из клеток НЕК293, при помощи HS-Taq полимеразы (Евроген). В первом раунде параллельно ставились две реакции ПЦР с одним внешним (либо А, либо D) и одним внутренним праймером для мутагенеза (С или В). Полученные ПЦР-фрагменты очищали коммерческим набором MinElute Purification Kit (Qiagen). Сконструированные в ходе первого раунда два отдельных ПЦР-фрагмента использовались в следующем раунде ПЦР для синтеза матрицы, содержащей целевые мутации с использованием ДНК-полимеразы PrimeSTAR Max Premix (Takara Bio). Полученный двухцепочечный фрагмент очищали на магнитных частицах CleanMag DNA (Евроген), одноцепочечную донорную конструкцию получали из dsDNA путем гидролиза антисмысловой нити dsDNA ферментом Strandase (Takara Bio) из набора Guige-it™ Long ssDNA Strandase Kit (Takara Bio). Синтезированная одноцепочечная матрица очищалась повторно на магнитных частицах CleanMag DNA.

2. Культивирование и трансфекция клеток линии НЕК-293

Трансфекцию вектором pAIO/IRBIT (1 мкг) и одноцепочечной матрицей ssDNA (1 мкг) клеток НЕК-IP₃R1 осуществляли в 12-луночном планшете (TPP) при помощи набора реагентов Lipofectamin 3000 (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. Через 72 ч после трансфекции клетки анализировали по интенсивности флуоресценции с помощью сортера клеток FACSAria SORP (BD Biosciences). Для получения моноклонов одиночные клетки с наибольшим уровнем флуоресценции помещали в 96-луночные планшеты, при

достижении 50–70% конfluenceности клеточные клоны последовательно переносили в лунки с большей ростовой поверхностью, используя 24-, 12- и 6-луночные планшеты. Клеточные моноклоны культивировали в среде DMEM (Gibco) с высоким содержанием глюкозы с добавлением 10–15% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma), 4 мМ L-глутамин (Sigma) при 37 °С в условиях 5% CO₂.

3. Определение мутаций, полученных с использованием системы CRISPR/Cas9-D10A

3.1. Оценка эффективности работы CRISPR/Cas9-D10A с помощью рестрикционного анализа. Для рестрикционного анализа собирали всю популяцию клеток с высоким уровнем флуоресценции, осаждали центрифугированием и использовали для выделения ДНК с помощью набора Qiagen. Амплификацию фрагментов для анализа проводили с использованием специфичных праймеров (IRBIT_For) 5'ATCCAGATGGGACCAAGTACCTC и (IRBIT_Rev) 5'GGAAGAGAGAACAAAATCCCAAGAC и ДНК-полимеразы 5X ScreenMix-HS (Евроген, Россия). Часть ПЦР-фрагмента подвергали гидролизу XhoI, часть — клонировали в вектор pJET1.2/blunt (Thermo Schientific). Для выявления направленной мутации 10 индивидуальных плазмидных клонов секвенировали.

3.2. Генерация и проверка нокаутных клонов IRBIT. В отобранных после трансфекции редактирующим вектором моноклонах клетки лизировали и экстрагировали из них геномную ДНК с использованием QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Полученная геномная ДНК служила матрицей для ПЦР-амплификации с использованием шести комбинаций специфичных праймеров, включая IRBIT_For, IRBIT_Rev и олигонуклеотиды, соответствующие протоспейсерам (sF; sR; asF; asR) (табл. 1). Условия реакции аналогичны описанным в разделе 3.1. Для точной локализации мутаций для каждого моноклона с выявленными редактирующими событиями была приготовлена клонотека ПЦР-фрагментов целевого участка, соответствующих обоим аллелям. Очищенные ПЦР-фрагменты клонировали в вектор pJET1.2/blunt по тупым концам с использованием набора CloneGet PCR Cloning Kit (Thermo Schientific), лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* XL1-blue (Евроген), колонии тестировали на присутствие вставки ПЦР с праймерами pJET F/R (ScreenMix-HS (UDG) (Евроген). Продукты ПЦР очищали при помощи набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Для

выявления indel-мутаций очищенные ампликоны не менее чем 10 индивидуальных клонов для каждой клонотеки, соответствующей одному моноклону трансфицированных клеток HEK-IP₃R1 были секвенированы (Евроген).

4. Мониторинг внутриклеточного Ca²⁺

Для фотометрического эксперимента клетки экстрагировали из культуральной чашки 0.25% раствором трипсина (Sigma-Aldrich), а затем прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak (Corning). При дальнейших манипуляциях клетки находились во внеклеточном растворе, содержащем (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, pH 7.4, 10 глюкозы. Для загрузки флуоресцентным Ca²⁺-зондом Fluo-4 клетки инкубировали в присутствии проникающего предшественника Fluo-4 AM (4 мкМ) и детергента Pluronic (0.02%) (оба Molecular Probes) при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем клетки отмывали внеклеточным раствором и выдерживали в нем при комнатной температуре в течение 1 ч.

Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20×/0.75 и цифровой EMCCD камерой LucaR (Andor Technology). В соответствии со спектральными характеристиками Fluo-4 флуоресценцию клеток возбуждали на длине волны 480 ± 10 нм, эмиссию регистрировали в области 520 ± 20 нм. Изменение уровня Ca²⁺ в цитоплазме оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции Fluo-4 $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F и F_0 — интенсивность эмиссии Ca²⁺-индикатора в текущий момент времени и в начале регистрации, соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS Elements (Nikon). Полученные экспериментальные данные обрабатывали с помощью программы Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc).

Вещества, использовавшиеся в физиологических экспериментах, приобретались в Sigma-Aldrich (соли, буферы, глюкоза) и Tocris Bioscience (ACh).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интересной особенностью IP₃R1-изоформы является то, что ее IP₃-зависимая активность специфически регулируется белком IRBIT. Поэтому основной целью данной работы было создание моноклональной клеточной линии HEK-IP₃R1,

в которой функционирует только IP₃R1 и экспрессируется ген IRBIT с последующим его нокаутом и получением моноклональной линии HEK-IP₃R1/ Δ IRBIT. Сравнительный анализ Ca²⁺-сигналикации в клетках HEK-IP₃R1 и в клетках HEK-IP₃R1/ Δ IRBIT мог бы позволить выяснить роль IRBIT в регуляции IP₃R1 в условиях естественного микроокружения.

Конструкции для направленного редактирования на основе технологии CRISPR/Cas9

Получение линии клеток HEK-IP₃R1. Ранее путем последовательной инактивации генов *IP3R3* и *IP3R2* были получены клеточные линии с двойным нокаутом IP₃-рецепторов [11]. Для генетических манипуляций был использован вектор pGuide-it-td Tomato, полученные моноклоны тестируются методом RGEN-RFLP (RNA-guided engineered nucleases). После двухэтапного тестирования был отобран моноклон с биаллельными мутациями, приводящими к смещению открытой рамки считывания гена *IP3R3* (табл. 1). На одной аллели обнаружена делеция 50 п.н., приводящая к образованию укороченного белка — 16 аминокислот. На другой аллели имеется делеция 2 п.н., приводящая к смещению открытой рамки считывания после 9-й аминокислоты и появлению стоп-кодона после 32-й аминокислоты. В полученной линии HEK- Δ IP₃R3 с использованием вектора pGuide-it-tdTomato затем инактивировался ген *IP3R2*. Инактивирующие мутации выбранного моноклона с биаллельными мутациями *IP3R2* носили следующий характер: делеция 8 п.н., приводящая к смещению открытой рамки считывания после 17-й аминокислоты, и появление стоп-кодона после 31-й аминокислоты, и инсерция 1 п.н., приводящая к смещению открытой рамки считывания после 17-й аминокислоты и появлению стоп-кодона после 34-й аминокислоты (табл. 2). В полученной линии HEK-IP₃R1 интактным остается ген *IP3R1*.

Получение линии клеток HEK-IP₃R1/ Δ IRBIT. Линия HEK-IP₃R1 использована как базовая для направленного редактирования *IRBIT*. На смысловой и антисмысловой нитях ДНК проведен поиск близко расположенных протоспейсеров для редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9—10A. На участке второго экзона гена *IRBIT* человека (NC_000001.11) на расстоянии 37 п.н. друг от друга были выбраны последовательности смыслового и антисмыслового протоспейсеров, фланкированные на 3'-конце PAM-мотивами (рис. 1).

При создании конструкции на основе вектора AIO-GFP (Addgene) учитывалось, что используемая

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность использованных праймеров

Название праймера	Последовательность
sF	5'-accgAGCAGGCAGAATTTGGACGC3'
sR	5'-aaacGCGTCCAAATTCTGCCTGCT3'
asF	5'-accgGTTGGTTTGCTGCTTCTCTC3'
asR	5'-aaacGAGAGAAGCAGCAAACCAAC3'
IRBIT_For	5'-ATCCAGATGGGACCAAGTACCTC3'
IRBIT_Rev	5'-GGAAGAGAGAACAAAATCCCAAGAC3'
Irb mut For (XhoI)	5'-TGATGAGGTTTCTCTCGAGAGAAGCAGCAAACC3'
Irb mut Rev (XhoI)	5'-TTGCTGCTTCTCTCGAGAGAAACCTCATCATCAGAG3'
AIOseq	5'-CTTGATGTAAGTCCCAAGTGGGC3'
pJET R	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC3'
pJET F	5' AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG3'

никазная система, экспрессирующая нуклеазу Cas9-D10A, должна обеспечивать внесение требуемой мутации с минимизацией количества off-target-эффектов за счет наличия двух РНК-гидов, направляющих редактирующий комплекс к целевому локусу генома [12]. Для данной работы это было особенно важно с точки зрения сохранения интактного генетического окружения родительской линии НЕК-IP₃R1, обеспечивающей реализацию сигнальных процессов с участием IP₃R1 рецептора. Нами не было зарегистрировано каких-либо фенотипических различий линий НЕК-IP₃R1 и вновь полученной линии НЕК-IP₃R1/ Δ IRBIT.

Создание донорной матрицы для направленной репарации разрыва ДНК по механизму гомологической рекомбинации. Для предварительного тестирования работоспособности выбранной нами редактирующей системы на основе никазы Cas9-D10A мы использовали явление гомологичной рекомбинации в присутствии донорной однонитевой матрицы (ssDNA), содержащей сайт для расщепления рестриктазой. Замена нативной последовательности на контекст, присутствующий в ssDNA,

подтверждает факт редактирующего события в выбранной области. Донорная матрица содержала одну нуклеотидную замену в области протоспейсера, с помощью которой вводился искусственный сайт рестрикции XhoI, а также точечную делецию одного нуклеотида, необходимую для исчезновения антисмыслового сайта PAM, узнаваемого никазой Cas9–10A, и два плеча гомологии 358 и 287 п.н. Направленная мутация состояла в одиночной нуклеотидной замене С/Т и делеции Δ С (рис. 2).

Двухцепочечная матрица была создана с помощью трехступенчатой реакции ПЦР на геномной ДНК, выделенной из клеток НЕК293, по механизму «overlap extension» с применением мегапраймеров (рис. 3а, 3б). Создание длинной одноцепочечной донорной матрицы из dsDNA осуществляли в реакции гидролиза антисмысловой нити dsDNA ферментом Strandase (Takara Bio). Действие strandase заключается в расщеплении нефосфорилированной нити двухцепочечной ДНК-матрицы. При получении dsDNA методом ПЦР в реакции использовался верхний фосфорилированный праймер А (IRBIT_For), поэтому антисмысловая нить dsDNA осталась нефосфорилированной,

«смысловой» протоспейсер PAM

5' ...CCCGAGAGAAGCAGCAAACCAACTCCAAGGGCAGCAGCAATTTCTGTGTGAAGAACATCAAGCAGGCAGAATTTGGACGCCGG...3'
3' ...GGGCTCTCTTCGTCGTTTGGTTGAGGTTCCCGTCGTCGTTAAAGACACACTTCTTGTAGTTTCGTCCTTAAACCTGCGGCC...3'

PAM «антисмысловой» протоспейсер

Рис. 1. Локализация протоспейсеров (отмечены синим) и PAM-мотивов (отмечены красным) на смысловой и антисмысловых цепях ДНК 2-го экзона гена *IRBIT* человека (NC_000001.11) для действия никазы Cas9–10A.

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности участков целевых генов клеточной линии HEK-IP₃R1/ Δ IRBIT после редактирования

Целевой ген	Мутации	Геномные мутации
Δ IP3R3	WT	ATGAGTGAATGATCCAGCTTTCTTCCACATCGGGGGACATCGTCTCCCTGTACGCCGAGGGCTCCGTTCAATGGCTTTCATCAGCACCTTTGGG
	-50	ATGAGTGAATGATCCAGCTTTCTTCA - - - - -
	-2	ATGAGTGAATGATCCAGCTTTCTTCA - TCGGGG GCACATCGTCTCCCTGTACGCCGAGGGCTCCGTTCAATGGCTTTCATCAGCACCTTTGGG
Δ IP3R2	WT	ATGACTGAGAAAAATGTCCAGCTTCCCTTACATAGGGGACATCGTGTCCCTGTACGGAGGGCTCGGTCAACGGCTTTCATCAGCACCTTTGGG
	-8	ATGACTGAGAAAAATGTCCAGCTTCCCTTACATAGGGGACATCGTGTCCCTGT - - - - - GGCTCGGTCAACGGCTTTCATCAGCACCTTTGGG
	+1	ATGACTGAGAAAAATGTCCAGCTTCCCTTACATAGGGGACATCGTGTCCCTGT ACGGCGG AGGGCTCGGTCAACGGCTTTCATCAGCACCTTTGGG
Δ IRBIT	WT	CTC CCCG GAGAGAAGCAGCAAA CCAA CTCCAAAGGGCAGCAGCAATTTCTGTGTAAGAACAATCA AGCAGGCAGAA TTTGGAC CGCCGG
	-38	CTC CCCG GAGAGAAGCAGCAAA CCAA CTCCAAAGGGCAGCAGCAATTTCTG-----AGATTGAGATTGCAGAGCAAG
	-43	CTC CCCG GAGAGAAGCAGCAAA CCAA CTCCAAAGGGCAGCAGCAATTTCT-----TGAGATTGCAGAGCAAG

Примечание. Инсерции выделены красным жирным шрифтом; последовательность РАМ — жирным курсивом и голубым; последовательность РНКгида — желтым цветом. Последовательность генов представлена начиная с иницирующего кодона.

а
 CTC**CCCC**GAGAGAAGCAGCAAACCAACTCCAAGGGCAGCAGCAATTTCTGTGTGAAGAACATCAAGCAGGCAGAATTTGGACGC**CGG**

б
 CTC**T**-CGAGAGAAGCAGCAAACCAACTCCAAGGGCAGCAGCAATTTCTGTGTGAAGAACATCAAGCAGGCAGAATTTGGACGC**CGG**

Рис. 2. *а* — Последовательность дикого типа локуса редактирования гена *IRBIT*. *б* — Направленная мутация донорной матрицы (одиночная нуклеотидная замена С/Т и ΔС), приводящая к исчезновению антисмыслового РАМ и возникновению в ssDNA-доноре размером 645 п.н. сайта XhoI CTCGAG.

а следовательно, расщеплялась страндазой. Полученная ssDNA мигрировала при электрофорезе быстрее, чем dsDNA того же нуклеотидного состава (рис. 3*в*).

Отбор стабильных клеточных моноклонов с нокаутом гена *IRBIT*. Наиболее трудоемким и дорогостоящим этапом в получении генетически модифицированных клеточных линий эукариот является стадия выявления биаллельных мутаций, обеспечивающих полную инактивацию целевого гена. Для идентификации мутаций используются разные подходы [13, 14]. Для оценки работоспособности РНК-гида и матрицы мы использовали стратегию рестриционного анализа редактируемого локуса после гомологичной рекомбинации с участием донорной ssDNA.

Оценка работоспособности РНК-гида и матрицы. Для доставки сконструированных плазмиды и одноцепочечной матрицы ssDNA в клетки линии человека НЕК-293 была использована химическая трансфекция с помощью агента Lipofectamine 3000 (Invitrogen). Для подтверждения направленной репарации двухцепочечного разрыва ДНК по механизму гомологической рекомбинации в трансфицированных клетках через 72 ч после трансфекции была проведена ПЦР-амплификация геномной ДНК с ген-специфическими праймерами (*IRBIT_For* и *IRBIT_Rev*), фланкирующими предположительный сайт мутации. Амплифицированный фрагмент ожидаемого размера 645 п.н. был подвергнут гидролизу эндонуклеазой Xho I. Сайт рестрикции XhoI должен появиться в целевом участке гена *IRBIT* в тех клетках, в которые (1) были доставлены и плаزمиды, и донорная матрица; (2) CRISPR/Cas9–10A системой была нанесена пара одноцепочечных разрывов в локусе целевого гена; (3) разрывы были репарированы по механизму гомологической рекомбинации с участием экзогенной донорной матрицы ssDNA. Наличие двух фрагментов размерами 358 и 287 п.н. (рис. 4) после рестрикции подтверждает направленную репарацию двухцепочечного разрыва ДНК по механизму гомологической рекомбинации во фракции трансфицированных клеток и свидетельствует об эффективности работы никазы Cas9-D10A.

При секвенировании клонотек, полученных при клонировании целевого участка 645 п.н., в клетках были выявлены разные типы мутаций, возникшие как результат репарационных процессов по механизму гомологичного и негомологического соединения концов. Из 10 образцов клонотек два варианта относились к результатам гомологичной рекомбинации, восемь мутаций (как делеции, так и инсерции) возникли в процессе негомологичной рекомбинации.

Анализ индивидуальных клеточных моноклонов с нокаутом гена *IRBIT*. После подтверждения редактирующей способности конструкции рAI0/*IRBIT* с использованием донорной матрицы ssDNA на популяции клеток, была проведена повторная трансфекция. Для получения моноклонов отбирали клетки, обладающие наибольшей интенсивностью флуоресценции с помощью сортера клеток FACSAria SORP (BD Biosciences).

При использовании системы CRISPR/Cas9 и ее производных большинство мутаций возникают в сайтах двунитевых разрывов вблизи протоспейсеров. Для отбора моноклонов с мутациями мы использовали ПЦР с различными комбинациями праймеров, в том числе лежащих в области протоспейсеров: ПЦР1 — праймер 1 (*IRBIT_For*) и 4 (*asF*); ПЦР2 — праймер 1 (*IRBIT_For*) и 6 (*sR*); ПЦР3 — праймер 5 (*asR*) и 2 (*IRBIT_Rev*); ПЦР4 — праймер 3 (*sF*) и 2 (*IRBIT_Rev*); ПЦР5 — праймер 3 (*asR*) и 6 (*sR*) (рис. 5*а*, 5*б*). В немодифицированном целевом локусе все варианты комбинаций будут обеспечивать синтез ПЦР-продуктов (рис. 5*в*). В клонах с мутациями при использовании комбинаций с внутренними праймерами, которые могли отжигаться и на верхнюю, и на нижнюю цепь ДНК в участке редактирования ПЦР-продукты, соответствующие дикому типу, будут отсутствовать. Этот метод гораздо более точно отражает произошедшие события в месте внесенного двухцепочечного разрыва, и позволяет отслеживать внесение мутаций в областях двух разных протоспейсерных мотивов. Данный метод прост в исполнении и не требует затрат на дорогостоящие ферменты, по сравнению с другими методами оценки эффективности работы систем CRISPR/Cas9. Таким образом, данные праймеры могут амплифицировать только аллели дикого

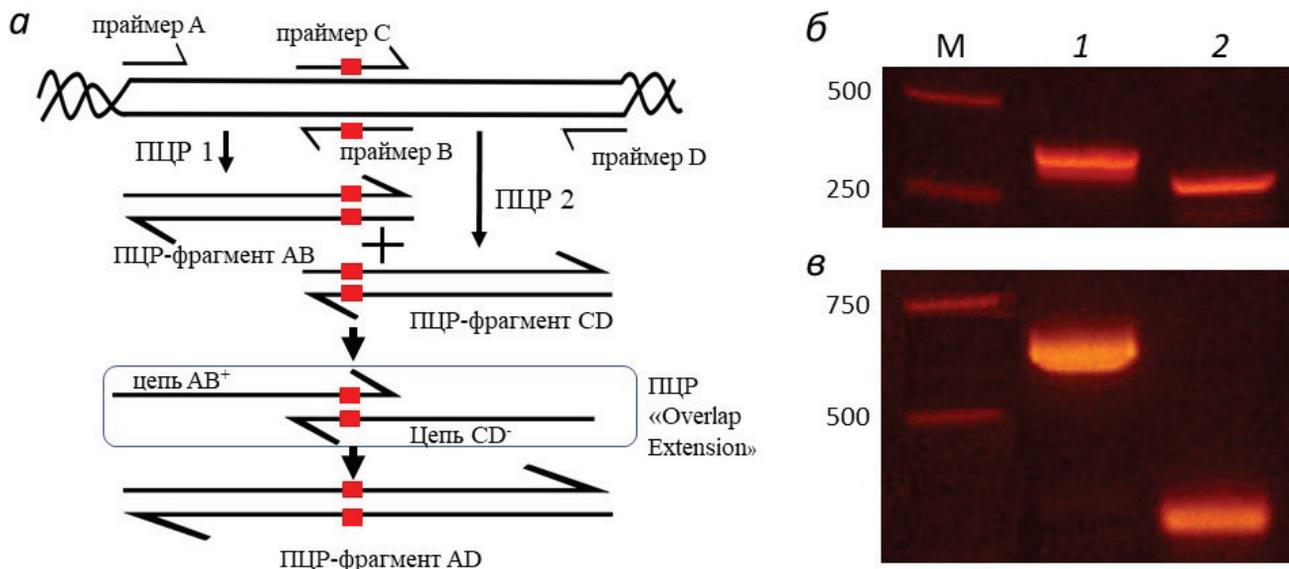


Рис. 3. *a* — Схема синтеза двухцепочечной матрицы с мутациями. *б* — Электрофорез амплифицированных мега-праймеров АВ (дорожка 1) и CD (дорожка 2). *в* — Электрофорез синтезированных двухцепочечной dsDNA (640 п. н.) с точечной мутацией (AD) и одноцепочечной матрицы донорной ssDNA того же нуклеотидного состава (отличается от двухцепочечной по скорости миграции и интенсивности окраски бромистым этидием).

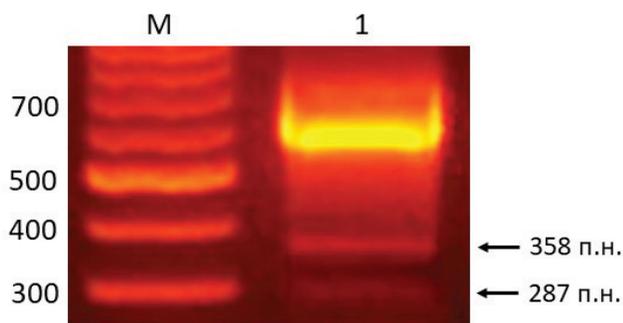


Рис. 4. Рестрикционный анализ участка локуса *IRBIT* (645 п. н.), амплифицированного с геномной ДНК, выделенной из клеток, трансфицированных компонентами системы CRISPR/Cas9–10A-ssDNA-донор через 72 ч после трансфекции.

типа, но не мутантные аллели, и возникающая мутация в области 3'-конца праймеров нарушит амплификацию соответствующих фрагментов.

По отсутствию накопления продуктов с разной комбинацией праймеров, затрагивающих редактируемую область, отбирали клоны, в которых редактируемый участок не амплифицировался и, следовательно, несет мутации, затрагивающие области на 3'-конце праймеров. На рис. 5*в* представлены результаты амплификации пяти комбинаций праймеров на геномной ДНК из восьми клонов. Из них клоны 4, 5, 6,

7 атрибутированы как клетки дикого типа, в 1-м и 3-м на наличие мутации указывает отсутствие ожидаемого продукта амплификации в комбинациях «ПЦР2» и «ПЦР5», «ПЦР4» и «ПЦР5» соответственно. В моноклоне 2 ПЦР-фрагмент с комбинацией праймеров № 2 мигрирует быстрее, чем в диком типе, и на наличие мутации указывает отсутствие нужного фрагмента в комбинации с праймерами № 5, как и в 8-м моноклоне.

Из двух клонов (1 и 3) были созданы клоны фрагментов геномной ДНК. Поскольку мутации на двух аллелях целевого гена могут носить различный характер, то с тотальной геномной ДНК клеточного моноклона будут амплифицироваться ПЦР-фрагменты различных последовательностей. Таким образом, в составе вектора мы получаем клоны фрагментов, последовательности которых соответствуют редактируемому участку обеих аллелей. Для клеточных клонов, с наиболее вероятными биаллельными мутациями, отобранных по результатам ПЦР с разными комбинациями праймеров (рис. 5*с*), были проанализированы результаты секвенирования 10 плазмидных образцов клонов. После секвенирования был отобран клон (№ 1) с биаллельными мутациями, приводящими к смещению открытой рамки считывания гена *IRBIT* (табл. 2). На одной аллели обнаружена делеция 38 п. н., приводящая к образованию стоп-кодона после 105-й аминокислоты. В другой аллели имеется делеция 43 п. н., приводящая

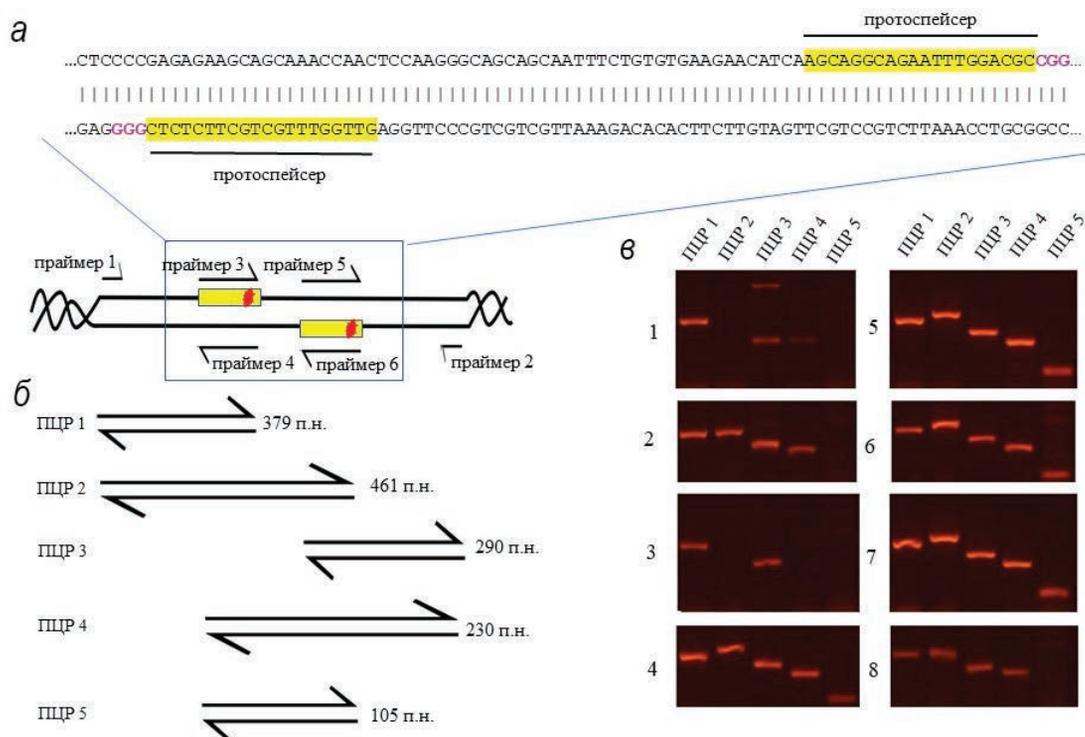


Рис. 5. *а* — Локализация протоспейсеров (подчеркнуты) на смысловой и антисмысловой нитях ДНК 2-го экзона гена *IRBIT* человека (NC_000001.11) и схема их расположения. *б* — Схема раундов амплификаций для проверки полученных мутаций в редактируемой области. *в* — Электрофорез восьми репрезентативных клонов, полученных после трансфекции.

к смещению открытой рамки считывания после 90-й аминокислоты и появлению стоп-кодона после 115-й аминокислоты. Таким образом, полученная клеточная линия НЕК-IP₃R1/ Δ IRBIT имеет по гену *IRBIT* биаллельные мутации, инактивирующие трансляцию этого белка.

Физиологические эксперименты

Далее проводился сравнительный функциональный анализ клеток НЕК-IP₃R1 и клеток НЕК-IP₃R1/ Δ IRBIT с использованием микрофотометрии (Ca²⁺ imaging) и Ca²⁺-зонда Fluo-4. В типичном эксперименте в фотометрической камере находилась популяция 100–120 клеток, содержащих Fluo-4, и для каждой клетки осуществлялся мониторинг Fluo-4-индуцированной флуоресценции. Как было показано ранее, ACh способен инициировать Ca²⁺-сигнализацию в большинстве (80–90%) клеток НЕК-293, стимулируя мускариновые рецепторы, сопряженные G-белками с фосфоинозитидным каскадом и мобилизацией депонированного Ca²⁺ [15]. Примечательной особенностью ответов клеток НЕК-293 на ACh было то, что кратковременные последовательные аппликации агониста в увеличивающихся дозах либо не вызывали мобилизацию внутриклеточного

Ca²⁺, либо инициировали импульсное повышение Ca²⁺ практически до одной и той же величины при разных концентрациях выше пороговой. Это свойство родительских клеток сохранялось и в клетках НЕК-IP₃R1 и НЕК-IP₃R1/ Δ IRBIT (рис. 6а, верхняя кривая). Такой характер («все-или-ничего») Ca²⁺-сигналов, инициированных ACh, не позволял характеризовать дозозависимость ответов индивидуальных клеток. Поэтому мы характеризовали дозозависимость клеточных ответов, используя популяционный параметр — фракцию клеток в данной популяции, способных генерировать Ca²⁺-ответ на ACh при данной дозе. Клетки стимулировались ACh в диапазоне концентраций от 250 нМ до 5 мкМ.

В общей сложности были проанализированы четыре клеточные популяции линии НЕК-IP₃R1 и изучены Ca²⁺-ответы 376 клеток. Для каждой популяции определялась фракция клеток, способных отвечать на агонист, концентрация которого варьировалась, и затем определялась средняя величина и стандартное отклонение по четырем популяциям. Соответствующая усредненная дозозависимость представлена на рис. 6б (синие кружочки). С клетками НЕК-IP₃R1/ Δ IRBIT проведены аналогичные эксперименты, в которых были изучены 255

клеток в трех популяциях. Полученная для этих клеток дозозависимость представлена красными кружочками на рис. 6б.

Экспериментальные зависимости аппроксимировались уравнением Хилла:

$$F(C) = F_0 \frac{C^n}{C_{0.5}^n + C^n},$$

где $F(C)$ — фракция клеток, чувствительных к ACh при концентрации C , F_0 — максимальная фракция ACh-чувствительных клеток, $C_{0.5}$ — концентрация полуэффекта (EC_{50}), n — коэффициент Хилла. На основе данной аппроксимации (рис. 6б, непрерывные кривые) для клеток HEK-IP₃R1 и HEK-IP₃R1/ Δ IRBIT были оценены величины F_0 и EC_{50} дозы ACh как равные 76 и 61% и 0.56 и 0.75 мкМ, соответственно. Таким образом, клетки HEK-IP₃R1 оказались более чувствительными к ACh, чем клетки HEK-IP₃R1/ Δ IRBIT.

ОБСУЖДЕНИЕ

Редактирование клеточного генома с использованием технологии CRISPR/Cas9 позволяет манипулировать рецепторными, сигнальными и эффекторными белками и, следовательно, является эффективным инструментом для анализа их индивидуального вклада во внутриклеточные сигнальные процессы. Эта технология основывается на способности эндонуклеазы Cas9 и ее модификаций направленно вносить двухцепочечные разрывы в геномный локус, комплементарный короткой последовательности РНК-гида [16]. В настоящей работе этот подход использовался для инактивации гена регуляторного белка IRBIT.

Активность IP₃-рецепторов, которые играют ключевую роль в агонист-индуцированной Ca²⁺-сигнализации в клетках практически всех фенотипов, контролируется множественными механизмами в зависимости от внутриклеточного контекста и с определенной специфичностью по отношению к IP₃R1-, IP₃R2- и IP₃R3-изоформам [8, 9, 17]. Идентифицирован ряд малых регуляторных молекул, включая АТФ [18], сАМР [19], NADH [20]. Активность IP₃-рецепторов регулируется фосфорилированием/дефосфорилированием [9, 18, 21] и за счет белок-белкового взаимодействия, в частности, с кальмодулином и другими Ca²⁺-связывающими белками [18, 22] и с белками IRBIT и IRAG [3, 7, 23].

IRBIT был открыт как новый IP₃-рецептор-связывающий белок [7], который подавлял активность IP₃R1, конкурируя за связывание с IP₃ [24]. Фосфорилирование IRBIT по нескольким

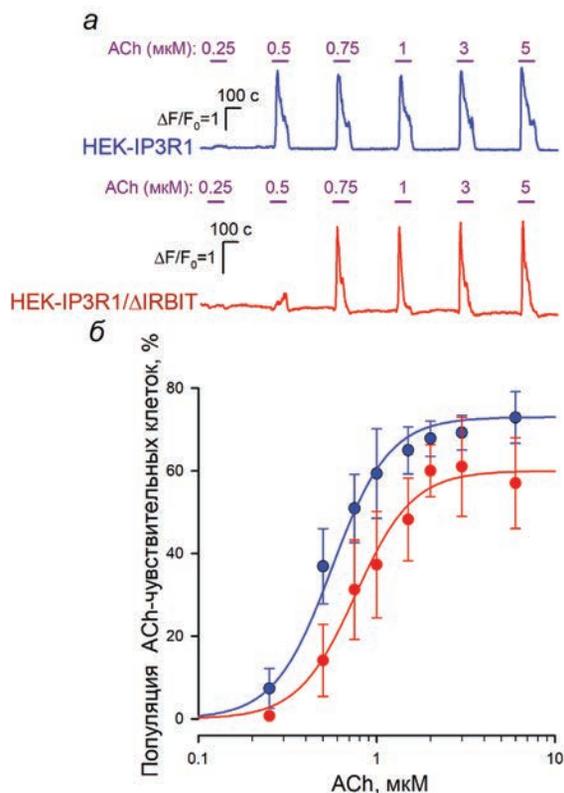


Рис. 6. Ca²⁺-ответы клеток на ACh. *a* — Репрезентативный мониторинг внутриклеточного Ca²⁺ в клетках HEK-IP₃R1 (верхняя панель) ($n = 366$) и HEK-IP₃R1/ Δ IRBIT (нижняя панель) ($n = 255$), загруженных Fluo-4. Моменты и продолжительность аппликаций ACh в указанных дозах обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальных кривых. Изменение внутриклеточного Ca²⁺ оценивали по относительному изменению флуоресценцию Fluo-4 $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F — текущая интенсивность флуоресценции, F_0 — средняя интенсивность флуоресценции в начальный момент регистрации. *б* — Количество клеток в каждой из линий, генерирующих Ca²⁺-ответы на ACh при различных дозах агониста.

сайтам увеличивало аффинность его связывания с IP₃R1 [24], которое также обеспечивалось наличием двух мотивов PEST и PDZ, детерминирующих белок-белковое узнавание [25]. Наличие PEST- и PDZ-доменов предполагало, что IRBIT может быть новой сигнальной молекулой, регулирующей не только IP₃-рецептор, но и другие внутриклеточные мишени. В дальнейшем таковые были действительно идентифицированы. Так, было показано, что IRBIT потенцирует активность Na⁺/HCO₃⁻ котранспортера рNBC1 [26], формирует сигнальный комплекс с фосфатидилинозитол-фосфат-киназой (phosphatidylinositol phosphate kinases)

[27] и ингибирует Ca^{2+} /кальмодулин-зависимую киназу [28].

В настоящей работе были получены две моноклональные линии с единственной функциональной изоформой $\text{IP}_3\text{R1}$, в которых ген белка IRBIT был активен (НЕК- $\text{IP}_3\text{R1}$) и инактивирован (НЕК- $\text{IP}_3\text{R1}/\text{IRBIT}$). Поскольку IRBIT — конкурент за связывание IP_3 с $\text{IP}_3\text{R1}$, ожидалось, что в отсутствие IRBIT $\text{IP}_3\text{R1}$ должен быть более чувствителен к IP_3 . Как следствие, можно было бы ожидать, что клетки НЕК- $\text{IP}_3\text{R1}$ должны быть менее чувствительны к АСh, чем клетки НЕК- $\text{IP}_3\text{R1}/\text{IRBIT}$. Между тем, эксперименты показали противоположный результат (рис. 6). Хотя в настоящий момент у нас нет верифицированного объяснения этого факта, возможно, что в клетках НЕК-293 имеет место бимодальная регуляция $\text{IP}_3\text{R1}$ при участии IRBIT: помимо ингибиторного пути, основанного на подавлении связывания IP_3 , имеется IRBIT-зависимая регуляция $\text{IP}_3\text{R1}$, которая потенцирует его активность. Проверка этой идеи требует дополнительных исследований.

Авторы благодарят Д.М. Поташникову за помощь в проведении работ по сортировке клеток на приборе FACS Aria SORP (BD Biosciences) (поддержано Программой развития МГУ) и сотрудника Сектора Спектральных и теплофизических методов исследований биополимеров (ИБП РАН) А.А. Софина за помощь в проведении работ по сортировке клеток на приборе MoFlo XDP (Beckman Coulter).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22–14–00031.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Clapham D. 2007. Calcium signaling. *Cell*. **131**, 1047–1058.
- Berridge M.J. 2016. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol. Rev.* **96**, 1261–1296.
- Lemmon M.A., Schlessinger J. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. **141**, 1117–1134.
- Mak D.O., Foskett J.K. 2015. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the endoplasmic reticulum: A single-channel point of view. *Cell Calcium*. **58**, 67–78.
- Mikoshiba, K. 2015. Role of IP_3 receptor signaling in cell functions and diseases. *Adv. Biol. Regul.* **57**, 217–227.
- Prole D.L., Taylor C.W. 2019. Structure and function of IP_3 Receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11**, a035063.
- Ando H., Mizutani A., Matsuura T., Mikoshiba K. 2003. IRBIT, a novel inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) receptor-binding protein, is released from the IP_3 receptor upon IP_3 binding to the receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 10602–10612.
- Foskett J.K., White C., Cheung K.-H., Mak D.O. 2007. Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiol. Rev.* **87**, 593–658.
- Hamada K., Mikoshiba K. 2020. IP_3 receptor plasticity underlying diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* **82**, 151–176.
- Lock J.T., Alzayady K.J., Yule D.I., Parker I. 2018. All three IP_3 receptor isoforms generate Ca^{2+} puffs that display similar characteristics. *Sci. Signal.* **11**, eaau0344.
- Копылова Е.Е., Воронова Е.А., Кабанова Н.В., Рогачевская О.А., Быстрова М.Ф., Колесников С.С. 2023. Клеточные линии с единственной функциональной изоформой IP_3 рецептора. *Биол. мембраны*. **40**, 43–54.
- Chiang T.W., le Sage C., Larriue D., Demir M., Jackson S.P. 2016. CRISPR-Cas9(D10A) nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. *Sci. Rep.* **6**, 24356.
- Ломов Н.А., Вьюшков В.С., Петренко А.П., Сыркина М.С., Рубцов М.А. 2019. Методы оценки эффективности работы систем CRISPR/Cas при геномном редактировании. *Мол. Биология*. **53**, 982–997.
- Спасская Д.С., Давлетшин А.И., Тютяева В.В., Кулагин К.А., Гарбуз Д.Г., Карпов Д.С. 2022. Создание тест-системы для оценки активности мутантных вариантов SpCas9 в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. *Мол. биология*. **56**, 937–948.
- Быстрова М.Ф., Рогачевская О.А., Кочкина Е.Н., Коваленко Н.П., Колесников С.С. 2020. IP_3 рецептор второго типа является доминантной изоформой в клетках НЕК-293. *Биол. мембраны*. **37**, 434–441.
- Jiang F., Doudna J.A. 2017. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 505–529.
- Parys, J.B., Vervliet T. 2020. New insights in the IP_3 receptor and its regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1131**, 243–270.
- Wagner L.E. II, Yule D.I. 2012. Differential regulation of the InsP_3 receptor type-1 and -2 single channel properties by InsP_3 , Ca^{2+} and ATP. *J. Physiol.* **590**, 3245–3259.
- Taylor C.W. 2017. Regulation of IP_3 receptors by cyclic AMP. *Cell Calcium*. **63**, 48–52.
- Kaplin A.I., Snyder S.H., Linden D.J. 1996. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-selective stimulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors mediates hypoxic mobilization of calcium. *J. Neurosci.* **16**, 2002–2011.
- Vanderheyden V., Devogelaere B., Missiaen L., De Smedt H., Bultynck G., Parys J.B. 2009. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-induced Ca^{2+} release by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*. **1793**, 959–970.

22. Taylor C.W., Laude A.J. 2002. IP₃ receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium*. **32**, 321–334.
23. Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G. X., Allescher, H.D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann F., Ruth P. 2000. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP₃ receptor and cGMP kinase. *Nature*. **404**, 197–201.
24. Ando H., Mizutani A., Kiefer H., Tsuzurugi D., Michikawa T., Mikoshiba K. 2006. IRBIT suppresses IP₃ receptor activity by competing with IP₃ for the common binding site on the IP₃ receptor. *Mol. Cell*. **22**, 795–806.
25. Devogelaere B., Nadif Kasri N., Derua R., Waelkens E., Callewaert G., Missiaen L., Parys J.B., De Smedt H. 2006. Binding of IRBIT to the IP₃ receptor: Determinants and functional effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 49–56.
26. Shirakabe K., Priori G., Yamada H., Ando H., Horita S., Fujita T., Fujimoto I., Mizutani A., Seki G., Mikoshiba K. 2006. IRBIT, an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein, specifically binds to and activates pancreas-type Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter 1 (pNBC1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 9542–9547.
27. Ando H., Hirose M., Gainche L., Kawaai K., Bonneau B., Ijuin T., Itoh T., Takenawa T., Mikoshiba K. 2015. IRBIT interacts with the catalytic core of phosphatidylinositol phosphate kinase type Iα and IIα through conserved catalytic aspartate residues. *PLoS One*. **10**, e0141569.
28. Kawaai K., Mizutani A., Shoji H., Ogawa N., Ebisui E., Kuroda Y., Wakana S., Miyakawa T., Hisatsune C., Mikoshiba K. 2015. IRBIT regulates CaMKII alpha activity and contributes to catecholamine homeostasis through tyrosine hydroxylase phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**, 5515–5520.

Cellular Model for the Analysis of IRBIT-Dependent Regulation of the Type 1 IP₃ Receptor

© 2024 г. Е. Е. Копылова¹, И. С. Масулис¹, *, О. А. Рогачевская¹, Е. Н. Кочкина¹,
 Y. A. Kovalitskaya¹, M. F. Bystrova¹, S. S. Kolesnikov¹

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

*e-mail: irina.masulis@gmail.com

In vertebrate genomes, three genes encode subunits of IP₃ receptors, including IP₃R1, IP₃R2, and IP₃R3. Despite high homology between different subunits, homotetrameric IP₃ receptors formed by IP₃R1, IP₃R2, and IP₃R3 in the endoplasmic reticulum membrane are markedly distinct by their functional features and regulatory mechanisms. It was particularly reported that IP₃R1 is specifically regulated by the IP₃R binding protein released with IP₃ (IRBIT), which competes with IP₃ for binding to IP₃R1. In turn, affinity of IRBIT/IP₃R1 binding is regulated by phosphorylation of IRBIT. By using the CRISPR/Cas9 approach to edit the genome of HEK-293 cells, two monoclonal cell lines were generated as a platform for uncovering a role of IRBIT and associated regulatory circuits in control of the IP₃R1 activity. In one line, HEK-IP₃R1, IP₃R2, and IP₃R3 genes were disrupted, while IP₃R1 was remained functional. Based on this line, the HEK-IP₃R1/ΔIRBIT line was generated, wherein IRBIT (AHCYL1) gene was inactivated. The comparative analysis of ACh-induced Ca²⁺ signaling in cells of both lines was performed by employing the Ca²⁺ dye Fluo-4 and Ca²⁺ imaging. It was particularly shown that ACh mobilized Ca²⁺ in cells of both lines, which responded to the agonist at widely varied doses in an “all-or-nothing” manner. Yet, HEK-IP₃R1/ΔIRBIT cells turned out to be less sensitive to ACh compared to HEK-IP₃R1 cells.

Keywords: CRISPR/Cas9, IP₃ receptor, IRBIT, intracellular Ca²⁺ signaling, HEK-293 cells

УДК 577.322.7'352.42

МОЛЕКУЛЯРНАЯ МОДЕЛЬ ТРАНСЛОКАЦИИ НОРФЛОКСАЦИНА ЧЕРЕЗ КАНАЛ OMPF ПОРИНА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

© 2024 г. Д. К. Чистюлин^{а, #}, Е. А. Зелепуга^{а, #, *}, В. Л. Новиков^а, Н. Н. Баланева^а, В. П. Глазунов^а, Е. А. Чингизова^а, В. А. Хоменко^а, О. Д. Новикова^{а, **}

^аТихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Елякова, Владивосток, 690022 Россия

[#]Эти авторы внесли равный вклад в работу

*e-mail: zel01@mail.ru

**e-mail: novolga_05@mail.ru

Поступила в редакцию 17.09.2023 г.

Подписана в печать 25.09.2023 г.

Принята к публикации 03.10.2023 г.

С помощью методов, основанных на использовании бислойных липидных мембран (БЛМ), молекулярного моделирования и тестирования антибактериальной активности изучено взаимодействие порина *Yersinia pseudotuberculosis* OmpF (YpOmpF) с фторхинолоновым антибиотиком норфлоксацином (Nf) и его производными (моно- и дигидрохлоридом). Обнаружено асимметричное поведение заряженных молекул Nf, NfH⁺ и Nf2H²⁺, при движении по каналу YpOmpF в зависимости от мембранного напряжения и от стороны добавления антибиотика. Электрофизиологические данные подтверждены компьютерным моделированием. Для заряженных форм антибиотика показано наличие двух периферических сайтов высокоаффинного связывания (NBS1 и NBS2), а также асимметричного сайта блокировки тока вблизи сужения канала (NBS3). Сайт NBS1, расположенный вблизи устья канала, практически одинаков по сродству к обеим заряженным формам Nf, тогда как локализация более энергетически выгодного сайта NBS2 для двух солевых форм антибиотика существенно различается. Nf имеет только один сайт связывания вблизи зоны сужения канала, который представляет собой кластер сайтов с более низким общим сродством по сравнению с упомянутыми выше периферическими сайтами связывания. Небольшие различия были обнаружены в антибактериальной активности трех форм Nf, что, вероятно, определяется их разным зарядовым состоянием и, соответственно, разной проникающей способностью и/или способностью связываться внутри канала YpOmpF.

Ключевые слова: OmpF порин *Yersinia pseudotuberculosis*, транслокация антибиотиков, бислойные липидные мембраны, молекулярное моделирование

DOI: 10.31857/S0233475524010032, **EDN:** zmxwvx

ВВЕДЕНИЕ

В ходе эволюции бактерии, в том числе патогенные, разработали несколько стратегий для выживания в различных неблагоприятных условиях, как в окружающей среде, так и в организме хозяев. Грамотрицательные бактерии способны реагировать на недостаток питательных веществ, окислительный стресс, повреждение оболочки, воздействие антимикробных препаратов и другие влияющие на их рост изменения условий, что привело к развитию у этих микроорганизмов антибиотикорезистентности. Скорость, с которой бактерии развивают устойчивость к противомикробным препаратам, намного превышает

скорость открытия новых лекарств, и это приводит к возникновению неизлечимых инфекций. Растущий уровень антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий наряду с отставанием в разработке новых потенциальных лекарственных средств делают эффективность лечения инфекционных заболеваний одной из глобальных проблем современной медицины.

Основной причиной особой опасности грамотрицательных бактерий является наличие у них, в отличие от грамположительных видов, наружной мембраны (НМ), ограничивающей периплазму и защищающей клетки от внешней среды. НМ представляет собой асимметричный бислой, который является высокоэффективным барьером

для полярных молекул. Для контроля внутренней концентрации как питательных, так и вредных веществ в НМ экспрессируется несколько белковых систем, в том числе большое количество каналов или нанопор, формируемых белками-поринами, которые прежде всего участвуют в пассивной диффузии гидрофильных соединений, включая антибиотики. Эти заполненные водой каналы модулируют проникновение низкомолекулярных веществ, в том числе полярных молекул и ионов, в соответствии с градиентом концентрации. Таким образом, помимо экспрессии специфических ферментов для деградации лекарств, грамотрицательные бактерии также могут эффективно изменять проницаемость мембраны для антибиотиков, поддерживая их низкую внутреннюю концентрацию. Именно регулирование притока низкомолекулярных веществ через эти порообразующие белки является одним из важнейших механизмов бактериальной адаптации, в том числе антибиотикорезистентности [1].

В последнее время внимание к кинетическим свойствам клеточной оболочки бактерий вызвано, с одной стороны, острой потребностью в новых антибиотиках, а с другой — экспериментальными и теоретическими достижениями в изучении трансмембранного транспорта. Тем не менее, несмотря на большое количество используемых подходов, не существует прямых и надежных экспериментальных методов для измерения проницаемости малых молекул. Это серьезно ограничивает существующий на сегодня уровень знаний о молекулярных механизмах, контролирующих проникновение антибиотиков через НМ, и является существенным пробелом в современных представлениях о функциях грамотрицательных бактерий как патогенов, который необходимо заполнить [2]. В связи с этим выяснение молекулярных основ проницаемости НМ грамотрицательных бактерий по-прежнему является актуальной задачей.

Порины НМ бактерий семейства *Enterobacteriaceae* имеют высокий уровень идентичности последовательностей и пространственной организации молекул с архетипическим OmpF порином *Escherichia coli*. Они представляют собой большие β -баррельные гомотримеры, состоящие из консервативной антипараллельной 16-нитевой структуры. Достаточное количество β -тяжей и их конфигурация обеспечивают возможность образования каждым мономером в тримере отдельной, независимо функционирующей поры для проникновения растворенных веществ. Участки последовательности, имеющие структуру β -изгиба, соединяют β -тяжи на периплазматической стороне канала, и несколько длинных неупорядоченных петель с элементами

α -спирали выступают на внеклеточной стороне. Одна из этих внеклеточных петель L2 связана с соседним мономером порина, что обеспечивает стабилизацию тримерной структуры белковой молекулы. Вторая, самая длинная петля, L3, располагается внутри барреля, формируя «зону сужения, или констрикции» (ЗК), которая определяет предел эксклюзии диффундирующих низкомолекулярных веществ. Таким образом, каналы поринов имеют форму песочных часов [3, 4]. ЗК, как правило, характеризуется скоплением кислых остатков в последовательности L3, напротив, основные остатки сосредоточены на соседней внутренней стенке β -цилиндра. Такое распределение заряженных остатков на противоположных сторонах поры формирует внутри нее сильное поперечное электрическое поле [5], которое, как считается, регулирует проникновение ионов и перенос растворенных веществ [6].

Известно, что, несмотря на высокий уровень гомологии последовательностей неспецифических поринов, даже небольшие изменения в ЗК могут приводить к значительным изменениям в проникновении малых молекул [7]. Следовательно, специфические знания о структурных деталях отдельных каналов и о том, как они влияют на мембранный транспорт, очень важны.

Неспецифические порины грамотрицательной бактерии *E. coli*, OmpF и OmpC считаются основными путями транслокации антибиотиков [8, 9]. При этом «главная» роль в этом процессе принадлежит OmpF порину, тогда как OmpC белок помимо этой функции, подобно OmpA белку, участвует в поддержании целостности мембраны [10]. Этот вывод подтверждают также наблюдения о более слабых взаимодействиях большинства антибиотиков с ортологами OmpC по сравнению с ортологами OmpF [11, 12]. Понижение уровня экспрессии неспецифических поринов, а также точечные мутации в их последовательности могут привести к уменьшению накопления антибактериальных агентов внутри клетки [7, 13]. Так, устойчивость к нескольким бета-лактамам антибиотикам наблюдалась у мутантных по OmpF порину штаммов некоторых грамотрицательных возбудителей, в том числе *E. coli* [14]; *Klebsiella pneumoniae* [15]; *Serratia marcescens* [16]; *Pseudomonas aeruginosa* [17] и *Enterobacter aerogenes* [18]. При диффузии фторированных хинолонов через поры OmpF белков также наблюдалось заметное снижение накопления этих агентов в бактериальных штаммах с дефицитом OmpF [19].

Большое количество тщательно выполненных современных исследований посвящено

транслокации через каналы неспецифических поринов различных антибиотиков ряда фторхинолонов, таких как норфлоксацин, ципрофлоксацин, энрофлоксацин и моксифлоксацин [20–23]. Предполагают, что из-за цвиттер-ионной природы фторхинолонов и наличия у их молекул значительного по величине, по сравнению с другими классами антибиотиков, дипольного момента (> 40 Д) молекулы фторхинолонов испытывают значительное влияние электрического поля внутри зоны сужения канала поринов. Например, было обнаружено, что энрофлоксацин имеет самое продолжительное время связывания внутри канала OmpF, 1–3 мс [21].

Представления о механизмах прохождения антибиотиков через поры неспецифических поринов менялись со временем. Первоначально считалось, что эти каналы «различают» растворенные вещества только по таким физико-химическим свойствам, как размер, гидрофобность и заряд. После открытия сайта связывания ампициллина внутри поринового канала было высказано предположение о том, что специфические взаимодействия также играют важную роль, особенно для проникновения лекарственных средств [24]. Однако позже путем тщательного изучения притока и оттока ампициллина и бензилпенициллина было показано, что первоначальная неспецифическая модель по-прежнему актуальна и роль специфических сайтов связывания преувеличена [25, 26].

К настоящему моменту получены только три кристаллические структуры комплексов порина с антибиотиками, а именно: OmpF белка с ампициллином, карбенициллином и эртапенемом [14]. Другие опубликованные модели взаимодействия антибиотиков с пориновыми каналами базируются, в основном, на применении методов молекулярного моделирования.

Данная работа посвящена исследованию взаимодействия OmpF порина *Yersinia pseudotuberculosis* (YpOmpF) с антибиотиком фторхинолонового ряда норфлоксацином и его производными (моно- и дигидрохлоридом) с помощью метода, основанного на использовании бислойных липидных мембран (БЛМ), молекулярного докинга и молекулярной динамики (МД). Антибиотики этого класса действуют преимущественно на грамотрицательные бактерии. Высокой активностью и наиболее широким спектром действия обладают 6-фторхинолоны, к которым принадлежит норфлоксацин. Кроме того, данный антибиотик был выбран в качестве модельного соединения по причине того, что штаммы патогенных для человека иерсиний (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) высокочувствительны

к фторсодержащим хинолонам (ципрофлоксацину, норфлоксацину, пefлоксацину). Однако данных о молекулярном механизме транспорта норфлоксацина через каналы НМ бактерий псевдотуберкулеза нет. В связи с этим мы полагаем, что изучение взаимодействия норфлоксацина и его производных с OmpF порином *Y. pseudotuberculosis* может быть полезно для понимания механизмов лекарственной устойчивости грамотрицательных бактерий в целом и иерсиний в частности.

Норфлоксацин (Nf) в качестве биполярного зонда часто применяют в электрофизиологических исследованиях одиночных молекул. Помимо исходного соединения, так называемой основной (нейтральной) формы Nf, в наших экспериментах были использованы две солевые формы Nf: моно- и дигидрохлорид (Nf·HCl и Nf·2HCl). Поскольку зарядовое состояние и, соответственно, растворимость основной формы норфлоксацина зависят от pH среды, особое внимание было уделено характеристике теоретически возможных форм молекулы этого антибиотика в водной среде.

Как известно, электрическое поле только ориентирует поляризованную молекулу (в нашем случае основание Nf) строго определенным образом, а на заряженное соединение (в нашем случае гидрохлориды Nf) действует напрямую. Нас интересовало, во-первых, существуют ли внутри поры неспецифического OmpF порина из патогенной для человека иерсинии специфические сайты связывания с Nf, и, во-вторых, насколько заряд молекулы антибиотика и направление потенциала на мембране влияют на кинетические характеристики процесса прохождения Nf по каналу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Норфлоксацин и его солевые формы. В качестве представителя фторхинолоновых антибиотиков была использована (1*H*), (4*H*)-7-(пиперазин-1'-ил)-6-фтор-1-этилхинолин-4-он-3-карбоновая кислота (**1**), торговое название норфлоксацин (Sigma-Aldrich). Брутто-формула $C_{16}H_{18}FN_3O_3$, мол. масса 319.331 г/моль, т. пл. 223°C. Структура норфлоксацина (**1**) была подтверждена данными спектра ЯМР 1H . Спектр ЯМР 1H (DMCO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 1.45 (т, 3H, Me, J=7.1); 3.27 (м, 5H, C(11) H₂, N(12) H, C(13) H₂); 3.32 (м, 4H, C(10) H₂, C(14) H₂); 4.60 (к, 2H, C(15) H₂, J=7.1); 7.18 (д, 1H, C(8) H, J_{H,F}=7.3); 7.94 (д, 1H, C(5) H, J_{H,F}=13.3); 8.32 (уш. с, 1H, COOH); 8.97 (с, 1H, C(2) H).

Синтез моногидрохлорида норфлоксацина (2). К раствору 100 мг (0.31 мМ) норфлоксацина в 10 мл сухого MeOH добавляли 0.1 мл свежеперегнанного

MeCOCl и реакционную смесь оставляли в стеклянной колбе, плотно закрытой стеклянной пробкой, на 24 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли при пониженном давлении на ротационном испарителе. Остаток сушили при пониженном давлении (2 Торр) до постоянного веса. Получено 107 мг (96%) моногидрохлорида норфлоксацина (**2**). $C_{16}H_{19}ClFN_3O_3$, мол. масса 355.796 г/моль, светлые кристаллы, т. пл. 290–310°C. Спектр ЯМР 1H (DMCO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 1.45 (т, 3H, Me, J=7.1); 3.35 (м, 4H, C(10) H_2 , C(14) H_2); 3.63 (м, 4H, C(11) H_2 , C(13) H_2); 4.66 (к, 2H, C(15) H_2 , J=7.1); 7.31 (д, 1H, C(8) H, $J_{H,F}$ =7.4); 8.02 (д, 1H, C(5) H, $J_{H,F}$ =13.4); 8.99 (с, 1H, C(2) H); 9.04 (уш. с, 1H, COOH); 15.32 (уш. с, 2H, N^+H_2). Спектр ЯМР ^{13}C (DMCO- d_6 , δ , м.д.): 14.37 (Me); 46.49 (C(10), C(14)); 49.03 (C(15)); 51.11 (C(11), C(13)); 106.36 (C(8)); 107.14 (C(5)); 111.16 (C(7)); 111.83 (C(6)); 119.93 (C(3)); 137.08 (C(8a)); 144.41 (C(4a)); 148.57 (C(2)); 164.98 (C(4)); 176.08 (COOH).

По данным спектра ЯМР 1H чистота образца моногидрохлорида Nf (**2**) составляет 99%.

Синтез дигидрохлорида норфлоксацина (3). К раствору 92 мг (0.233 мМ) моногидрохлорида норфлоксацина (**2**) в 10 мл сухого MeOH прибавляли 0.1 мл свежеперегнанного MeCOCl и реакционную смесь оставляли в стеклянной колбе, плотно закрытой стеклянной пробкой, на 24 ч при комнатной температуре, после чего к смеси добавляли еще 0.1 мл свежеперегнанного MeCOCl и оставляли ее на следующие 24 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении на ротационном испарителе. Сухой остаток сушили при пониженном давлении (2 Торр) до постоянного веса. Получено 98 мг (97%) дигидрохлорида норфлоксацина (**3**). $C_{16}H_{20}Cl_2FN_3O_3$, мол. масса 392.257 г/моль, светлые кристаллы, т. пл. 270–285°C. Спектр ЯМР 1H (DMCO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 1.40 (т, 3H, Me, J=7.2); 3.30 (м, 4H, C(10) H_2 , C(14) H_2); 3.54 (м, 4H, C(11) H_2 , C(13) H_2); 4.48 (к, 2H, C(15) H_2 , J=7.2); 7.15 (д, 1H, C(8) H, J=7.5); 7.86 (д, 1H, C(5) H, J=13.5); 8.68 (с, 1H, C(2) H); 9.83 (уш. с, 1H, COOH); 15.26 (уш. с, 2H, $N(12) H_2^+$); 15.37 (уш. с, 1H, $N(1)H^+$). Спектр ЯМР ^{13}C (DMCO- d_6 , δ , м.д.): 14.24 (Me); 42.44 (C(10), C(14)); 48.02 (C(15)); 51.11 (C(11), C(13)); 106.20 (C(8)); 109.17 (C(5)); 111.46 (C(7)); 112.13 (C(6)); 123.13 (C(3)); 136.13 (C(8a)); 143.11 (C(4a)); 148.81 (C(2)); 165.90 (C(4)); 171.34 (COOH).

По данным спектра ЯМР 1H , образец дигидрохлорида Nf (**3**) содержит не более 5% моногидрохлорида Nf (**2**).

Квантово-химические расчеты зарядов на атомах, дипольных моментов и УФ-спектров норфлоксацина (**1**) и его производных (**2**) и (**3**)

выполняли методом B3LYP/6–311++G(d, p), РСМ (H_2O) теории функционала плотности (DFT) с использованием пакета программ Gaussian 16W [27].

Температуры плавления Nf и его синтезированных производных определяли на столике «Voetius» и не корректировали.

УФ-спектры в широком диапазоне длин волн (200–500 нм) регистрировали при комнатной температуре на UV/Vis спектрометре Shimadzu 3600 Plus в рабочем буфере или в дистиллированной воде с использованием кварцевых кювет толщиной 2 мм.

Спектры ЯМР 1H и ЯМР ^{13}C регистрировали на приборе Bruker Avance-DRX-500 (500.13 МГц для 1H и 125.75 МГц для ^{13}C) в растворе в DMCO- d_6 . Внутренний стандарт — Me_4Si .

Электрофизиологические эксперименты. В экспериментах использовали образец рекомбинантного OmpF порина, получение которого подробно описано в работе [28].

БЛМ формировали по методу Мюллера–Рудина [29] из раствора дифитаноил фосфатидилхолина (DPhPC) в *n*-гептане (5 мг/мл) в тефлоновых ячейках, разделенных перегородкой с отверстиями диаметром 1 мм для суммарного тока и 0.25 мм для одиночных каналов. Водная фаза содержала 1 М KCl в буфере следующего состава: 10 мМ Трис-HCl, 10 мМ MES, 10 мМ бета-аланина (pH 7.0). 2.5 мМ Nf или его соли (Nf-HCl и Nf·2HCl) добавляли в водную фазу с разных сторон ячейки до концентрации 2.5 мМ. Для детекции ионного тока использовали пару электродов Ag/AgCl в режиме фиксации напряжения. Электрод на *trans*-стороне от мембраны был заземлен, на *cis*-стороне — подключен к усилителю BC-525C (Warner Instruments, США). Измерения проводили при комнатной температуре. Раствор белка добавляли с *cis*-стороны ячейки и, прикладывая напряжение в 50 мВ, добивались встраивания каналов. Суммарный ток через БЛМ фиксировали при концентрации YrOmpF 200 нг/мл, одиночные каналы порина получали при концентрации белка 20 нг/мл. Изменение тока через БЛМ в присутствии антибиотика фиксировали при различных значениях потенциала на мембране (от –100 до +100 мВ).

Обработку данных проводили с использованием системы L-CARD (L-502) (L-CARD, Россия) с программным обеспечением L-Graph2 (L-CARD, Россия) и Origin 2018 (OriginLab, США) для их представления и статистического анализа.

Кинетический анализ. Активности каналов определяли с помощью прямого подсчета по следующему алгоритму. От среднего уровня проводимости

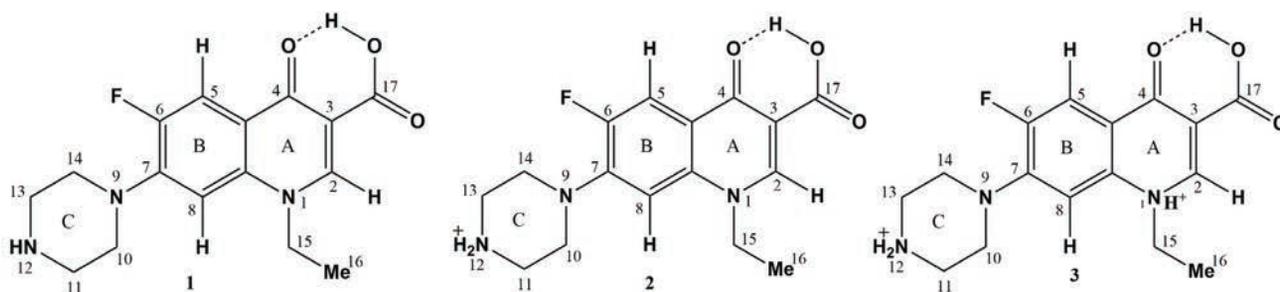


Рис. 1. Структурные формулы норфлоксацина (1) и его солей, моногидрохлорида (2) и дигидрохлорида (3).

выставляли порог в 10%, все выходящие за эту величину значения обрабатывались как события блокировки. На отрезках длиной, соответствующей 20 с, считали среднее время таких событий и их количество. Кинетические параметры были получены с помощью анализа флуктуации тока через одиночный канал. При низких концентрациях антибиотика ($c \ll K_{off}/K_{on}$) среднее время блокировки канала использовалось для подсчета константы диссоциации $t = K_{off}^{-1}$, в то время как константа ассоциации рассчитывалась как $K_{on} = n / (3[c])$, где n — число событий связывания в единицу времени [14]. Поскольку регистрируемые сигналы были «отфильтрованы» при 5 кГц, то регистрировались только события продолжительностью более 0.1 мс. Остальные события оставались неразрешенными и проявлялись в виде увеличения уровня шумов.

Молекулярный докинг и молекулярная динамика (МД). Предсказание наиболее вероятных мест связывания исследуемого антибиотика и процедуру слепого молекулярного докинга проводили, используя протокол белок-лигандного докинга с оценочной функцией London dG (генерировано 30000 поз) с последующим повторным ранжированием, используя оценочную функцию Affinity Dg с помощью программного пакета MOE2019.01 CCG [30]. Направленный докинг катионов NfH^{+1} и $Nf2H^{+2}$ проводили в области сужения поры на расстоянии 6Å вокруг ключевых остатков Lys16, Arg37, Arg77, Arg128, Asp108 и Val112.

Стартовая модель для симуляции комплексов норфлоксацина и его солей (2) и (3) (Nfs) с YpOmpF была сконструирована с помощью программы CHARMM-GUI [31, 32]. Система включала модель тримера OmpF порина, 342 молекулы липидов DPhPC и была сольватирована 30072 молекулами воды в 1 М KCl (68 K^{+} и 16 Cl^{-}). Затем система была протонирована в силовом поле Amber 14: ЕНТ при pH 7.0, с помощью специализированного программного пакета MOE2019.01 CCG с полуэмпирическим молекулярно-орбитальным пакетом МОРАС для расчета парциальных зарядов Nfs [30]. Моделирование полноатомной МД проводилось

при постоянном давлении (1 атм) и температуре (300К) с шагом по времени 2 фс. Молекулы Nf, NfH^{+1} или $Nf2H^{+2}$ были поочередно помещены в пору в соответствии с наиболее энергетически выгодными положениями, полученными из результатов молекулярного докинга для каждого соединения. Полноатомное силовое поле Amber 14: ЕНТ использовали для белков [33], липидов [34] и TIP3P для воды [35]. Молекулы растворителя считались жесткими. Все симуляции МД, включая нагрев, а также шаги по минимизации энергии, были выполнены с помощью программного пакета MOE2019.01 CCG [30] с использованием вычислительных ресурсов ЦКП «Дальневосточный вычислительный ресурс» ДВО РАН (Владивосток). Были оценены вклады нековалентных межмолекулярных взаимодействий в свободную энергию. Используемый вычислительный подход имеет некоторые ограничения: вклад энтропии в свободную энергию не учитывался.

Определение противомикробной активности. Противомикробную активность Nf и его солей определяли в отношении грамотрицательных бактерий *Y. pseudotuberculosis* (штамм 598 Ib серовара) из коллекции микроорганизмов Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН в жидких питательных средах. Тестовые культуры бактерий *Y. pseudotuberculosis* выращивали в колбах, в жидкой питательной среде LB при 37 °C в течение 24 ч. Процедуру определения противомикробной активности осуществляли в 96-луночных микропланшетах в жидкой питательной среде Мюллера—Хинтона. В эксперименте использовали бактериальную суспензию 10^9 КОЕ в 1 мл среды, в каждую лунку микропланшетов добавляли 90 мкл этой суспензии и 10 мкл растворов испытуемых веществ в диметилсульфоксиде (ДМСО) при различных концентрациях, затем инкубировали в термостатируемом шейкере при 37 °C в течение 24 ч. Ингибирование роста микроорганизмов оценивали путем измерения оптической плотности при 620 нм с помощью считывающего устройства для микропланшетов Multiskan

FC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) после предварительного встряхивания планшетов в течение 10 мин. Антимикробную активность Nf и его солевых форм определяли по ингибированию роста бактерий, которое оценивали по изменению оптической плотности опытной среды по сравнению с контролем и выражали в % от контроля [36].

Гентамицин использовали в качестве положительного контроля, раствор 1% ДМСО в фосфатно-солевом буфере — как отрицательный контроль.

Все данные получены в шести независимых повторях, и рассчитанные значения выражены как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($m \pm SEM$). Статистическая обработка результатов выполнена с использованием программного обеспечения SigmaPlot 14.0 (Systat Software Inc., Сан-Хосе, Калифорния, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Солевые формы норфлоксацина и характеристики возможных состояний молекулы норфлоксацина в буферных растворах. В качестве модельных антибиотиков в работе использовали синтетический антимикробный препарат широкого спектра действия Nf (**1**) и две его хорошо растворимые в воде соли (**2**) и (**3**).

Соли получали путем обработки основания Nf (**1**) раствором газообразного HCl в сухом MeOH. Газообразный HCl генерировали реакцией MeOH с расчетным количеством хлористого ацетила (CH_3COCl). Обработка соединения (**1**) большим избытком этого реагента всегда приводила к образованию смеси солей (**2**) и (**3**) в разном соотношении. Разделение их на компоненты оказалось сложной задачей, эффективного решения которой найти не удалось. Поэтому был выбран подход поэтапного синтеза: сначала осуществляли получение моногидрохлорида (**2**), а затем на его основе — дигидрохлорида (**3**).

Молекула основания (**1**) имеет три центра связывания молекулы HCl: два третичных атома N в положениях 1 и 9 и один вторичный в положении 12. В случае основания Nf молекула HCl связывается прежде всего с вторичным атомом азота, образуя соль (**2**). Это было установлено посредством сравнения спектров ЯМР¹H соединений (**1**) и (**2**). Наибольшие изменения значений химических сдвигов протонов наблюдались в спектре гидрохлорида (**2**) для метиленовых групп пиперазинового цикла.

Дигидрохлорид (**3**) синтезировали на основе предварительно полученного моногидрохлорида (**2**) путем его обработки раствором газообразного HCl в сухом MeOH. Из двух третичных атомов азота в молекуле соли (**2**) связывание с HCl происходило

по атому N в положении 1, что было установлено при сопоставлении спектров ЯМР¹H соединений (**2**) и (**3**). Наибольшие изменения значений химических сдвигов наблюдались в спектре дигидрохлорида (**3**) для сигналов протонов в положениях 2, 15 и 16. Реакционный центр N(9) в ходе реакции соли (**2**) с HCl не затрагивался вследствие дезактивирующего влияния электроноакцепторного атома фтора в положении 6.

Для характеристики свойств Nf (**1**) и его производных (**2**) и (**3**) была оценена их растворимость, распределение зарядов в молекулах, дипольные моменты и получены их УФ-спектры. Нами экспериментально установлено, что максимальная растворимость нейтральной формы (основное состояние) Nf (**1**) в H₂O (pH 7.0) при 20–25°C составляет 1.5 ммоль/мл, тогда как солей (**2**) и (**3**) — около 500 ммоль/мл. Ранее сообщалось, что для Nf (**1**) эта величина равна 0.97 ммоль/мл [38].

Теоретический расчет зарядов на атомах Nf (**1**) по методу NBO (natural bond orbital) [39, 40] показал, что суммарный отрицательный заряд на атомах кольца A (три атома O и атом N(1)) равен –2.456, а суммарный отрицательный заряд на атомах колец B и C (атом F и атомы N(9) и N(12)) равен –1.559, что в 1.58 раза меньше отрицательного заряда в кольце A. Напротив, суммарный положительный заряд кольца A (9 атомов C и 7 атомов H) в 1.54 раза меньше такового колец B и C (10 атомов C и 11 атомов H). Данные этих расчетов подтверждают сильную поляризацию молекулы Nf (**1**) в нейтральной форме (основное состояние).

Теоретически молекула Nf (**1**) в зависимости от pH водной среды может существовать в четырех формах: нейтральной (**1-N**), катионной (**1-K**), которая тождественна соли (**2**), анионной (**1-A**) и цвиттер-ионной (**1-Z**).

В кислой среде при pH 3.0–4.0 будет существовать форма (**1-K**), в щелочной среде при pH 10.0–11.0 — форма (**1-A**), а в нейтральной среде при pH 7.0–7.2 — форма (**1-N**) и, возможно, форма (**1-Z**). Данные квантово-химических расчетов показывают, что прочность внутримолекулярной водородной связи в молекулах (**1-N**) и (**1-K**) составляет около 9.6 ккал/моль.

Для каждой из этих форм нами был осуществлен расчет дипольных моментов в H₂O: (**1-N**) — 15.4 Д, (**1-A**) — 33.3 Д, (**1-K**) — 38.9 Д и (**1-Z**) — 59.2 Д. В работе [41] значения дипольных моментов трех форм Nf, рассчитанных в вакууме, составили: (**1-A**) — 25 Д, (**1-K**) — 27 Д и (**1-Z**) — 44 Д. Таким образом, нейтральная форма (**1-N**) имеет наименьшее значение дипольного момента, а форма (**1-Z**) — наибольшее.

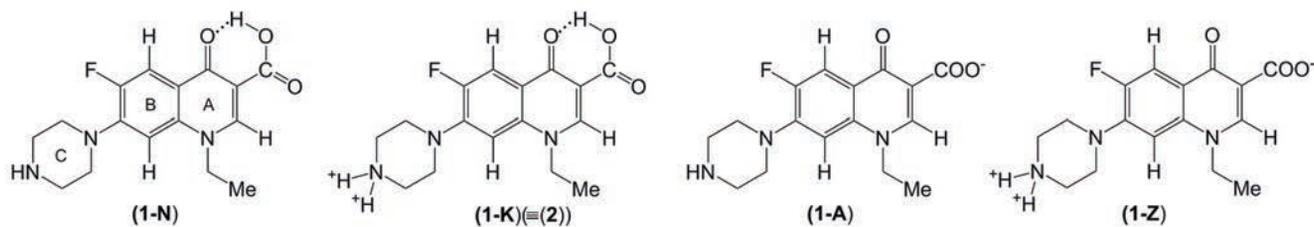


Рис. 2. Структуры четырех теоретически возможных форм молекулы норфлоксацина.

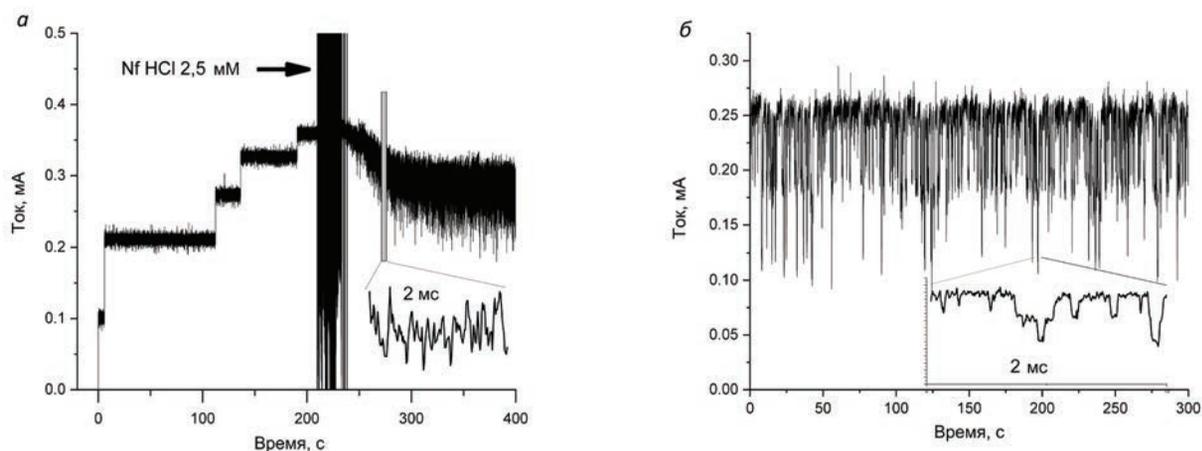


Рис. 3. Суммарная проводимость пориновых каналов YrOmpF в отсутствии (левая часть) и при добавлении (правая часть) моногидрохлорида норфлоксацина (а). Запись тока через одиночный канал YrOmpF в присутствии антибиотика (б). Водная фаза: 1 М КСl, 10 мМ Трис-НСl, 10 мМ MES, 10 мМ бета-аланина, 200 нг/мл белка (а) и 20 нг/мл (б). Мембранный потенциал 50 мВ (а) и от -100 до $+100$ мВ (б). По оси ординат — ионный ток через мембрану, мА.

В видимой области УФ-спектра норфлоксацина Nf (1) в рабочем буфере pH 7.0 и в деионизированной бидистиллированной H_2O содержится четыре полосы поглощения с максимумами при 220 нм (величина абсорбции 0.34), 276 нм (0.95), 317 нм (0.26) и 332 нм (0.28). Характеристической является полоса поглощения с максимумом при 276 нм. В теоретически рассчитанном спектре формы (1-N) в H_2O полоса поглощения с максимумом 275 нм также является доминирующей.

В УФ-спектре соли норфлоксацина (2), тождественной форме (1-K) Nf, содержится три полосы поглощения с максимумами при 278 нм (0.99), 314 нм (0.28) и 329 нм (0.25). Характеристической является полоса поглощения с максимумом при 278 нм.

В УФ-спектре соли норфлоксацина (3) содержится две полосы поглощения с максимумами при 235 нм (0.87) и 290 нм (0.61). Как видно, в спектре этого соединения полоса поглощения в области 275–280 нм, характеристическая для форм (1-N)

и (1-K), отсутствует, и трудно определить, какая из двух полос является характеристической.

Для оценки влияния pH среды на вид УФ-спектра молекулы Nf в том или ином состоянии было проведено титрование раствора Nf (1) в 0.1 М Трис-НСl буфере (pH 7.0) 0.1 н. раствором НСl. В результате была получена соль (1-K) Nf, УФ-спектр которой полностью совпал со спектром соли (2). Аналогичное титрование Nf (1) 0.1 н. раствором NaOH привело к получению соли (1-A) Nf. Оказалось, что, подобно спектру нейтральной формы Nf, в УФ-спектре анионной формы антибиотика содержится четыре полосы поглощения, но с отличающимися максимумами: при 230 нм (0.41), 273 нм (0.88), 323 нм (0.35) и 335 нм (0.33).

Теоретически рассчитанный УФ-спектр цвиттер-ионной формы (1-Z) антибиотика содержит две полосы: интенсивную при 281 нм (0.89) и менее интенсивную при 239 нм (0.53). В используемом нами рабочем буфере в спектре нейтральной

формы норфлоксацина полосы, характерные для (1-Z) формы Nf, не обнаружены.

Электрофизиологические эксперименты. В работе использовали электрофизиологический метод регистрации ионных токов, протекающих через ионные каналы, встроенные в модельные липидные мембраны (БЛМ). Ячейка состоит из двух частей, разделенных перегородкой с небольшим отверстием. В обе части опускают хлорсеребряные электроды, которые подключены к усилителю, предназначенному для регистрации тока в пикоамперных диапазонах. На *cis*-стороне ячейки находится электрод с изменяемым потенциалом, на *trans*-стороне — заземленный электрод. При нанесении на отверстие ячейки раствора липида формируется бислой, который изолирует две ее части друг от друга. При добавлении порообразующих агентов можно с помощью метода фиксации потенциала измерять электрический ток через канал и таким образом получать информацию о движении ионов, солей или других заряженных молекул через образующиеся в бислое поры. Порины НМ грамотрицательных бактерий способны спонтанно встраиваться в мембрану, ионы солей при этом двигаются через образовавшуюся пору в обоих направлениях.

Особенность структуры поринов (большие наружные гидрофильные петли, выходящие на внешнюю сторону клетки) позволяет осуществлять их направленное встраивание в БЛМ. Принято считать, что OmpF встраивается в искусственные бислои строго упорядоченным образом. Так, если добавить белок в *cis*-ячейку, наружные петли будут преимущественно обращены на *cis*- (внеклеточную) сторону, а периплазматические петли будут находиться на *trans*-стороне [42, 43]. Подобная ориентация обусловлена направлением гидрофобного момента молекулы белка: взаимодействие с липидным бислоем энергетически более выгодно (предпочтительнее) для коротких периплазматических, нежели для длинных гидрофильных внешних петель. Так, на примере порина PorB показано, что длинные внеклеточные петли поринов слишком полярны, чтобы пройти через бислои [44].

Мы проанализировали движение одиночных молекул Nf·HCl (2) и Nf·2HCl (3) через канал YrOmpF. Добавление YrOmpF (200 нг/мл) с *cis*-стороны ячейки от мембраны из DPhPC в буфере с 1 М KCl вызывает характерное для порообразующих белков НМ грамотрицательных бактерий ступенчатое увеличение проводимости (рис. 3а, левая часть). Средняя величина проводимости канала YrOmpF в 1 М KCl составляет 2.5 нСм. Добавление в ячейку солей Nf, моно- и дигидрохлорида,

вызывает флуктуации ионного тока, связанные с проникновением антибиотика внутрь поры, и может быть следствием того, что молекулы водорастворимых солей Nf способны на короткое время связываться с участками внутри канала. На рис. 3а (правая часть) приведена запись тока через бислои после добавления Nf·HCl (2), демонстрирующая появление многочисленных событий блокировки тока через пору.

При детальном рассмотрении записи тока заметно увеличение общего шума и появление пиков, величина которых составляет треть проводимости олигомерного канала. Поскольку пориновый канал является тримером, очевидно, мы наблюдаем блокировку молекулой Nf·HCl (2) отдельного мономера белка. Наблюдаемый эффект плавно нарастал в течение 20 мин, что может быть связано с распределением антибиотика по объему ячейки. Стоит отметить, что данные о блокировках канала не позволяют ответить на вопрос о том, происходит ли при этом транслокация (перенос антибиотика на другую сторону мембраны) или нет.

Связывание антибиотика внутри поры может быть обнаружено только при одноканальной записи, если ионный ток через канал полностью заблокирован или существенно уменьшен. Поэтому для определения особенностей взаимодействия антибиотика с порином мы провели эксперименты на одиночных каналах при концентрации белка 20 нг/мл (рис. 3б). В ходе эксперимента потенциал на мембране варьировали в пределах от -100 до +100 мВ, а порин вводили в ячейку с *cis*- (внеклеточной) стороны канала. Поскольку структура ячейки позволяет реализовать несимметричное введение гидрофильных/заряженных молекул с разных сторон мембраны, антибиотик добавляли с *cis*- и *trans*-стороны ячейки. Таким образом, ионы солей Nf могли оказаться в четырех принципиально различных положениях по отношению к молекуле порина, указанных на рис. 4а (схема проведения эксперимента). В результате было обнаружено, что проникновение солей норфлоксацина в канал модулирует ионный ток внутри одиночного канала порина. На характер его изменения (частоту и длительность событий блокировки) влияет изначальное положение молекулы антибиотика по отношению к каналу порина, направление потенциала на мембране, а также его величина (рис. 4а).

Если рассматривать процесс блокировки канала как одноступенчатый, то можно рассчитать его кинетические параметры, а именно, константу ассоциации (K_{on}), пропорциональную частоте возникновения событий блокировки, и константу

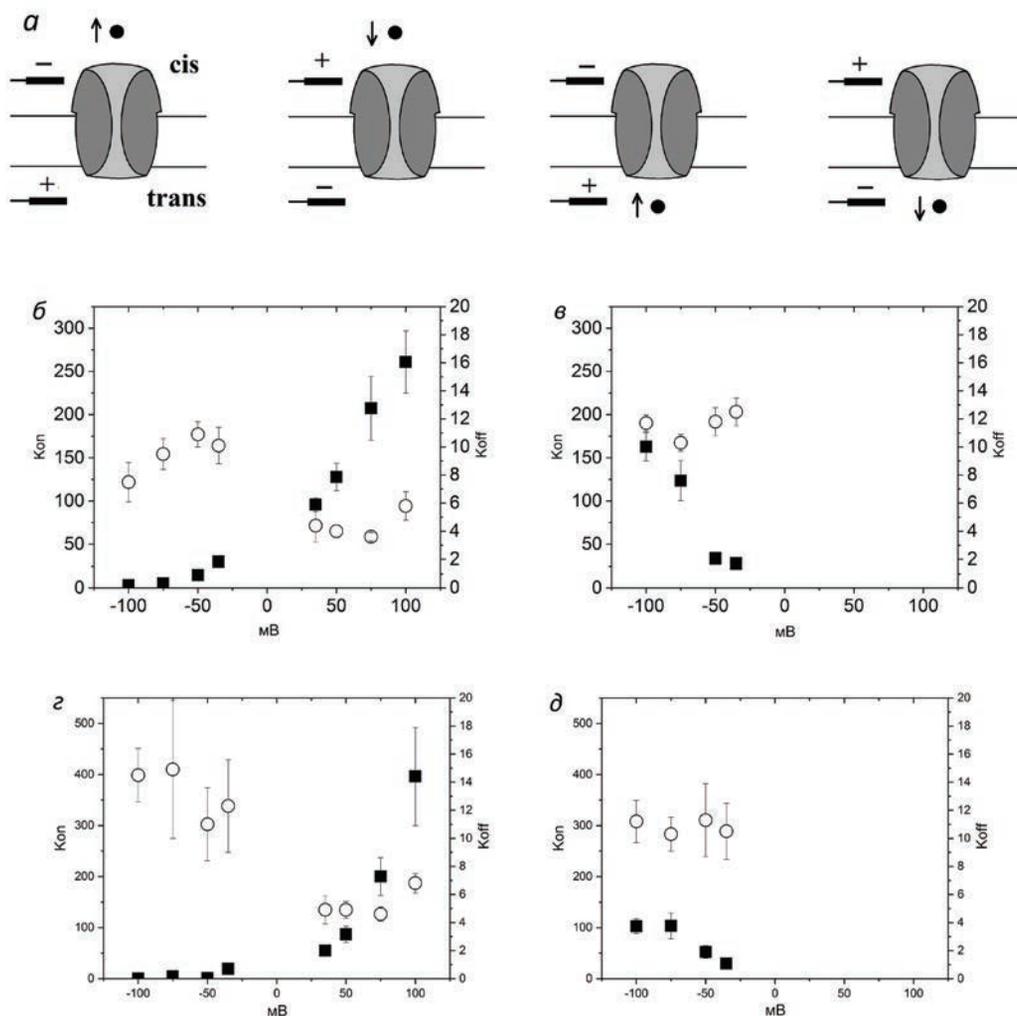


Рис. 4. Результаты электрофизиологических экспериментов с моногидрохлоридом (*б* и *в*) и дигидрохлоридом (*г* и *д*) норфлоксацина на одиночных каналах неспецифического порина OmpF *Y. pseudotuberculosis*.

a — Схема проведения эксперимента. *б–д* — Графики изменения значений кинетических констант взаимодействия канала порина с антибиотиком, ассоциации (K_{on}) и диссоциации (K_{off}), приведены в зависимости от знака потенциала на мембране и положения антибиотика относительно порина: Nf·HCl добавлен с *cis*- (*б*) и *trans*-сторонны (*в*); Nf·2HCl добавлен с *cis*- (*г*) и *trans*-сторонны (*д*). Черные квадраты — K_{on} , белые окружности — K_{off} .

Напряжение подается на *cis*-электрод, что соответствует внеклеточной стороне поры.

Водная фаза: 1 М KCl, 10 мМ Трис-HCl, 10 мМ MES, 10 мМ бета-аланин, 20 нг/мл белка. Мембранный потенциал от -100 до $+100$ мВ.

диссоциации (K_{off}), обратно пропорциональную времени блокировки. Графики изменения кинетических параметров исследуемого взаимодействия, K_{on} и K_{off} , позволили сделать выводы об особенностях процесса блокировки канала в различных условиях.

При добавлении NfH^{+1} ($Nf \cdot HCl$ (**2**)) с *cis*- (внеклеточной) стороны канала и положительном потенциале на мембране мы наблюдали максимальное количество событий связывания и полную

блокировку тока с длительным средним временем связывания порина с антибиотиком. Об этом свидетельствовали максимальные значения K_{on} и минимальные значения K_{off} (рис. 4б). При этом увеличение потенциала приводило к возрастанию K_{on} и не влияло на K_{off} . При смене направления потенциала и увеличении его до -100 мВ резко уменьшалось количество событий связывания, а время блокировки канала уменьшалось в среднем в 2 раза (рис. 4б). Вероятно, в данном случае

направление электрического поля препятствует прохождению иона NfH^{+1} через канал, что оказывает сильное негативное влияние на процесс связывания антибиотика.

Добавление NfH^{+1} с *trans*- (периплазматической) стороны канала при отрицательном потенциале на мембране также вызывает заметно меньшее количество событий и сокращение времени блокировки (по сравнению с вариантом 2б), однако при воздействии поля высокой интенсивности (ниже -50 мВ) значения K_{on} резко возрастают (рис. 4в). При положительном потенциале на *cis*-электроре вплоть до значения $+100$ мВ события блокировки канала не регистрировались (рис. 4в). Очевидно, это связано с воздействием электрического поля, препятствующего вхождению в канал положительно заряженной молекулы антибиотика, вводимой с *trans*-стороны.

На втором этапе исследований в качестве модельного соединения был использован дигидрохлорид Nf , имеющий большой положительный заряд (рис. 4г и 4д). Добавление $Nf2H^{+2}$ ($Nf \cdot 2HCl$) (3) в ячейку с порином вызвало эффект, очень похожий на взаимодействие с моногидрохлоридом Nf . Мы также наблюдали частичное перекрывание тримерных пориновых каналов со сходной частотой и длительностью блокирования тока (около 0.2 мс).

Как видно из данных рис. 4б–4д, при всех условиях эксперимента характер изменения констант ассоциации антибиотика с порином K_{on} от приложенного к мембране потенциала для обеих солей норфлоксацина в целом мало отличается. Однако в случае $Nf2H^{+2}$ он более выражен как при низких, так и при высоких значениях потенциала обоих знаков. Так, введение $Nf2H^{+2}$ с *cis*-стороны мембраны и положительном *cis*-потенциале при напряжении больше 75 мВ наблюдается большее количество событий блокировки, чем в случае NfH^{+1} . При *cis*-отрицательном потенциале практически не происходит событий блокировки канала, зато K_{off} имеет большие значения и большой их разброс, что, возможно, свидетельствует о нестабильности взаимодействия этой формы Nf с каналом (рис. 4г).

При введении $Nf2H^{+2}$ с *trans*-стороны мембраны и *cis*-отрицательном потенциале увеличение его значения от -75 до -100 мВ не влияет на количество событий блокировки, как в случае NfH^{+1} (рис. 4д). Наблюдаемые отличия, с одной стороны, могут быть обусловлены величиной заряда катиона, что подтверждает вывод о существенном влиянии электрического потенциала на процесс взаимодействия заряженной молекулы антибиотика с каналом порина. С другой стороны, выявленное

нами асимметричное поведение при движении заряженных молекул Nf через канал $YpOmpF$, которое зависело не только от напряжения, но и от стороны введения антибиотика, свидетельствует о существовании внутри поры, по крайней мере, одного асимметричного сайта или двух сайтов связывания с норфлоксацином, различающихся по аффинности, и у двух форм Nf эти сайты могут различаться.

Молекулярный докинг и молекулярная динамика (МД). Для поиска наиболее энергетически выгодных сайтов связывания антибиотика с внутренней областью канала $YpOmpF$ и предсказания природы вероятных взаимодействий на молекулярном уровне была применена методология слепого белок-лигандного докинга в программе МОЕ 2019.0109 CCG [30]. При этом молекула антибиотика рассматривалась как гибкая, в то время как рецептор оставался жестким. В качестве рецептора использовали 3D-модель $YpOmpF$ порина, которая была построена методом гомологичного моделирования с помощью программы МОЕ 2019.01 CCG [30] на основании кристаллической структуры порина $OmpF$ из *E. coli* (PDBID2OMF), как это было описано ранее [45].

В случае NfH^{+1} результаты белок-лигандного докинга позволили обнаружить существование двух наиболее энергетически выгодных кластеров, что указывает на наличие двух сайтов связывания на внутренней поверхности поры $YpOmpF$. Сайт связывания, характеризующийся минимальным значением оценочной функции (-6.50 ккал/моль), локализован на *trans*-стороне канала $YpOmpF$ (*trans*-минимум), в то время как второй сайт связывания (-5.56 ккал/моль) расположен выше ЗК на внеклеточной стороне канала (*cis*-минимум) (рис. 5а, верхняя вставка). Для детальной характеристики данных сайтов связывания были рассчитаны кратковременные (длиной 100 нс) симуляции полноатомной МД структуры комплекса NfH^{+1} с тримером $YpOmpF$, встроенного в липидный бислой и полностью сольватированного молекулами воды в присутствии 1 М KCl . Оценка энергетического вклада нековалентных межмолекулярных взаимодействий в стабилизацию комплекса белка с NfH^{+1} в обоих сайтах связывания, выполненная с помощью соответствующего приложения программы МОЕ CCG [30], позволяет предположить, что в данном случае основной движущей силой взаимодействия являются электростатические силы. При этом роль «горячих точек» взаимодействия принадлежит остаткам $Arg323$ и $Asp116$ и $Lys28$ в *cis*-минимуме и $Asp92$, а также $Lys 84$ в *trans*-минимуме.

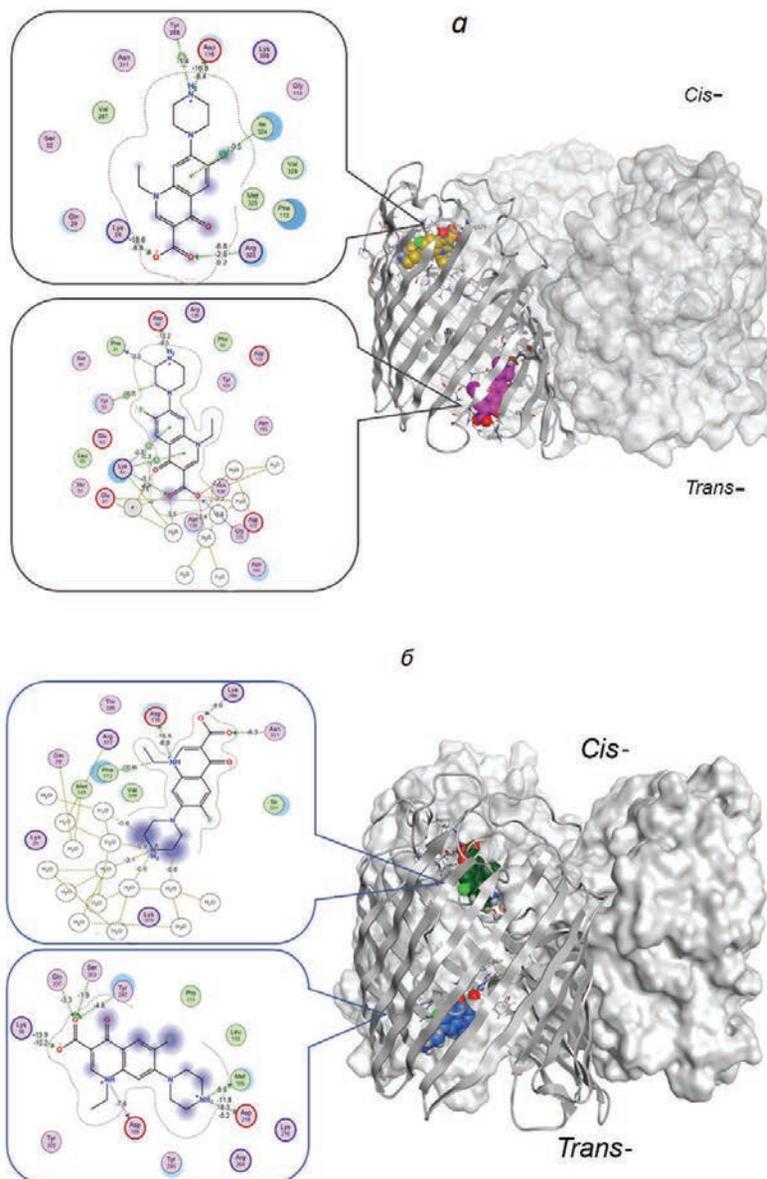


Рис. 5. Пространственная организация вероятных комплексов YrOmpF с NfHCl. 3D-структура гомотримера порина YrOmpF, две субъединицы представлены в виде молекулярной поверхности, одна — в виде ленточной диаграммы, липиды и водное окружение удалены для наглядности. Молекулы NfH⁺¹ (а) и Nf2H⁺² (б) в двух сайтах связывания приведены в шаровом представлении, в *trans*-положении розовым и синим цветом, в *cis*-положении — желтым и зеленым цветом, соответственно окружающие их аминокислотные остатки приведены в стержневом представлении. В выносках приведены 2D-диаграммы межмолекулярных взаимодействий NfH⁺¹ (а) и Nf2H⁺² (б) в обоих сайтах связывания.

Полученные нами данные согласуются с результатами исследования взаимодействия энрофлоксацина (EF) с OmpF порином *E. coli* (EcOmpF), для которого было показано наличие двух сайтов связывания антибиотика выше и ниже ЗК [21]. Однако Mahendran и соавторы полагают, что EF в центрах связывания стабилизирован преимущественно благодаря гидрофобным взаимодействиям с остатками

Met38 и консервативным Phe118, а также водородными связями с Arg132, Arg 82 и Tyr32 [21].

Следует отметить, что хотя EcOmpF и YrOmpF имеют высокую степень гомологии аминокислотной последовательности (более 50%), у них существуют некоторые различия, в частности, в длине и пространственной организации внешних петель, а также в распределении заряженных аминокислотных остатков во внутренней области их

каналов. Так, EcOmpF характеризуется наличием гидрофобного кармана в области Met38 и Phe118 и наличием объемного ароматического остатка Tyr32 в составе более длинной, чем у YpOmpF, петли L1, тогда как YpOmpF вместо Met38 и Gly325 (L8) имеет соответственно основные остатки Lys33 и Arg323, которые формируют область положительного заряда. Именно этот кластер основных остатков определяет ориентацию карбоксильной группы молекулы NfH⁺ внутри сайта связывания в области устья внешнего вестибуля поры YpOmpF (*cis*-сайт). Суммарный вклад солевых мостиков в энергию связывания составляет -5.57 ккал/моль. Таким образом, показано, что электростатические взаимодействия вносят основной вклад при связывании моногидрохлорида Nf с обоими сайтами. При этом с *cis*-стороны ключевым остатком является Arg323 (-4.2 ккал/моль), с *trans*-стороны — Asp92 (-9.3 ккал/моль).

Результаты молекулярного моделирования (докинга) свидетельствуют о том, что взаимодействие Nf2H⁺ с YpOmpF также характеризуется наличием двух высокоаффинных периферических кластеров с *cis*- и *trans*-стороны поринового канала со значением оценочной функции -5.82 и -6.32 ккал/моль соответственно, причем последний является энергетически более предпочтительным. Следует отметить, что локализация *cis*-минимума в значительной степени перекрывается с таковой для NfH⁺ в области Asp116 (Asp121 у EcOmpF), однако в отличие от моногидрохлорида сайт связывания дигидрохлорида Nf с порином смещен ближе к стенке барреля, и антибиотик может контактировать с Asn311 и Lys288. Симуляция МД и последующая оценка энергетического вклада нековалентных межмолекулярных взаимодействий позволила выявить, что основная роль в формировании комплекса принадлежит остаткам Asp116 (Asp121 у EcOmpF) и Asn311, Lys288, а также Phe113. В то же время боковая цепь функционально важного консервативного остатка Asp116 формирует водородные связи (до -15.5 ккал/моль) и ионное взаимодействие атома азота хинолонового цикла Nf2H⁺ (до -8.9 ккал/моль) с Asn311, а переменный остаток Lys288 «прикрепляет» данную форму Nf посредством водородных связей (-6.3 и -4.9 ккал/моль соответственно) к COOH группе Nf2H⁺. Phe113 способен стабилизировать комплекс посредством Pi-взаимодействия своего ароматического кольца с метильной группой антибиотика.

Следует отметить, что для дигидрохлорида Nf движущими силами комплексообразования выступают водородные связи совместно с гидрофобными взаимодействиями, аналогично таковым,

наблюдавшимся для комплекса основания Nf (1) и EcOmpF [23].

Что касается *trans*-минимума в случае Nf2H⁺, его локализация неожиданно для нас оказалась совершенно отличной от таковой для NfH⁺, а именно ниже петли L3, однако с противоположной стороны внутриклеточной части поры (рис. 5а, нижняя вставка). Согласно результатам комбинации расчетных методов наиболее энергетически выгодное положение Nf2H⁺ в составе комплекса с порином псевдотуберкулезного микроба обусловлено преимущественно множественными ионными взаимодействиями и водородными связями боковой цепи Asp218 (-10.12 и -11.8 ккал/моль соответственно) с вторичным атомом азота пиперазинового цикла дигидрохлорида Nf, а также Lys16 с карбоксильной группой Nf2H⁺ (-10.9 и -15.9 ккал/моль соответственно). Карбоксильный кислород Asp108 (Asp113 у EcOmpF) стабилизирует комплекс посредством водородной связи с атомом азота хинолонового цикла и вносит вклад порядка -7.6 ккал/моль. Более того, боковые цепи Tyr297, Ser303 и Gln337 «прикрепляют» водородными связями часть молекулы Nf2H⁺, несущую отрицательный заряд, и дают вклад в стабилизацию комплекса от -4.8 до -1.9 ккал/моль.

Следует отметить, что в отличие от относительно стабильного положения в *cis*-сайте молекула Nf2H⁺, находясь в *trans*-сайте, является более гибкой и во время МД-моделирования демонстрирует большую способность к изменению своего положения. Пиперазиновый цикл Nf2H⁺, достаточно прочно связанный боковой цепью Asp218 посредством как водородных связей, так и электростатических взаимодействий, смещается незначительно, в то время как его хинолоновый фрагмент меняет свое положение более чем на 4 \AA (с RMSD 4.2 \AA), образуя множественные контакты с Lys16, Gln337 и Tyr297. Примечательно, что боковые цепи этих остатков претерпевают лишь незначительные изменения (с RMSF от 0.82 до 1.7 \AA).

Таким образом, внутри канала YpOmpF по обе стороны от ЗК было обнаружено два энергетически выгодных сайта связывания заряженных молекул антибиотика. В первом сайте, обозначенном нами NBS1 (norfloxacin binding site), расположенном в устье канала вблизи вестибуля поры, связываются обе несущие положительный заряд молекулы Nf с общим энергетическим вкладом нековалентных белок-лигандных взаимодействий в формирование комплекса порина с NfH⁺ и Nf2H⁺, равным -38.74 и -37.79 ккал/моль соответственно. Локализация второго сайта NBS2 для ионов NfH⁺ и Nf2H⁺ отличается. Для NfH⁺

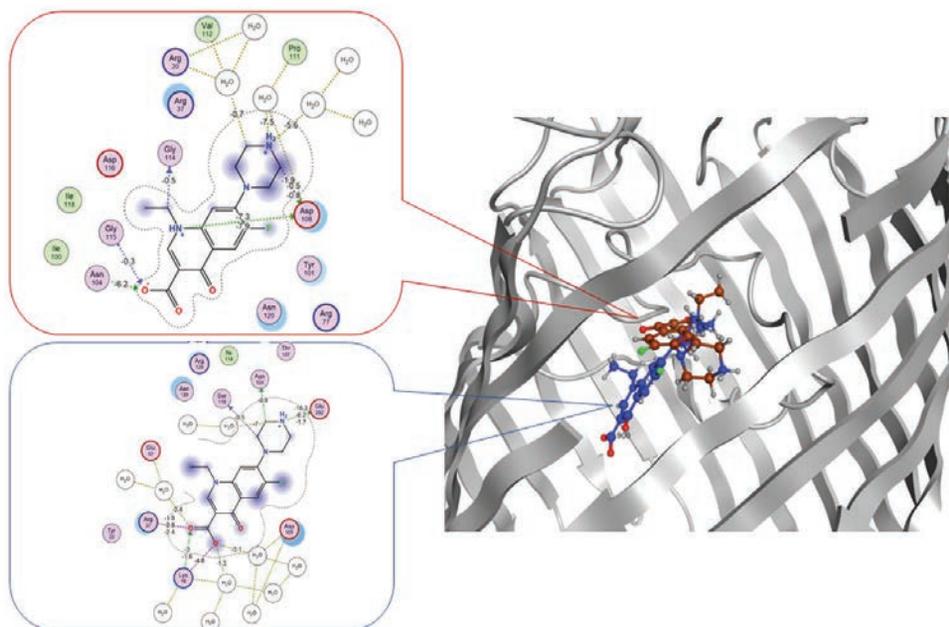


Рис. 6. Пространственная организация вероятных комплексов YrOmpF с NfH⁺¹ и Nf2H⁺². 3D-структура мономера порина YrOmpF, в виде ленточной диаграммы, часть β-тяжа, липиды и водное окружение удалены для наглядности. Молекулы NfH⁺¹ (синий цвет, нижняя вставка) и Nf2H⁺² (коричневый цвет, верхняя вставка) в сайте связывания NBS3 приведены в шаростержневом представлении. В выносках приведены 2D-диаграммы нековалентных межмолекулярных взаимодействий NfH⁺¹ (верхняя вставка) и Nf2H⁺² (нижняя вставка) с YrOmpF.

он находится практически на выходе из канала и характеризуется максимальной аффинностью (с вкладом -51.45 ккал/моль), а для Nf2H⁺² расположен достаточно близко к ЗК на противоположной стенке барреля (с вкладом -41.42 ккал/моль).

Учитывая разницу в аффинности этих двух периферических сайтов, можно предположить, что транслокация антибиотика от *cis*- к *trans*-сайту выгодна энергетически. Тем не менее блокировка тока через канал молекулами антибиотика в данных сайтах вряд ли возможна. Скорее всего, она обусловлена ориентацией антибиотика, которую он приобретает при прохождении ЗК в процессе перемещения в канале порина. Действительно, с помощью направленного белок-лигандного докинга в области 6 \AA от ЗК обнаружен еще один кластер энергетически выгодных положений для обеих форм Nf (NBS3). Однако ориентация этих заряженных форм антибиотика при связывании в этом сайте различается (рис. 6).

В случае NfH⁺¹ в сайте NBS3 ось молекулы антибиотика ориентирована под углом к плоскости мембраны, ее хинолоновый кор полностью перекрывает ЗК, чему способствует прочное взаимодействие с противоположными стенками барреля (рис. 6, верхняя вставка) посредством

множественных водородных связей и электростатических взаимодействий с остатками Arg37 и Lys16, локализованными на одной стенке барреля, и Glu252, находящимся на другой стороне. В то же время Ser119 и Asn 104 в составе петли L3 стабилизируют комплекс водородными связями. Следует отметить, что аналогично *cis*-сайту именно электростатические взаимодействия являются основной движущей силой во взаимодействии NfH⁺¹ с YrOmpF в зоне NBS3, их вклад в энергию взаимодействия составляет -24.54 ккал/моль против -20.2 ккал/моль для водородных связей.

Молекула Nf2H⁺² в области ЗК имеет такую ориентацию относительно порина, при которой плоскость хинолонового цикла расположена практически параллельно плоскости мембраны, в то время как его пиперазиновый цикл достаточно подвижен и может занимать несколько равновероятных положений относительно связи с хинолоновым кором. Анализ межмолекулярных взаимодействий и оценка их вклада в стабилизацию комплекса позволили выявить ключевую роль Asp108 (Asp113 у EcOmpF) в связывании дигидрохлорида Nf в этой области. Он формирует множество водородных связей и ионных взаимодействий как с вторичным атомом азота пиперазинового цикла, так и атомом азота хинолонового

Таблица 1. Антимикробная активность норфлоксацина и его солей по отношению к *Y. pseudotuberculosis* 598 Ib

Образец	МИК ₁₀₀ , мкМ
Nf	0.30 ± 0.01*#
NfH ⁺¹	0.30 ± 0.02*#
Nf2H ⁺²	0.61 ± 0.02*#
Гентамицин	10.46 ± 0.04*

Примечание. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего ($n = 6$), где n — число повторений, * — статистическая достоверность полученных результатов в сравнении с контролем (растворитель), # — статистическая достоверность полученных результатов для Nf и его солей в сравнении с действием гентамицина. МИК₁₀₀ — минимальная ингибирующая концентрация антибиотика, при которой полностью подавляется рост бактерий.

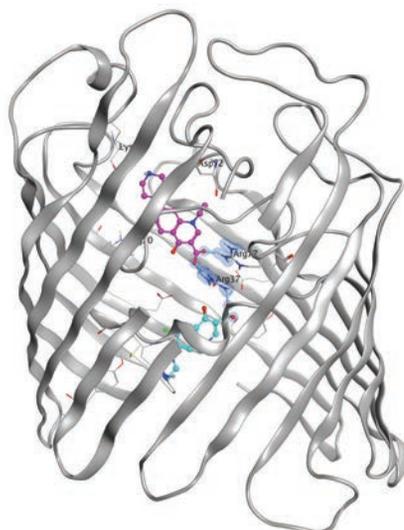


Рис. 7. Пространственная организация вероятных комплексов Nf с YrOmpF. 3D-структура мономера порина YrOmpF, в виде ленточной диаграммы, часть β -тяжей, липиды и водное окружение удалены для наглядности. Возможные ориентации молекулы Nf (верхняя часть — розовый цвет и нижняя часть — голубой цвет) в ЗК приведены в шаростержневом представлении, остатки, ответственные за связывание Nf, приведены в стержневом представлении и обозначены. Ионные взаимодействия обозначены голубыми поверхностями, водородные связи — серыми стержнями.

кора молекулы (-8.6 ± 0.2 и -7.96 ± 0.32 ккал/моль соответственно). Следует отметить, что оба эти атома азота были модифицированы при введении положительного заряда в результате получения солевых форм Nf. При этом остатком, во многом определяющим ориентацию Nf2H⁺², является Asn104 (Leu109 у EcOmpF), боковая цепь которого «прикрепляет» другую часть молекулы этой формы антибиотика к его карбоксильной группе с помощью водородной связи (-6.8 ± 0.5 ккал/моль). Необходимо, однако, отметить, что боковая цепь Arg37 оказывает неблагоприятное воздействие на стабилизацию комплекса посредством «выталкивания» положительно заряженной пиперазиновой части Nf2H⁺² и образования достаточно обширной области контакта (77 \AA^2).

Следует заметить, что обнаруженные нами различия в положении молекул основания Nf (**1**) и его

заряженных форм (NfH⁺¹ и Nf2H⁺²) по отношению к каналу YrOmpF, по сравнению с представленными в литературе данными [23] взаимодействия Nf с каналом порина *E. coli*, очевидно, связаны с различиями в первичной структуре этих белков. В случае однозарядной формы NfH⁺¹ энергетический вклад взаимодействий антибиотика с порином составляет -37.19 ккал/моль, что близко к таковому в сайте NBS1, в то время как для Nf2H⁺² этот вклад не столь существен (-19.65 ккал/моль). Этот факт косвенно объясняет более высокие средние значения K_{off} для дигидрохлорида Nf2H⁺².

Для того чтобы выяснить, как заряд молекулы антибиотика влияет на характер его взаимодействия с каналом YrOmpF, для основания Nf (**1**) было проведено *in silico* исследование. Согласно полученным нами результатам молекулярного моделирования, он не имеет периферических сайтов

связывания, а образует единственный обширный сайт связывания в ЗК (рис. 7). Основная роль при взаимодействии с антибиотиком в этой зоне канала принадлежит консервативным остаткам Arg37 (Arg42 у EcOmpF) и Arg77 (Arg82 у EcOmpF), которые формируют сеть водородных связей и ионных взаимодействий с карбоксильной группой хинолонового цикла, а также Asp72. Эти результаты хорошо согласуются с данными электрофизиологических исследований и моделирования взаимодействия Nf с порином EcOmpF, выделенным из микроорганизма дикого типа, и его мутантными формами [23]. Эти данные свидетельствуют об отсутствии ампициллин-подобного минимума в так называемой зоне предориентации, содержащей R167/168E (Asp164 у YpOmpF) и E117Q (Val164 у YpOmpF), обнаруженной у мутантов EcOmpF. В отличие от канала EcOmpF при взаимодействии канала YpOmpF с основанием Nf в ходе симуляции МД мы наблюдали два равновероятных варианта вхождения Nf в ЗК по направлению вдоль оси поры YpOmpF как карбоксильной группой хинолонового кора, так и пиперазиновым фрагментом. Вероятно, в случае Nf и $Nf2H^{+2}$ ориентирующее молекулу антибиотика электростатическое поле не столь сильно выражено из-за особенности распределения зарядов на поверхности молекул норфлоксацинов. Или можно предположить, что наличие Lys163-Asp164 и Val112 у YpOmpF вместо Arg167-Arg168 и Glu117, как это имеет место у порина EcOmpF, приводит к менее выраженному влиянию зоны предориентации на ориентацию Nf при его вхождении в пору канала YpOmpF.

Антимикробная активность норфлоксацина (1) и его солей (2) и (3). На заключительном этапе нашего исследования мы сравнили антибактериальную активность всех трех форм норфлоксацина. Оказалось, что Nf и моногидрохлорид Nf оказывают практически одинаковое действие в отношении грамотрицательных бактерий *Y. pseudotuberculosis*, а дигидрохлорид Nf в 2 раза менее эффективен, чем моногидрохлорид. Показано, что МИК₁₀₀ для Nf в отношении *Y. pseudotuberculosis* 598 более чем в 33 раза ниже, чем для бактерицидного антибиотика широкого спектра действия гентамицина из группы аминогликозидов (таблица).

В то же время действие моногидрохлорида Nf на этот штамм *Y. pseudotuberculosis* не отличается от действия Nf, тогда как антибактериальная активность дигидрохлорида Nf снижается вдвое.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Процесс транслокации молекул через пориновые каналы *in vivo* происходит в основном за счет пассивной диффузии. Зона сужения или констрикции канала обеспечивает мощный стерический и электростатический барьер против переноса нейтральных, заряженных и цвиттер-ионных молекул [23], особенно когда размер молекулы приближается к таковому зоны сужения. Некоторые авторы считают, что связывание в ЗК необходимо для облегчения эффективного переноса антибиотика через каналы неспецифических поринов OmpF типа [14]. В свою очередь, взаимодействие в ЗК определяется свойствами антибиотика, что влияет как на его ориентацию [14], так и на асимметрию активационного барьера [46].

Условия проведения электрофизиологических экспериментов подразумевают наличие мембранного потенциала, который, в свою очередь, направляет движение молекулы через канал. В результате транслокация молекул определяется аддитивным эффектом воздействия на нее этих двух электрических полей. Поскольку поверхностный заряд внутри канала YpOmpF не меняется, изменение направления и величины потенциала на мембране, а также использование модельного антибиотика с различной величиной заряда позволили нам оценить влияние электрофоретической компоненты этого процесса в различных условиях. Использование в эксперименте положительно заряженных молекул Nf было обусловлено также тем, что в литературе есть прямые доказательства того, что цвиттер-ионные β-лактамы антибиотики (ампициллин и амоксициллин) взаимодействуют с пориновыми каналами с более высоким сродством, чем отрицательно заряженные молекулы (анионные антибиотики карбенициллин, азлоциллин и пиперациллин) [47]. Авторы считают, что этот факт свидетельствует о том, что именно специфические взаимодействия вблизи зоны сужения канала OmpF характерны для цвиттер-ионных антибиотиков, но не их анионных аналогов, обладающих, вероятно, пониженной аффинностью связывания внутри поры либо полным отсутствием таковой. Однако в литературе нет данных, каким образом введение дополнительного положительного заряда в молекулу антибиотика влияет на транслокацию его внутри OmpF канала.

Для построения модели взаимодействия канала OmpF *Y. pseudotuberculosis* с антибиотиком были использованы нейтральная (основная) и две водорастворимые заряженные формы норфлоксацина. Сообщалось, что в буферных растворах при pH 7.0–7.2 Nf (1) существует в виде смеси двух форм:

цвиттер-ионной (**1-Z**) и нейтральной (**1-N**), со значительным вкладом последней [23, 41, 48]. По своей природе Nf (**1**) является амфотерным соединением ($pK_{a1} = 6.34$, $pK_{a2} = 8.75$). Кислотные свойства норфлоксацина определяются наличием в его структуре COOH-группы, а основные — наличием вторичного атома N в положении 12 и двух третичных атомов N в положениях 1 и 9. Считается, что переход нейтральной формы (**1-N**) в цвиттер-ионную форму (**1-Z**) в буферных растворах (pH 7.0–7.2) происходит под действием протона H^+ и гидроксид-аниона HO^- . Однако известно, что «голые» ионы в воде не существуют, а образуют с молекулами воды положительно заряженные ассоциаты состава $H_5O_2^+$ и $H_7O_3^+$ и отрицательно заряженные ассоциаты состава $H_3O_2^-$ [49]. Следует учитывать, что противоположно заряженные ионы указанного состава всегда окружены сольватной оболочкой («шубой») из нескольких молекул воды, и это значительно затрудняет их контакты как с COOH-группой, так и с атомом N (12) молекулы норфлоксацина. Даже если допустить образование цвиттер-ионной формы (**1-Z**) в результате одновременного взаимодействия (**1-N**) формы Nf с ионами $H_5O_2^+$ и $H_3O_2^-$, то суммарный заряд этой формы будет равен нулю [41], как и для нейтральной формы (**1-N**).

К сожалению, энергетика этого процесса до настоящего времени остается неизученной. Возможно ли экспериментально подтвердить существование цвиттер-ионной формы (**1-Z**) норфлоксацина в буферном растворе (pH 7.0–7.2)? Известны два подхода к решению этой проблемы. Первый из них основывается на сопоставлении экспериментально найденной величины дипольного момента молекулы μ с теоретически рассчитанной. Авторы работы [50] показали, что экспериментальное значение дипольного момента μ Nf в дистиллированной воде равно 7.2 Д. Оценка значения μ Nf в вакууме методом DFT B3LYP/6–31 G дала значение 6.8 Д. Сходимость этих результатов оказалась достаточно хорошей. Эти данные позволяют заключить, что в дистиллированной воде Nf существует в нейтральной форме (**1-N**), поскольку, как было указано выше, определение μ для цвиттер-ионной формы дало значение от 44 до 59 Д.

Второй подход основывается на сопоставлении экспериментальных УФ-спектров различных соединений с теоретически рассчитанными. В разделе «Результаты» указано, что сопоставление параметров экспериментальных УФ-спектров Nf в рабочем буфере и в дистиллированной воде с таковыми теоретически рассчитанных спектров позволяет говорить о существовании молекулы норфлоксацина в этих средах в нейтральной форме

(**1-N**). Если форма (**1-Z**) норфлоксацина и образуется в используемом нами буфере, то ее вклад в равновесие с формой (**1-N**) незначителен, и он не должен оказывать какого-либо влияния на результаты электрофизиологических исследований.

Соли Nf (**2**) и (**3**) склонны к диссоциации в воде с образованием хлорид-иона Cl^- и больших положительных ионов $NfH^+/Nf2H^{2+}$. Используя солевые формы антибиотика, мы имеем дело не с поляризованной формой норфлоксацина, а с его положительно заряженными ионами, что, несомненно, вносит свой вклад в кинетику процесса рассматриваемого взаимодействия. С помощью электромагнитного поля, действующего на ионы, мы «вмешиваемся» в продвижение антибиотика по каналу YrOmpF, поскольку создаем электрофоретическую силу, которая либо препятствует, либо способствует диффузии. Кроме того, положительный заряд на молекуле Nf, скорее всего, способствует увеличению времени пребывания антибиотика в канале, тогда как при прохождении канала нейтральной (основной) формой Nf блокировки канала не было обнаружено, очевидно, потому что указанное взаимодействие было слишком кратким.

Как было сказано выше, данные, полученные с использованием БЛМ, рассматривались с учетом того, что при низкой концентрации антибиотика только одна его молекула участвует в одном событии блокировки канала. Измеренная нами константа ассоциации (K_{on}) характеризует скорость проникновения молекулы антибиотика с *cis*- или *trans*-стороны к сайту блокировки канала и при разных условиях эксперимента связана с различными активационными барьерами, преодолеваемыми молекулой антибиотика при транслокации. Константа скорости диссоциации (K_{off}) описывает скорость, с которой молекулы антибиотика высвобождаются из этого сайта связывания на *cis*- или *trans*-сторону. K_{off} представляет собой суммарную скорость диссоциации ($K_{offtotal}$), поскольку отдельные ее значения при диссоциации комплекса в разных направлениях не могут быть измерены независимо друг от друга. Как показали эксперименты, значение K_{off} мало зависело от параметров поля, приложенного к мембране, а длительность блокировки канала обеими заряженными молекулами норфлоксацина была одного порядка (0.2 мс). Подобный эффект независимости K_{off} от приложенного к мембране напряжения (voltage independent effect) наблюдался для каналов мутантных форм (K168E) OmpF *E. coli* [23].

С другой стороны, электрофизиологические эксперименты выявили существенное влияние на

значение K_{on} величины и направления электрического поля, приложенного к мембране. Анализ изменений K_{on} под действием потенциала позволяет говорить о схожем механизме взаимодействия с каналом обеих солевых форм (2) и (3) антибиотика.

Результаты, полученные с помощью комбинации расчетных методов, показали наличие внутри канала YrOmpF трех энергетически выгодных сайтов связывания заряженных молекул антибиотика с различной степенью аффинности, меньшей — для экстрацеллюлярного сайта (NBS1) и большей — на выходе из поры (NBS2). Интересно отметить различную локализацию этих сайтов для разных форм антибиотика. Так, они имеют один и тот же сайт связывания вблизи устья канала NBS1, практически одинаковый по аффинности для обеих заряженных форм Nf, расположение второго сайта NBS2 для разных производных Nf существенно различается. Что касается нейтральной формы Nf, она имеет только один сайт связывания вблизи ЗК, который состоит из нескольких участков, т.е. представляет собой кластер сайтов с суммарной аффинностью, меньшей по сравнению с периферийными сайтами связывания, обнаруженными для заряженных форм антибиотика. Интересно отметить, что этот сайт связывания Nf частично перекрывается с сайтом карбомициллина, «сокристаллизованного» с EcOmpF дикого типа [14], в области Arg37 (равен Arg42 EcOmpF) и Glu57 (равен Glu62 EcOmpF). При этом карбомициллин лишь частично блокирует ток через канал. Полученные результаты и сравнение их с литературными данными позволяют сделать вывод о том, что наличие у молекулы норфлоксацина положительного заряда и его величина повышают способность связывания такой формы антибиотика внутри OmpF канала псевдотуберкулезного микроба.

Данные моделирования хорошо согласуются с результатами электрофизиологических исследований. Выявленное нами асимметричное поведение при движении заряженных молекул Nf через канал YrOmpF зависело не только от напряжения, но и от стороны введения антибиотика, что указывает на возможность блокировки тока при связывании с этими формами антибиотика либо в двух разных, отличающихся по аффинности сайтах, либо в одном несимметричном сайте. Поскольку, как было сказано выше, данные моделирования указывают на то, что блокировка не может происходить в периферийных сайтах, мы предполагаем наличие одного несимметричного сайта блокировки в зоне сужения канала.

Совокупность полученных нами данных, экспериментальных и теоретических, свидетельствуют

об асимметричной структуре канала YrOmpF. Они также дают представление о кинетике процесса взаимодействия антибиотика с каналом YrOmpF и ступенчатом характере преодоления его заряженной молекулой нескольких энергетических барьеров: двух, обусловленных взаимодействием с энергетически выгодными периферийными сайтами по обе стороны канала ($U1$ и $U2$), и двух ($U3$ и $U4$) — в ЗК, где происходит блокировка тока (рис. 8). Как видно из данных рис. 8, наблюдаемая нами асимметрия в K_{on} при введении заряженных молекул Nf с разных сторон мембраны свидетельствует о существенной разнице в энергетических барьерах, необходимых для проникновения антибиотика в сайт блокировки ($U1 < U2$).

Несимметричный график зависимости K_{on} от знака потенциала на мембране свидетельствует о том, что приложенное к мембране напряжение может либо «помогать», либо «препятствовать» преодолению этого барьера. Наглядным примером этому является один из вариантов нашего эксперимента, когда мы не наблюдали событий блокировки тока. При положительном потенциале на *cis*-электроде и введении солей Nf (рис. 4*в* и 4*д*) с *trans*-стороны ячейки прохождению заряженной молекулы антибиотика в зону блокировки канала одновременно препятствовало и направление электрического поля, и близость сайта взаимодействия с аффинностью, большей, чем в зоне блокировки канала.

Как было сказано выше, K_{off} представляет собой суммарную скорость диссоциации ($K_{offtotal}$), поскольку отдельные ее значения при диссоциации комплекса в разных направлениях не могут быть точно измерены независимо друг от друга для незаряженного основания Nf. Однако имея заряженную молекулу (в нашем случае соли (2) и (3) норфлоксацина), мы можем оценить K_{offcis} и $K_{offtrans}$ в сравнительном плане, поскольку, действуя запирающим напряжением, добиваемся преимущественного выхода молекулы с *cis*-или *trans*-стороны. Таким образом, мы можем оценить, какой барьер является более высоким, $U3$ или $U4$.

О необходимости преодоления энергетических барьеров в ЗК (в сайте NBS3) свидетельствует следующий экспериментальный факт. Несмотря на близость значений $K_{offtotal}$, было отмечено, что при отрицательных потенциалах ее величина примерно в 2 раза выше, чем при положительных (рис. 4*б* и 4*в*). Это свидетельствует о более низком *cis*-барьере ($U3 < U4$), так как при отрицательном потенциале на *cis*-электроде положительно заряженная молекула после диссоциации комплекса должна двигаться в *cis*-сторону. Опираясь на эти

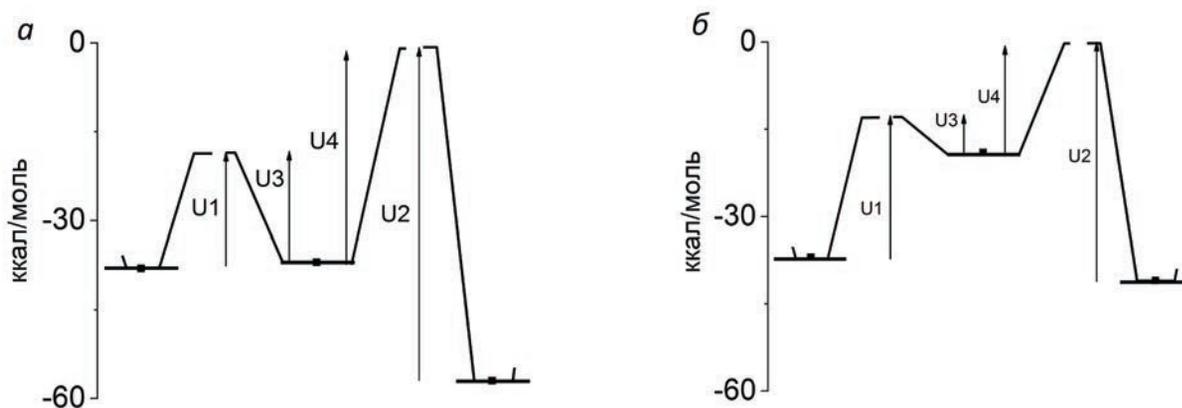


Рис. 8. Профили энергетических барьеров при транслокации заряженных форм норфлоксацина (NfH^{+1} и $Nf2H^{+2}$) через канал OmpF *Y. pseudotuberculosis*.

выводы и полагая, что блокировка тока через мембрану происходит в ЗК, можно предположить, что прямая транслокация модельного антибиотика в клетку (из внеклеточной стороны во внутриклеточную) происходит через последовательное преодоление двух барьеров U1 и U4, в то время как обратное движение сильно затруднено большим по величине барьером U2. Находясь в сайте блокировки, заряженная молекула антибиотика может выйти обратно наружу, преодолевая барьер U3, однако при достаточно большом градиенте концентрации прямой перенос может преобладать. Очевидно, при поглощении антибиотика бактериальными клетками из внешней среды движение заряженных молекул Nf происходит от *cis*-к *trans*-стороне мембраны. Обратное движение возможно, и оно значительно усиливается при приложении потенциала ниже -50 мВ, при этом NfH^{+1} может достигнуть сайта блокировки через потенциальный барьер.

Описанная нами асимметрия канала $YpOmpF$, в целом, является распространенной для неспецифических пориновых каналов этого типа и рассматривается различными исследователями как свидетельство наличия нескольких различных сайтов блокировки на *cis*- и *trans*-сторонах либо, как в нашем случае, наличия одного ассиметричного сайта блокировки. Так, при исследовании пути энрофлоксацина, фторхинолонового антибиотика, через канал внешней мембраны OmpF *E. coli* с помощью методов моделирования обнаружено два сайта связывания антибиотика, расположенных по обеим сторонам от ЗК и отделенных от нее большими энергетическими барьерами [21]. Блокировка ионного тока вызывалась молекулами, занимающими любой из этих периферийных

сайтов. Поскольку константы ассоциации зависят только от знака потенциала, а не от стороны добавления антибиотика, был сделан вывод об их равноценности. Анализ выявил сильное родство энрофлоксацина к OmpF, самое высокое среди когда-либо зарегистрированных для антибиотиков при взаимодействии с пориновыми каналами. Однако точечная мутация в зоне сужения канала OmpF, а именно замена аспарагиновой кислоты в положении 113 на аспарагин (D113N), снизила аффинность до уровня, сравнимого с силой связывания других антибиотиков. При этом оба сайта перестают играть какую-либо роль в блокировке тока, а вместо них образуется новый сайт связывания в области сужения. Он является ассиметричным, поскольку для его достижения с *cis*- и *trans*-сторон требуется преодоление разных энергетических барьеров. Таким образом, авторам удалось продемонстрировать, как одна точечная мутация может привести к сдвигу аффинного сайта внутри канала и существенно модифицировать транслокацию.

В работе [51] исследован транспорт сахаров через мальтопориновые каналы кишечной палочки. Авторы представили новую ассиметричную модель, согласно которой с периплазматической стороны поринового канала существует в 2–3 раза более высокий энергетический барьер, чем с внеклеточной стороны.

В работе [23] были исследованы закономерности транспорта жесткой дипольной молекулы норфлоксацина с использованием OmpF и OmpC белков в качестве прототипов типичных пориновых каналов. Авторы утверждают, что обнаруженная ими ассиметрия кинетических констант относительно сторон добавления антибиотика позволяет

сделать вывод о наличии двух различных сайтов блокировки, что с нашей точки зрения неверно. Подобная асимметрия может указывать лишь на разницу в потенциальных барьерах, которые необходимо преодолеть молекуле антибиотика для достижения или освобождения из сайта связывания, и ничего не говорит о количестве сайтов блокировки. Экстрацеллюлярный сайт, как показывают данные моделирования, состоит из двух участков, в первом происходит захват молекулы антибиотика и ориентация ее перпендикулярно оси поры, а сама блокировка происходит во втором участке во время прохождения через ЗК, когда молекула ориентируется вдоль оси поры. При этом приложенный потенциал «помогает» сориентировать молекулу антибиотика для проникновения в ЗК, о чем свидетельствует пропорциональное увеличение значения $K_{оп}$.

Антибактериальная активность препаратов определяется их транслокацией и накоплением в бактериальной клетке, а также взаимодействием с ключевыми вне- и внутриклеточными мишенями или тем и другим. В данном исследовании мы сосредоточили внимание на влиянии положительного заряда в молекулах солей Nf в положениях N(12) и N(1) на механизм YrOmpF-опосредованного прохождения в бактериальную клетку. В то же время в результате тестирования антибактериальной активности норфлоксацинов было показано, что введение положительного заряда в молекулу Nf (1) существенно не меняет их способность подавлять рост грамотрицательных бактерий *Y. pseudotuberculosis*, а значения MIC_{100} сохраняют тот же порядок. Однако остается неясным, чем вызвано статистически значимое двукратное снижение активности $Nf2H^{+2}$ по сравнению с активностью NfH^{+1} и Nf (1). С одной стороны, наши результаты согласуются с выводами, сделанными в работе [14], что усиление взаимодействия антибиотика с сайтами связывания внутри поринового канала отрицательно влияет на чувствительность бактерий к этому соединению. Такие выводы были сделаны на основе исследований взаимодействия мутантных поринов EcOmpF с антибиотиками, а также тестирования их антимикробной активности в отношении бактерий, экспрессирующих мутантные порины. В случае дигидрохлорида Nf мы действительно наблюдали двукратное снижение эффективности в отношении бактерий псевдотуберкулеза. С другой стороны, совпадение данных о значении MIC_{100} для NfH^{+1} и Nf (1) (табл. 1) указывает на отсутствие прямой зависимости между степенью аффинности связывания этих форм Nf внутри канала YrOmpF порина и антибактериальным действием. Этот факт может лишь указывать

на то, что эти отношения гораздо сложнее. Очевидно, существенное значение имеет не только наличие заряда, но и локализация последнего на молекуле Nf. По-видимому, отсутствие заряда на группе HN(12) пиперазинового кольца Nf не оказывает решающего влияния на биологическую активность, тогда как в случае дигидрохлорида Nf заряд атома N(1) в кольце А молекулы очень важен с точки зрения антимикробного действия. Возможно также, что такая локализация положительного заряда в хинолоновом ядре молекулы может влиять на эффективность и/или селективность по отношению к ключевым мишеням бактериальной клетки. Для решения этого вопроса необходимы дополнительные исследования влияния различных форм Nf на внутриклеточные мишени.

Полученные результаты свидетельствуют о существенном влиянии положительного заряда молекулы антибиотика на характеристики ее транслокации, но не на ее антимикробную активность в отношении грамотрицательной бактерии *Y. pseudotuberculosis*. Так, Nf и обе его солевые формы на два порядка эффективнее гентамицина в отношении исследуемых бактерий псевдотуберкулеза. Однако двукратное различие между $NfHCl$ и $Nf2HCl$ в способности ингибировать рост бактерий на данный момент трудно объяснить. Возможно, это связано с особенностями их порин-опосредованной транслокации и/или внутриклеточной маршрутизации. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования, чтобы пролить свет на то, как величина и распределение положительного заряда молекулы Nf влияют на их взаимодействие с различными мишенями внутри бактериальной клетки. Таким образом, применение метода реконструкции белка в БЛМ в сочетании с МД позволило нам определить влияние положительного заряда в молекуле норфлоксацина на передвижение антибиотика по каналу порина. Для моно- и дигидрохлорида Nf обнаружено существование двух периферийных высокоаффинных сайтов связывания, взаимодействие с которыми, по-видимому, не приводит к блокировке канала, а также асимметричного сайта блокировки тока вблизи зоны сужения канала. При этом характер взаимодействия с этими сайтами зависит не только от потенциала на мембране и стороны введения антибиотика, но и от величины и локализации заряда в молекуле антибиотика. Следует подчеркнуть также особую роль экстрацеллюлярного сайта в предварительном концентрировании антибиотика и ориентации его молекулы перед входом в пору.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Государственное задание, тема № АААА-А20–120011490018–3.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ghai I., Ghai S. 2017. Infection and drug resistance exploring bacterial outer membrane barrier to combat bad bugs. *Infection and Drug Resistance*. **10**, 261–273. <https://doi.org/10.2147/IDR.S144299>
- Scorciapino M.A., Acosta-Gutiérrez S., Benkerrou D., D'Agostino T., Mallocci G., Samanta S., Bodrenko I., Ceccarelli M. 2017. Rationalizing the permeation of polar antibiotics into Gram-negative bacteria. *J. Phys. Condens. Matter*. **29** (11), 113001. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa543b>
- Cowan S.W., Garavito R.M., Jansonius J.N., Jenkins J.A., Karlsson R., König N., Pai E.F., Pauptit R.A., Rizkallah P.J., Rosenbusch J.P., Rummel G., Schirmer T. 1995. The structure of OmpF porin in a tetragonal crystal form. *Structure*. **3** (10), 1041–1050. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00240-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00240-4)
- Baslé A., Rummel G., Storici P., Rosenbusch J.P., Schirmer T. 2006. Crystal structure of osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *J. Mol. Biol.* **362** (5), 933–942. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.08.002>
- Acosta-Gutiérrez S., Bodrenko I., Scorciapino M.A., Ceccarelli M. 2016. Macroscopic electric field inside water-filled biological nanopores. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18** (13), 8855–8864. <https://doi.org/10.1039/c5cp07902k>
- Im W., Roux B. 2002. Ion permeation and selectivity of OmpF porin: A theoretical study based on molecular dynamics, Brownian dynamics, and continuum electrodiffusion theory. *J. Mol. Biol.* **322** (4), 851–869. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00778-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00778-7)
- Bredin J., Saint N., Malléa M., Dé E., Molle G., Pagès J.M., Simonet V. 2002. Alteration of pore properties of *Escherichia coli* OmpF induced by mutation of key residues in anti-loop 3 region. *Biochem. J.* **363** (3), 521–528. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3630521>
- Yoshimura F., Nikaido H. 1985. Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27** (1), 84–92. <https://doi.org/10.1128/AAC.27.1.84>
- Pagès J.M., James C.E., Winterhalter M. 2008. The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **6** (12), 893–903. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1994>
- Choi U., Lee C.R. 2019. Distinct roles of outer membrane porins in antibiotic resistance and membrane integrity in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* **10**, 953. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00953>
- James C.E., Mahendran K.R., Molitor A., Bolla J.M., Bessonov A.N., Winterhalter M., Pagès J.M. 2009. How β -lactam antibiotics enter bacteria: A dialogue with the porins. *PLoS One*. **4** (5), e5453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005453>
- Acosta-Gutiérrez S., Ferrara L., Pathania M., Masi M., Wang J., Bodrenko I., Zahn M., Winterhalter M., Stavenger R.A., Pagès J.M., Naismith J.H., van den Berg B., Page M., Ceccarelli M. 2018. Getting drugs into gram-negative bacteria: rational rules for permeation through general porins. *ACS Infect. Dis.* **4** (10), 1487–1498. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00108>
- Lou H., Chen M., Black S.S., Bushell S.R., Ceccarelli M., Mach T., Beis K., Low A.S., Bamford V.A., Booth I.R., Bayley H., Naismith J.H. 2011. Altered antibiotic transport in OmpC mutants isolated from a series of clinical strains of multi-drug resistant *E. coli*. *PLoS One*. **6** (10), e25825. doi 10.1371/journal.pone.0025825
- Ziervogel B.K., Roux B. 2013. The binding of antibiotics in OmpF porin. *Structure*. **21** (1), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.10.014>
- Sugawara E., Kojima S., Nikaido H. 2016. *Klebsiella pneumoniae* major porins OmpK35 and OmpK36 allow more efficient diffusion of β -lactams than their *Escherichia coli* homologs OmpF and Omp C. *J. Bacteriol.* **198** (23), 3200–3208. <https://doi.org/10.1128/JB.00590-16>
- Moya-Torres A., Mulvey M.R., Kumar A., Oresnik I.J., Brassinga A.K.C. 2014. The lack of OmpF, but not OmpC, contributes to increased antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Microbiol.* **160** (9), 1882–1892. <https://doi.org/10.1099/mic.0.081166-0>
- Okamoto K., Gotoh N., Nishino T. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: Penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45** (7), 1964–1971. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.7.1964-1971.2001>
- Bornet C., Davin-Regli A., Bosi C., Pages J.M., Bollet C. 2000. Imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. *J. Clin. Microbiol.* **38** (3), 1048–1052. doi 10.1128/jcm.38.3.1048-1052.2000
- Mortimer P.G.S., Piddok L.J.V. 1993. The accumulation of five antibacterial agents in porin-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **32** (2), 195–213. <https://doi.org/10.1093/jac/32.2.195>
- Mahendran K.R., Kreir M., Weingart H., Fertig N., Winterhalter M. 2010. Permeation of antibiotics through *Escherichia coli* OmpF and OmpC porins. *J. Biomol. Screen.* **15** (3), 302–307. doi 10.1177/1087057109357791
- Mahendran K.R., Hajjar E., MacH T., Lovelle M., Kumar A., Sousa I., Spiga E., Weingart H., Gameiro P., Winterhalter M., Ceccarelli M. 2010. Molecular basis of enrofloxacin translocation through OmpF, an outer membrane channel of *Escherichia coli* — When binding does not imply

- translocation. *J. Phys. Chem. B*. **114** (15), 5170–5179. <https://doi.org/10.1021/jp911485k>
22. Mach T., Neves P., Spiga E., Weingart H., Winterhalter M., Ruggerone P., Ceccarelli M., Gameiro P. 2008. Facilitated permeation of antibiotics across membrane channels — Interaction of the quinolone moxifloxacin with the OmpF channel. *J. Am. Chem. Soc.* **130** (40), 13301–13309. <https://doi.org/10.1021/ja803188c>
 23. Bajaj H., Acosta-Gutierrez S., Bodrenko I., Mallocci G., Scorciapino M.A., Winterhalter M., Ceccarelli M. 2017. Bacterial outer membrane porins as electrostatic nanosieves: exploring transport rules of small polar molecules. *ACS Nano*. **11** (6), 5465–5473. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b08613>
 24. Nestorovich E.M., Danelon C., Winterhalter M., Bezrukov S.M. 2002. Designed to penetrate: Time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99** (15), 9789–9794. <https://doi.org/10.1073/pnas.152206799>
 25. Kojima S., Nikaido H. 2013. Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110** (28), 2629–2634. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310333110>
 26. Bafna J.A., Pangeni S., Winterhalter M., Aksoyoglu M.A. 2020. Electroosmosis dominates electrophoresis of antibiotic transport across the outer membrane porin F. *Biophys. J.* **118** (11), 2844–2852. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.04.011>
 27. Gaussian 16W. Version 1.1. Gaussian Inc., Wallingford (CT), 2019.
 28. Khomenko V.A., Portnyagina O.Y., Novikova O.D., Isaeva M.P., Kim N.Y., Likhatskaya G.N., Vostrikova O.P., Solov'eva T.F. 2008. Isolation and characterization of recombinant OmpF-like porin from the *Yersinia pseudotuberculosis* outer membrane. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **34** (2), 162–168. <https://doi.org/10.1134/s1068162008020040>
 29. Mueller P., Rudin D.O., Ti Tien H., Wescott W.C. 1962. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature*. **194** (4832), 979–980. <https://doi.org/10.1038/194979a0>
 30. Molecular Operating Environment (MOE), 2019.01; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2021.
 31. Lee J., Cheng X., Swails J.M., Yeom M.S., Eastman P.K., Lemkul J.A., Wei S., Buckner J., Jeong J.C., Qi Y., Jo S., Pande V.S., Case D.A., Brooks C.L., MacKerell A.D., Klauda J.B., Im W. 2016. CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field. *J. Chem. Theory Comput.* **12** (1), 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
 32. Lee J., Hitzengerger M., Rieger M., Kern N.R., Zacharias M., Im W. 2020. CHARMM-GUI supports the Amber force fields. *J. Chem. Phys.* **153** (3), 035103–035109. <https://doi.org/10.1063/5.0012280>
 33. Case D.A., Babin V., Berryman J.T., Betz R.M., Cai Q., Cerutti D.S., Cheatham III T.E., Darden T.A., Duke R.E., Gohlke H.; Goetz A.W., Gusarov S., Homeyer N., Janowski P., Kaus J., Kolossváry I., Kovalenko A., Lee T.S., LeGrand S., Luchko T., Luo R., Madej B., Merz K.M., Paesani F., Roe D.R., Roitberg A., Sagui C., Salomon-Ferrer R., Seabra G., Simmerling C.L., Smith W., Swails J., Walker R.C., Wang J., Wolf R.M., Wu X., Kollman P.A. (2014), AMBER14, University of California, San Francisco.
 34. Dickson C. J., Madej B.D., Skjerveik Å.A., Betz R.M., Teigen K., Gould I.R., Walker R.C. 2014. Lipid14: The amber lipid force field. *J. Chem. Theory Comput.* **10** (2), 865–879. <https://doi.org/10.1021/ct4010307>
 35. Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79** (2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
 36. Methods for dilution of antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard — 10th Edition. CLSI Document M07-A10. (2015) Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. Available from: <http://www.eucast.org>.
 37. Samson R.A. 1974. Paecilomyces and some allied hyphomycetes. *Studies in mycology*. (6), 1–119.
 38. Ahumada A. A., Seeck J., Allemandi D., Manzo R.H. 1993. The pH/solubility profile of norfloxacin. *S.T.R. Pharma Sciences*. **3** (3), 250–253.
 39. Reed A. E., Weinstock R.B., Weinhold F. 1985. Natural population analysis. *J. Chem. Phys.* **83** (2), 735–746. <https://doi.org/10.1063/1.449486>
 40. Reed A. E., Weinhold F. 1985. Natural localized molecular orbitals. *J. Chem. Phys.* **83** (4), 1736–1740. <https://doi.org/10.1063/1.449360>
 41. Mallocci G., Vargiu A.V., Serra G., Bosin A., Ruggerone P., Ceccarelli M. 2015. A database of force-field parameters, dynamics, and properties of antimicrobial compounds. *Molecules*. **20** (8), 13997–14021. <https://doi.org/10.3390/molecules200813997>
 42. Hoenger A., Pagès J.M., Fourel D., Engel A. 1993. The orientation of porin OmpF in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **233** (3), 400–413. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1520>
 43. Danelon C., Brando T., Winterhalter M. 2003. Probing the orientation of reconstituted maltoporin channels at the single-protein level. *J. Biol. Chem.* **278** (237), 35542–35551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305434200>
 44. Tanabe M., Nimigean C.M., Iverson T.M. 2010. Structural basis for solute transport, nucleotide regulation, and immunological recognition of *Neisseria meningitidis* Por B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107** (15), 6811–6816. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912115107>

45. Likhatskaya G.N., Solov'eva T.F., Novikova O.D., Isaeva M.P., Gusev K.V., Kryzhko I.B., Trifonov E.V., Nurminski E.A. 2005. Homology models of the *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* general porins and comparative analysis of their functional and antigenic regions. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **23** (2), 163–174. <https://doi.org/10.1080/07391102.2005.10507056>
46. Robertson K. M., Tieleman D.P. 2002. Orientation and interactions of dipolar molecules during transport through OmpF porin. *FEBS Lett.* **528** (1–3), 53–57. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03173-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03173-3)
47. Danelon C., Nestorovich E.M., Winterhalter M., Caccarelli M., Bezrukov S.M. 2006. Interaction of zwitterionic penicillins with the OmpF channel facilitates their translocation. *Biophys. J.* **90** (5), 1617–1627. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.075192>
48. Cama J., Bajaj H., Pagliara S., Maier T., Braun Y., Winterhalter M., Keyser U.F. 2015. Quantification of fluoroquinolone uptake through the outer membrane channel OmpF *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **137** (43), 13836–13843. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b08960>
49. Prigogine I., Stuart A.R. 1999. Hydrogen bonds with large proton polarizability and proton transfer processes in electrochemistry and biology. *Adv. Chem. Phys.* **111**, 1–217. <https://doi.org/10.1002/9780470141700.CH1>
50. Woldegiorges K., Belay A., Kebede A., Abebe T. 2021. Estimating the ground and excited state dipole moments of levofloxacin and norfloxacin drugs using solvatochromic effects and computational work. *J. Spectroscopy*. Article ID7214182. <https://doi.org/10.1155/2021/7214182>
51. Van Gelder P., Dumas F., Rosenbusch J.P., Winterhalter M. 2000. Oriented channels reveal asymmetric energy barriers for sugar translocation through maltoporin of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **267** (1), 79–84. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.00960.x>

Molecular Model of Norfloxacin Translocation Through the *Yersinia pseudotuberculosis* OmpF Porin Channel

© 2024 г. D. K. Chistyulin^{1, #}, E. A. Zelepuga^{1, #, *}, V. L. Novikov¹, N. N. Balaneva¹, V. P. Glazunov¹, E. A. Chingizova¹, V. A. Khomenko¹, O. D. Novikova^{1, **}

¹Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

[#] Authors contribute equally

*e-mail: zel01@mail.ru

**e-mail: novolga_05@mail.ru

The interaction of *Yersinia pseudotuberculosis* OmpF (YpOmpF) porin with the fluoroquinolone antibiotic norfloxacin (Nf) and its derivatives (mono- and dihydrochloride) was studied using methods based on the use of bilayer lipid membranes (BLM), molecular modeling, and antibacterial activity testing. Asymmetric behavior of charged Nf (NfH+1) and (Nf2H+2) molecules was found to move through the YpOmpF channel depending on the membrane voltage and the side of antibiotic addition. Electrophysiological data were confirmed by computer modeling. For charged forms of the antibiotic, the presence of two peripheral high-affinity binding sites (NBS1 and NBS2), as well as an asymmetric current blocking site near the channel constriction zone (NBS3), was detected. The NBS1 site located near the channel mouth has almost the same affinity for both charged forms of Nf, while the localization of the more energetically favorable NBS2 site for the two salt forms of the antibiotic differs significantly. Nf has only one binding site near the channel constriction zone, which is a cluster of sites with lower overall affinity compared to the peripheral binding sites mentioned above. Slight differences were found in the antibacterial activity of the three forms of Nf, which is likely due to their different charge states and, accordingly, different permeability and/or ability to bind within the YpOmpF channel.

Keywords: OmpF porin, *Yersinia pseudotuberculosis*, antibiotic translocation, bilayer lipid membranes, molecular modeling

УДК 591.112.1

α1-АДРЕНОРЕЦЕПТОРЫ РЕГУЛИРУЮТ ПЕЙСМЕКЕРНУЮ ФУНКЦИЮ СИНОАТРИАЛЬНОГО УЗЛА СЕРДЦА, ОКАЗЫВАЯ ВЛИЯНИЕ НА ХЛОРНЫЙ ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ТРАНСПОРТ

© 2024 г. Я. А. Воронина^{a, b, *}, А. В. Федоров^a, М. А. Челомбитько^c, У. Е. Пиунова^a, В. С. Кузьмин^{a, b}

^aМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

^bНациональный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова, Москва, 121552 Россия

^cНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, 119992 Россия

*e-mail: voronina.yana.2014@post.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 04.09.2023 г.

Подписана в печать 13.10.2023 г.

Принята к публикации 16.10.2023 г.

Норадреналин, высвобождаемый симпатическими нервными окончаниями, приводит к увеличению частоты спонтанных потенциалов действия в т.н. «пейсмекерных» кардиомиоцитах ритмоводителя сердца – синоатриальном узле (САУ), и соответственно увеличению частоты сердечных сокращений (ЧСС). Известно, что эффекты норадреналина могут быть опосредованы постсинаптическими адренорецепторами (АР) α1- и β-типа. Роль α1-АР в симпатическом контроле ЧСС и автоматии САУ, а также мембранные механизмы, опосредующие эффекты α1-АР в ритмоводителе сердца не исследованы.

В данной работе с помощью иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии изучено распределение α1A-АР в срезах САУ сердца крысы (сток Wistar, самцы, 250 ± 20 г). С помощью ПЦР в реальном времени проведена оценка уровня экспрессии мРНК α1A-АР в ткани САУ. При использовании метода перфузии изолированного сердца проведено исследование влияния стимуляции α1-АР на такие функциональные показатели ритмоводителя как (корригированное) время восстановления функции САУ (ВВФСУ/кВВФСУ) и аккомодация САУ. С помощью метода картирования электрической активности перфузируемых тканевых препаратов изучено влияние стимуляции α1-АР на пространственно-временные характеристики (паттерн) возбуждения САУ. Исследовано влияние блокады хлорной проводимости на функциональные показатели, паттерн возбуждения САУ и эффекты, вызываемые в САУ стимуляцией α1-АР.

Установлено, что в кардиомиоцитах центральной части САУ обнаруживаются флуоресцентные сигналы, соответствующие α1A-АР. Экспрессия α1A-АР в ткани САУ подтверждена на уровне мРНК. Показано, что стимуляция α1-АР оказывает влияние на функционирование САУ: агонист α1-АР фенилэфрин (ФЭ) приводит к уменьшению ВВФСУ и кВВФСУ, а также ускорению аккомодации САУ. Эти эффекты зависят от режима работы САУ, поскольку являются значимыми только при высокой частоте электрической стимуляции ритмоводителя. ФЭ вызывает изменения паттерна возбуждения САУ. Влияние ФЭ на функциональные показатели и паттерн возбуждения САУ подавляется блокатором анионных каналов (NPPB), но не ингибитором протеинкиназы С (ВІМ). Таким образом, α1-АР кардиомиоцитов важны для поддержания пейсмекерной функции САУ при высокой частоте сердечных сокращений. Результаты наших экспериментов позволяют предположить, что хлорные каналы являются мишенью сигнальных каскадов α1-АР в САУ и вовлечены в α1-адренергическую модуляцию электрофизиологических свойств ритмоводителя сердца.

Ключевые слова: ритмоводитель сердца, автоматия, синоатриальный узел, α1-адренорецепторы, хлорная трансмембранная проводимость, хлорные ионные каналы

DOI: 10.31857/S0233475524010049, EDN: zmojyv

ВВЕДЕНИЕ

Насосная функция сердца реализуется за счет ритмического координированного чередования возбуждения, сокращения и расслабления его камер. Ритмическое возбуждение сердца возможно благодаря небольшой группе «пейсмекерных» миоцитов, которые обладая особыми электрофизиологическими свойствам способны спонтанно генерировать потенциалы действия (ПД) [1, 2]. Пейсмекерные кардиомиоциты у млекопитающих животных и человека, располагаясь в стенке правого предсердия между устьями верхней и нижней полых вен, формируют доминантный ритмоводитель сердца [3, 4], называемый по месту его локализации синоатриальным узлом (САУ). САУ является сложной, гетерогенной тканевой структурой [5, 6], включающей разнородные «пейсмекерные» кардиомиоциты, а также немиокардиальные элементы в различной пропорции в центральной части и на его периферии [7, 8]. Для реализации нормального ритмического возбуждения рабочего миокарда необходима не только спонтанная активность САУ, но и скоординированная, регулируемая передача возбуждения от периферической части пейсмекерной ткани САУ к «рабочим» кардиомиоцитам предсердий [9, 10]. Нарушение нормального взаимодействия САУ и рабочего миокарда приводит к формированию различного рода аритмий, в частности к синусовым брадикардиям [11], синдрому слабости синусного узла [12], в основе которых может лежать ритмозависимая блокада проведения возбуждения из САУ к предсердиям [13, 14].

Частота сердечных сокращений (ЧСС) у млекопитающих животных варьирует в широком диапазоне, обеспечивая согласование гемодинамической функции сердца и метаболических потребностей организма. Увеличение частоты спонтанных ПД (СПД), и соответственно ЧСС, обеспечивается β -адренорецепторами пейсмекерных кардиомиоцитов САУ [15]. В настоящее время установлено, что помимо β -, в миокарде обнаруживается значительное количество α -адренорецепторов первого типа ($\alpha 1$ -АР) [16], которые отчасти опосредуют положительный инотропный эффект катехоламинов [17]. $\alpha 2$ -АР также экспрессируются в сердце, однако для них показана локализация только на терминалях нервных окончаний вегетативной нервной системы [18, 19]. Сведения касательно роли $\alpha 1$ -АР в регуляции автоматии ритмоводителя сердца противоречивы: в ряде работ показано, что активация $\alpha 1$ -АР может приводить к увеличению частоты СПД в САУ [20, 21], в то время как в других работах такого эффекта не наблюдали [22–25]. Тем не менее, стимуляция $\alpha 1$ -АР вызывает

проаритмические изменения электрофизиологических свойств структур правого предсердия, имеющих общее эмбриональное происхождение с САУ [26]. Активация $\alpha 1$ -АР приводит к деполяризации, формированию блоков проведения возбуждения в миокардиальной ткани полых вен и непарной вены [27–29], либо индуцирует спонтанные потенциалы действия и «пейсмекероподобную» активность в данной ткани [30]; активация $\alpha 1$ -АР вызывает снижение скорости проведения волны возбуждения и сдвигу мембранного потенциала в миокарде предсердной перегородки [31]. В отличие от $\alpha 1$ -АР, которые экспрессируются в кардиомиоцитах, $\alpha 2$ -АР экспрессируются исключительно на пресинаптических терминалях вегетативных нервов.

В настоящее время остается неизвестным, каково значение $\alpha 1$ -АР для реализации пейсмекерной функции САУ, а также оказывают ли $\alpha 1$ -АР влияние на передачу возбуждения от пейсмекерной ткани к рабочему миокарду.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе потенциальных эффектов $\alpha 1$ -АР в САУ, не изучены. Известно, что активация $\alpha 1$ -АР приводит к деполяризации гладкомышечных клеток стенки сосудов и вазоконстрикторному ответу за счет целого спектра механизмов, в том числе за счет усиления хлорной проводимости [32, 33]. Значительное количество хлорных ионных каналов экспрессируется и в кардиомиоцитах [34]. В данной работе впервые исследуется роль хлорного трансмембранного транспорта как возможный механизм α -адренергической модуляции биоэлектрической активности САУ; механизм поддержания и регуляции ритма сердца.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Работа выполнена с использованием препаратов изолированного сердца крысы (самцы стока Wistar, 2–4 мес., 250 ± 20 г). В ходе экспериментов были соблюдены все актуальные требования этических норм работы с лабораторными животными. Перед экспериментами животных содержали в виварии течение 2 недель в стандартных условиях при световом режиме 12:12 с доступом к воде и пище *ad libitum*.

Иммунофлуоресцентная микроскопия. При иммунофлуоресцентном анализе экспрессии $\alpha 1$ -АР были использованы тканевые препараты левого предсердия ($n = 3$) и САУ (тканевые участки радиусом 2 мм от места бифуркации артерии САУ, но не включающие ткань пограничного гребешка) крыс ($n = 3$). Тканевые образцы замораживали в жидком

азоте в криосреде Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, США). Срезы толщиной 10 мкм изготавливали на криотоме Leica CM1850UV (Германия). После отмывки в фосфатно-солевом буфере (PBS) срезы инкубировали с 10% козьей сывороткой (ПраймБиоМед, Россия) на PBS в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере. Срезы промывали в PBS в течение 20 мин и дистиллированной водой. Для окрашивания срезы инкубировали 60 мин при комнатной температуре с кроличьими поликлональными антителами к $\alpha 1A$ -AP (Thermo Fisher Scientific, PA1-047, США), разведенными 1:100 на PBS с 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA). После отмывки в PBS срезы инкубировали со вторичными козьими антителами (разведение 1:500, Thermo Fisher Scientific, A-11036, США), конъюгированными с Alexa Fluor 568 и растворенными в PBS с 1% BSA, в течение 40 мин в темноте. Препараты заключили в среду Aqua-Poly (Aqua Poly Equipment, США) и далее исследовали на конфокальном микроскопе.

Окрашенные препараты анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия) с объективом Plan-Apochromat 20x/0.8 M27. Для возбуждения флуоресценции антител использовали диодный лазер с длиной волны 555 нм. При визуализации получали стековые изображения (4 стека, разрешение каждого стека 2048×2048 пкс, 8 бит/пкс) в конфокальном режиме (диаметр точечной диафрагмы — 1 мкм, интервал между стековыми плоскостями — 1 мкм), которые затем с помощью программного обеспечения Carl Zeiss ZEN7.0 преобразовывали после удаления фоновой флуоресценции и шума в «однослойные» проекции, построенные по максимальным интенсивностям флуоресценции. Анализ изображений, включающий идентификацию областей специфической флуоресценции, осуществляли в программе ImageJ (ImageJ 1.50i), используя плагин Bio-Formats Explorer (imagej.net/Bio-Formats). Применяя стандартные процедуры ImageJ, рассчитывали процентное отношение общего количества флуоресцентных пикселей в бинарном изображении к общей площади изображения. Количество пикселей, соответствующих специфической флуоресценции, нормировали на площадь среза, вмещающую 1000 клеточных ядер.

Исследование уровня экспрессии генов (РВ-ПЦР). Для ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) использовали такие же тканевые препараты предсердия и САУ, как описано в предыдущем разделе, однако после механического удаления эндотелия. Для выделения РНК использовали ExtractRNA (Евроген, Россия), следуя рекомендациям производителя.

Образцы гомогенизировали (пестики Ахуген). В качестве соосадиателя РНК использовали гликоген. Полученный раствор тотальной РНК смешивали с 10-кратным реакционным буфером, добавляли раствор ДНКазы I (2000 е.а./мл, NEB, США) и оставляли на 15 мин при 37 °С. Затем раствор очищали от ДНКазы, добавляя 1:1 смесь фенола и хлороформа и центрифугировали. Количество и качество осажденной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США), абсорбцию измеряли при длине волны 260 нм, (260/280 нм). Проводили электрофорез в 2% агарозном геле с целью выяснения целостности полученной РНК. Библиотеку кДНК синтезировали с помощью ревертазы MMLV (Евроген, Россия). Для обратной транскрипции использовали 2 мкг РНК. Первую цепь кДНК синтезировали с помощью набора реагентов производства компании Евроген (SK021, Россия), следуя рекомендациям производителя. Качество полученной кДНК оценивали методом ПЦР с помощью готовой смеси для ПЦР 5x ScreenMix (Евроген, Россия) согласно инструкции. После завершения реакции проводили электрофорез в 2% агарозном геле с целью подтверждения наличия продукта ПЦР. Уровень экспрессии целевых генов оценивали с помощью РВ-ПЦР с использованием амплификатора BioRad CFX96. Использовали готовую смесь для ПЦР 5x qPCRmix-HS SYBR с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green (Евроген, Россия). Использовали следующие праймеры, специфичные к последовательности, соответствующей зрелому транскрипту гена белка $\alpha 1A$ -AP крысы (*Rattus norvegicus*): F: GTAGCCAAGAGAGAAAGCCG, R: CAACCCACCACGATGCCAG (размер ампликона — 135 п.н.; эффективность — 2.072). В качестве гена «домашнего хозяйства» использовали *RPLP0* (ribosomal protein lateral stalk subunit P0). Для *RPLP0* использовали следующие праймеры: F: AGGGTCCTGGCTTTGTCTGTGG, R: AGCTGCAGGAGCAGCAGTGG (размер ампликона — 212 п.н.; эффективность — 1.968).

Экспрессия *RPLP0* не различалась ($p > 0.05$) между образцами. Каждая реакция проводилась в трех повторностях; все образцы были продублированы. В качестве контроля на отсутствие геномной ДНК в образцах вместо комплементарной ДНК, как матрицу для ПЦР использовали образец РНК. Температурный режим инкубации смеси для ПЦР в реальном времени представлен в табл. 1. Полученные в результате РВ-ПЦР данные обрабатывали в программе Microsoft Excel. Кривые плавления и пороговый цикл были определены с помощью программного обеспечения CFX-96.

Таблица 1. Температурный режим инкубации смеси для ПЦР в реальном времени

Температура, °С	Время, мин	Циклы
95	3	40
95	0.1	
60	0.1	
72	0.1	

Относительный уровень экспрессии был определен с использованием метода «ΔΔCt».

Оценка времени восстановления функции САУ.

Для оценки функции САУ использовали метод перфузии изолированного по Лангендорфу сердца (при постоянном перфузионном давлении — 80 мм рт. ст.) крысы (*n* = 23). После предварительной анестезии (изофлюран, 3.5% об.) и гепаринизации (1000 ед/кг, в/б) крыс декапитировали, вскрывали грудную клетку и извлекали сердце, которое помещали в ванночку с холодным перфузионным раствором (4 °С) и отмывали от крови. Затем препарат сердца крысы через аорту фиксировали на канюле и осуществляли ретроградную перфузию при 37 °С; для перфузии использовали раствор Кребса–Хензеляйта следующего состава (в мМ): 118.5 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 11 глюкоза. Перфузионный раствор непрерывно насыщали карбогеном (95% O₂, 5% CO₂) для оксигенации и стабилизации pH (7.4). Для экспериментов использовали только те препараты изолированного сердца, в которых коронарный проток составлял не менее 10 мл/мин. После подключения изолированного сердца к перфузионной установке с помощью микроманипуляторов на поверхность ушка правого предсердия помещали биполярные серебряные электроды для регистрации электрограмм с помощью дифференциального усилителя (Нейробиолаб, NBL302, Россия); усиленный и отфильтрованный сигнал записывали с помощью аналого-цифрового преобразователя (АЦП, 5 кГц, E-154, L-Card, Россия), подключенного к компьютеру; для обработки электрограмм использовали программное обеспечение PowerGraph 3.3 (Ди-софт, Россия). После 10 мин периода адаптации в начале эксперимента определяли длительность интервалов между возбуждениями, спонтанно генерируемыми САУ. Затем биполярные стимулирующие электроды, подключенные к аналоговому изолятору и генератору импульсов (Нейробиолаб, DL360, Россия), размещали в области САУ. С помощью стимулирующих электродов, с частотой, на 10% превышающей «синусный» ритм (180 ± 20 мс), в течение 5

мин наносили возбуждающие стимулы (длительность — 2 мс, амплитуда — 2–6 В) для подавления автоматизма САУ. Далее в течение 30 с периода производили стимуляцию САУ с интервалами (S1S1) 280–290 мс (шаг 2–10 мс). По окончании каждого 30 с периода прекращали стимуляцию и в течение 1 мин регистрировали спонтанную активность САУ. Для каждого из межстимуляционных интервалов рассчитывали время восстановления функции синусного узла (ВВФСУ), которое определяли как длительность периода от последнего возбуждающего стимула до первого спонтанного возбуждения САУ, нормированная на S1S1 (рис. 1а). Корректированное время восстановления функции синусного узла (кВВФСУ) рассчитывали, как разницу между ВВФСУ и исходным спонтанным ритмом САУ.

Также для каждого из межстимуляционных интервалов рассчитывали скорость «аккомодации» САУ, которую определяли как отношение длительностей десятого и последнего цикла возбуждения САУ за минутный период спонтанной активности (рис. 1б).

Во всех сериях экспериментов определяли ВВФСУ и скорость аккомодации САУ в контрольных условиях, а затем при действии 10 мкМ агониста α1-АР фенилэфрина (ФЭ), блокатора протеинкиназы С (PKC) бисиндолилмалеимида (ВМ), а также блокатора хлорных каналов дериватива нитробензойной кислоты (NPPB) [35] (все реактивы Sigma, США).

Картирование электрической активности САУ.

Для анализа хронотопографии активации САУ, а также анализа паттерна распространения возбуждения в синоатриальной области правого предсердия использовали метод оптического картирования электрической активности миокарда, основанный на потенциал-зависимой флуоресценции мембранного зонда di-4-ANEPES. Для насыщения зондом тканевых препаратов правого предсердия крысы перфузировали в течение 30 мин раствором Тирода, содержащим 5 мкМ di-4-ANNEPS (Sigma-Aldrich, США).

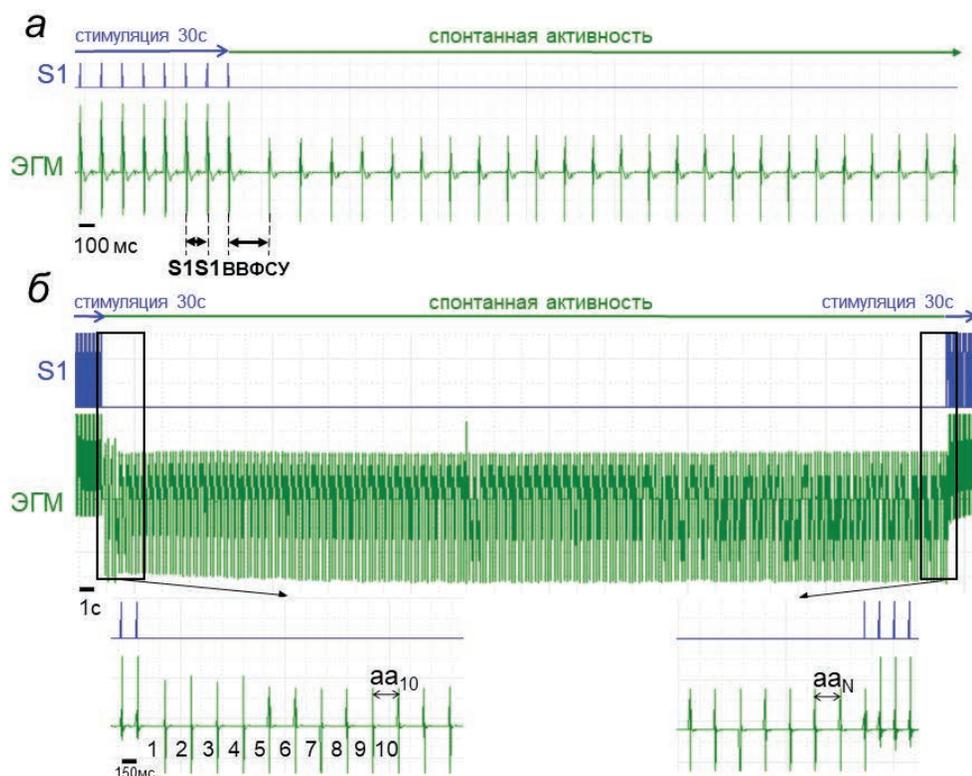


Рис. 1. ЭГМ – электрограмма, S1S1 – межстимульный интервал, ВВФСУ – время восстановления функции синусового узла, S1 – стимуляция, aa10 – длительность 10-го кардиоцикла, aaN – длительность последнего кардиоцикла.

Флуоресценцию di-4-ANEPPS возбуждали с помощью кольцевого светодиодного осветителя с максимумом спектра излучения 470 нм, мощностью 5 Вт и суммарным световым потоком до 1500 люмен. Флуоресцентные сигналы регистрировали с помощью высокочувствительной фотодиодной (PDA) матрицы H469V-012 (WuTech H-469V, Gaithersburg, США), имеющей 256 фотодиодов и включенной в состав оптико-электронной установки. Для разделения возбуждающего света и эмиссии использовали красный фильтр (пропускание > 610 нм), помещенный на входе фотодиодной матрицы. Оптическая система матрицы была настроена таким образом, что при картировании «охватывала» участок препарата длиной 5.5 мм ($S \approx 19 \text{ мм}^2$). Поле съемки PDA также проецировали на фотокамеру (NexImage, Celestron), что позволяло осуществлять анатомическую локализацию оптических сигналов при анализе данных. Флуоресценцию препаратов регистрировали с интервалами 0.61 мс в течение 1000 мс, таким образом получали записи, включающие не менее трех циклов возбуждения препарата. Сигналы от всех фотодиодов матрицы

поступали на АЦП, регистрацию и обработку сигнала осуществляли при помощи программы Cadrioplex (RedShirtImaging, США). В результате прослеживания изменения уровня флуоресценции во времени по каждому фотодиоду матрицы получали оптические сигналы, соответствующие потенциалам действия («оптические» ПД).

Проводили фильтрацию шума, основанную на применении скользящей медианы (по 5 точкам). После фильтрации оптические сигналы нормализовали на фоновую флуоресценцию (F0). На основе оптических ПД строили изохронные карты, отражающие моменты одновременной активации в картируемой области миокардиальных препаратов. Для построения изохрон определяли максимальное значение производной оптических ПД ($dF/dt \text{ max}$) для каждого фотодиода PDA, подразумевая, что значение $dF/dt \text{ max}$ соответствует максимальной скорости фазы деполяризации ПД в «точке» миокарда и соответствует моменту активации «точки» в ткани.

На основе изохрон определяли площадь и положение точки первичной активации (ТПА) в САУ, а также преимущественное направление

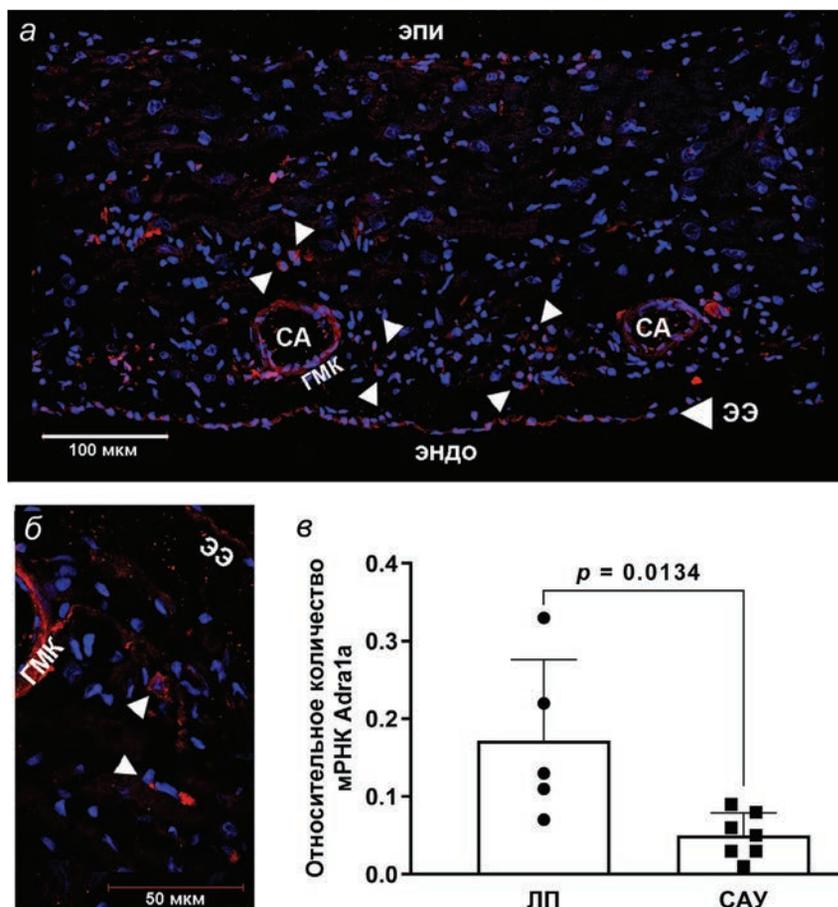


Рис. 2. Экспрессия $\alpha 1A$ -адренорецепторов ($\alpha 1A$ -АР) в синоатриальном узле сердца крысы. *а* — Репрезентативное конфокальное изображение, демонстрирующее флуоресцентные сигналы (красный псевдоцвет, Су3) антител, специфически связывающих $\alpha 1A$ -АР, в области ветвей артерии САУ. Эндо, эпи — эндокардиальная и эпикардиальная поверхность стенки правого предсердия; ЭЭ — эндокардиальный эндотелий; СА — ветви артерии САУ; ГМК — гладкомышечная обкладка артериальной стенки. Белыми стрелками указаны кардиомиоциты в центральной части на периферии САУ, экспрессирующие $\alpha 1A$ -АР. Синий псевдоцвет — клеточные ядра (DAPI). *б* — То же, что и на *а*, но при большем увеличении. *в* — Экспрессия транскриптов мРНК $\alpha 1A$ -АР в ткани синоатриального узла (САУ) и левого предсердия (ЛП), непарный *t*-test, $p < 0.05$.

распространения волны возбуждения из ТПА. Площадь ТПА рассчитывали как площадь миокарда, охваченного возбуждением в первые 2 мс после его инициации.

Статистическая обработка. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Статистически значимые различия между группами выявляли с помощью *t*-теста, однофакторной и двухфакторной ANOVA (с последующим применением апостериорных тестов для множественных сравнений в группах с повторными или независимыми, а также внесением поправки Tukey и Sidak) после предварительной проверки нормальности распределения в группах с помощью теста

Шапиро–Вилка. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение за исключением репрезентативных записей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Имунофлуоресцентная локализация белка и экспрессия транскриптов мРНК $\alpha 1A$ -АР в САУ

В центральной части САУ в зоне бифуркации артерии синусного узла обнаруживаются флуоресцентные сигналы, указывающие на присутствие $\alpha 1A$ -АР (рис. 2*а*, 2*б*) во всех образцах ($n = 5$), полученных от животных. Характер флуоресцентных сигналов указывает на то, что $\alpha 1A$ -АР имеют кластерное распределение в САУ, что является

типичным для рецепторов данного типа. Часть кластеров $\alpha 1A$ -АР в САУ окружает области, соответствующие окрестностям ядер кардиомиоцитов. Помимо перинуклеарной зоны, специфическая флуоресценция обнаруживается на периферии клеток САУ, что соответствует мембранной локализации рецепторов. Интенсивные флуоресцентные сигналы обнаруживаются также в стенке артерий САУ, а также в области эндокардиальной поверхности образцов, что типично для указанных участков и соответствует экспрессии $\alpha 1A$ -АР в гладкомышечных и эндотелиальных клетках.

Экспрессия $\alpha 1A$ -АР в САУ подтверждается на уровне мРНК. При оценке экспрессии *adria la* методом РВ-ПЦР установлено, что мРНК $\alpha 1A$ -АР у взрослых крыс экспрессируется как в левом предсердии, так и в САУ. Однако относительный уровень мРНК $\alpha 1A$ -АР статистически значимо больший в левом предсердии.

Влияние стимуляции $\alpha 1$ -АР фенилэфрином на ЧСС, ВВФСУ и аккомодацию САУ

Стимуляция $\alpha 1$ -АР фенилэфрином приводит к увеличению спонтанного ритма изолированного сердца: при действии ФЭ в концентрации 10 мкМ ЧСС увеличивается ($p < 0.01$) до 5.19 ± 0.85 Гц ($n = 15$) от 4.25 ± 0.52 Гц ($n = 15$) в контроле (рис. 3а).

Увеличение частоты стимуляции САУ приводит к росту времени возникновения первого спонтанного возбуждения в САУ, то есть ВВФСУ (рис. 3б). ФЭ (10 мкМ) снижает ВВФСУ при S1S1 = 95, 90, 80, 75 и 70 мс (для S1S1 = 90 мс 3.23 ± 0.29 в контроле и 4.33 ± 0.8 при действии ФЭ, $n = 15$, $p < 0.01$, рис. 3б), но не вызывает изменения параметра при S1S1 в диапазоне 280–100 мс.

При увеличении частоты стимуляции САУ крысы кВВФСУ изменяется сложным образом: в диапазоне межстимуляторных интервалов от 280 до 200 мс кВВФСУ значимо ($p < 0.01$, $n = 6$) снижается, а в диапазоне S1S1 от 200 до 80 мс — возрастает ($p < 0.01$, $n = 6$).

При S1S1 = 150 мс, что соответствует верхней границе ЧСС у крыс *in vivo*, наблюдается пиковое значение кВВФСУ (110.3 ± 40 мс, $n = 15$). ФЭ (10 мкМ) вызывает уменьшение кВВФСУ при S1S1 = 150, 140 и 90 мс ($p < 0.01$, $n = 6$).

Величина аккомодации САУ практически линейно уменьшается при снижении межстимуляторных интервалов: при S1S1 = 280 мс — $100 \pm \pm 15\%$; при S1S1 = 80 мс — $70 \pm 15\%$ ($n = 15$) (рис. 3в, 3г). ФЭ снижает зависимость аккомодации САУ от величины межстимуляторных интервалов

и увеличивает этот параметр для значений S1S1 в диапазоне 100–90 мс (для 90 мс $90 \pm 10\%$, $n = 6$, $p < 0.05$).

Влияние ингибиторов РКС и хлорного трансмембранного транспорта на эффекты $\alpha 1$ -АР в САУ

Блокатор протеинкиназы С (ВІМ, 10 мкМ) не оказывал статистически значимого влияния на увеличение ЧСС изолированного сердца, вызванное ФЭ (10 мкМ): ЧСС при действии ФЭ, а также ФЭ на фоне ВІМ составляла 5.19 ± 0.85 и 4.86 ± 0.21 Гц соответственно ($p > 0.05$, $n = 6$). Блокада РКС не приводила к восстановлению сниженных ФЭ значений ВВФСУ и кВВФСУ в диапазоне межстимуляторных интервалов 280–80 мс. Кроме того, ВІМ не оказывал влияния на аккомодацию САУ. При восстановлении спонтанной активности после стимуляции с интервалами S1S1 = 90 мс аккомодация при действии ФЭ составила $90 \pm 8\%$ ($n = 6$), а при действии ФЭ на фоне ВІМ — $90 \pm 8\%$ ($p > 0.1$, $n = 6$).

Блокада анионных каналов (NPPB, 1 мкМ) подавляет, вызванные ФЭ изменения ВВФСУ, кВВФСУ и аккомодации САУ (рис. 4). Более того, NPPB при самостоятельном действии, а также при действии на фоне ФЭ приводит к значительному увеличению кВВФСУ. Однако этот эффект зависит от величины S1S1 и спонтанного ритма САУ: NPPB вызывает увеличение кВВФСУ только в диапазоне межстимуляторных интервалов от 150 до 100 мс, с максимумом эффекта при S1S1 = 110 мс (2767.9 ± 190.7 и 98.7 ± 31.6 мс в контроле или $2804 \pm 91\%$ от контрольного значения, $p < 0.01$, $n = 5$, рис. 4а). Важно, что вызванное NPPB на фоне ФЭ увеличение кВВФСУ сопровождается ступенчатым восстановлением автоматии САУ (рис. 4б), а также уменьшением аккомодации: при S1S1 = 120 мс этот параметр составляет $55 \pm 10\%$ ($p < 0.05$, $n = 5$, рис. 4в) по сравнению с $90 \pm 10\%$ при действии только ФЭ или $70 \pm 10\%$ в контроле.

Хронотопография активации САУ и предсердного миокарда при стимуляции $\alpha 1$ -АР фенилэфрином

Как и в экспериментах с изолированным сердцем, ФЭ (10 мкМ) увеличивал частоту спонтанных ПД в тканевых препаратах САУ (на $26.0 \pm 7.1\%$, $n = 6$, $p < 0.01$). При действии ФЭ наблюдается значительное увеличение площади зоны первичной активации: от 0.15 ± 0.01 мм² в контроле до 0.25 ± 0.01 мм² при действии ФЭ ($p < 0.05$, $n = 6$). Общей тенденцией при действии ФЭ является смещение ТПА из центральной части препаратов САУ в направлении устья верхней полой вены (величина смещения — 2.4 ± 0.1 мм, $n = 6$, рис. 5а, 5б).

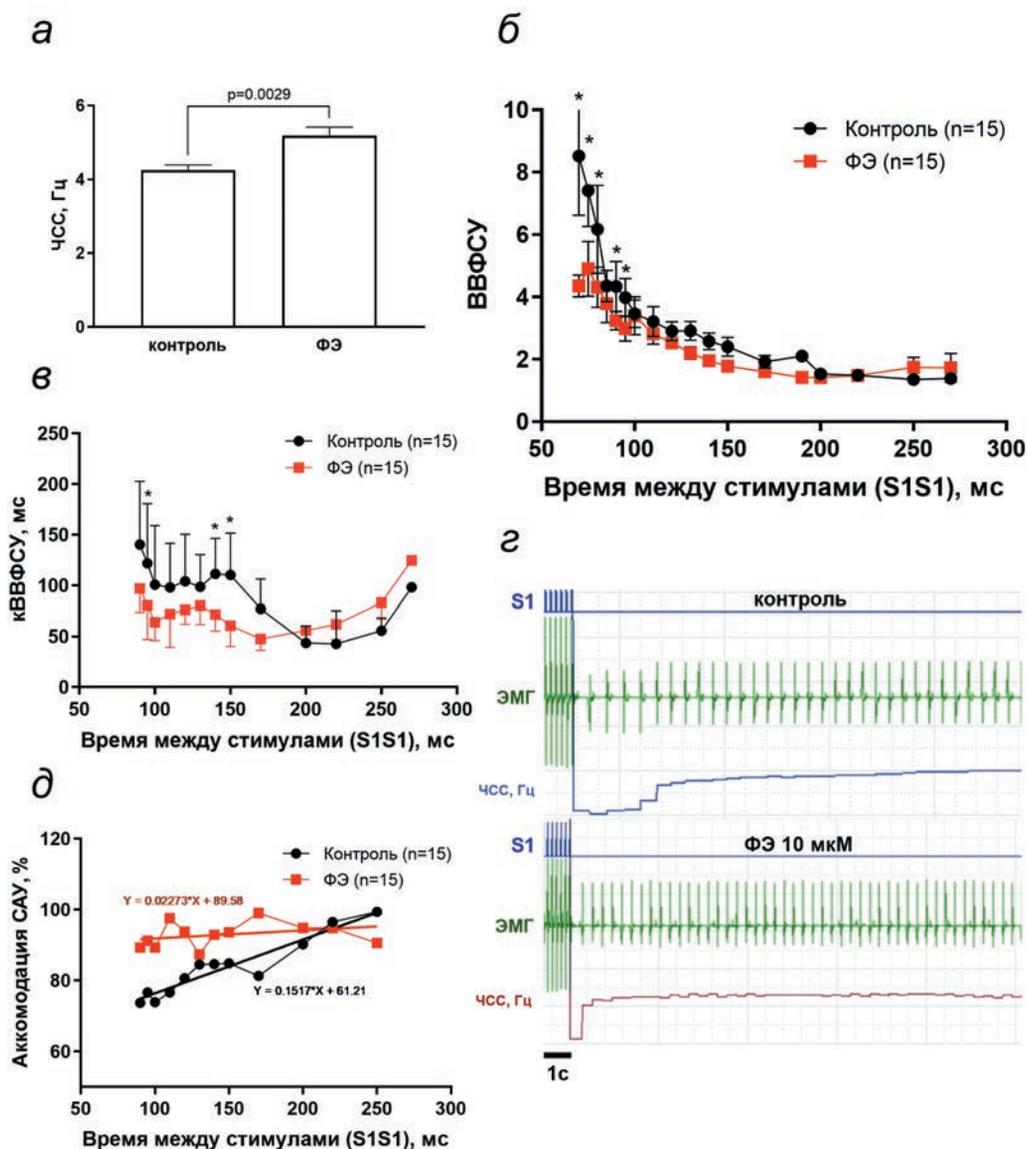


Рис. 3. Влияние стимуляции $\alpha 1$ -адренорецепторов на автоматию сердца. *а* — Увеличение ЧСС изолированного сердца крысы при действии 10 мкМ фенилэфрина (ФЭ), парный *t*-test, $p < 0.05$. *б* — Влияние ФЭ на время восстановления функции синусового узла. *в* — Влияние ФЭ на скорректированное время восстановления функции синусового узла (кВВФСУ), двухфакторная ANOVA, поправка на множественное сравнение Holm-Sidak’a, $p < 0.05$. *г*–*з* — Репрезентативные примеры записей, демонстрирующие восстановление спонтанной активности САУ (после прекращения стимуляции) в контроле и при действии ФЭ. На всех панелях сверху оригинальная запись предсердной электрограммы; снизу — частота спонтанных возбуждений САУ. *д* — Влияние ФЭ на скорость аккомодации САУ. Регрессионные уравнения показаны рядом с кривыми.

Влияние блокады РКС и хлорного трансмембранного транспорта на хронотопографию активации САУ

Блокада РКС не вызывает заметных изменений эффектов ФЭ в САУ. То есть при действии ВМ (10 мкМ) на фоне ФЭ (10 мкМ) наблюдается такое же

увеличение частоты спонтанных ПД (на $27.2 \pm 8.1\%$, $p > 0.1$, $n = 5$), такое же смещение ТПА (2.10 ± 0.14 мм, $n = 3$), увеличение площади ТПА (0.21 ± 0.01 мм², $n = 3$), как и при действии только ФЭ.

В части экспериментов NPPB (1 мкМ) вызывает подавление спонтанной активности препаратов САУ (2 из 7), в другой части наблюдается снижение

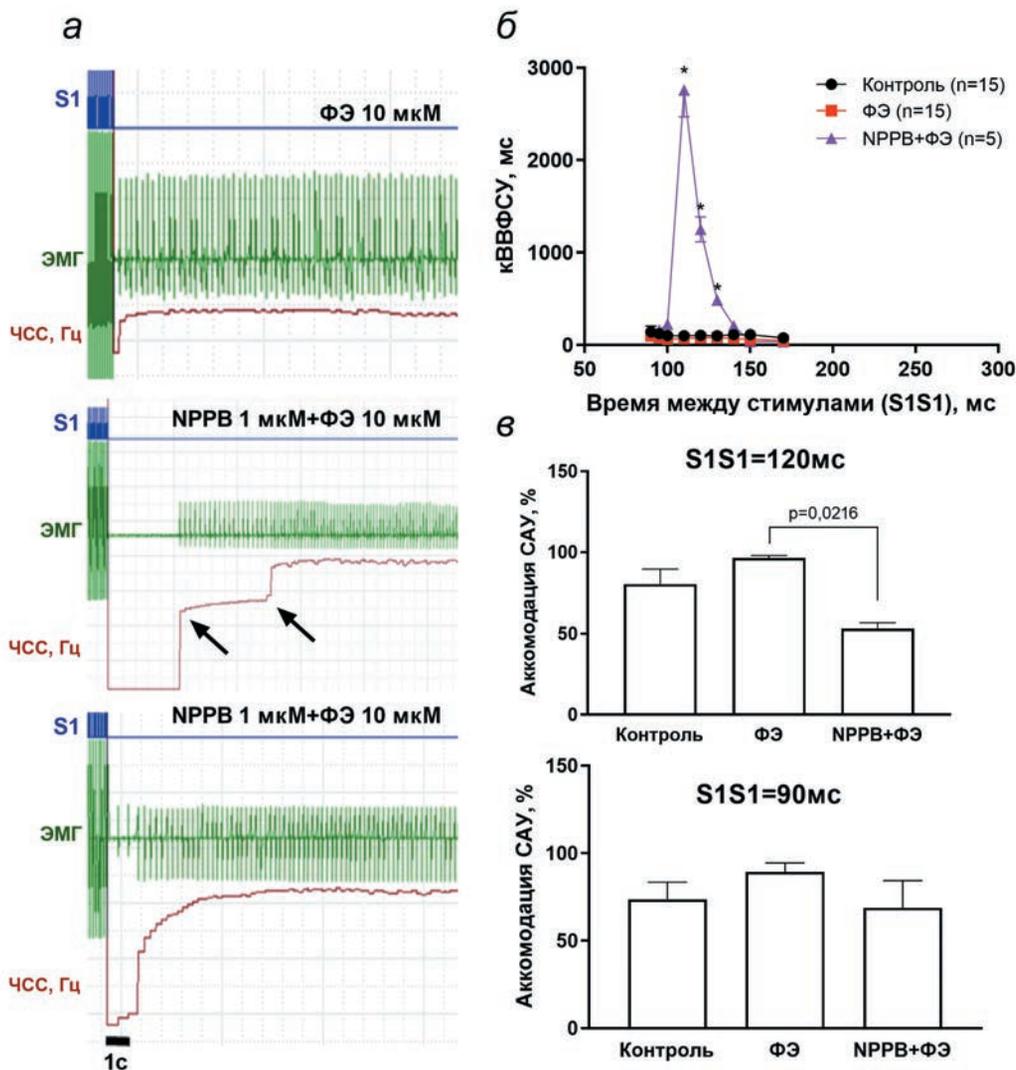


Рис. 4. Влияние блокады хлорных каналов на $\alpha 1$ -адренергические эффекты в САУ. *а* — Репрезентативные примеры записей, демонстрирующие восстановление спонтанной активности САУ (после прекращения стимуляции) при действии фенилэфрина (ФЭ) (верхняя панель). При действии ФЭ на фоне NPPB наблюдается ступенчатый характер (средняя панель) возобновления ритма изолированного сердца (автоматии САУ). *б* — Влияние NPPB на снижение, кВВФСУ, вызываемое ФЭ, двухфакторная ANOVA с поправкой на множественное сравнение Tukey, $p < 0.05$. *в* — Влияние NPPB на увеличение аккомодации САУ, вызываемое ФЭ; верхняя панель - S1S1=100 мс, нижняя панель - S1S1=90 мс. Однофакторная ANOVA с поправкой на множественное сравнение Tukey, $p < 0.05$.

частоты СПД (на $9.6 \pm 6.0\%$, $p > 0.05$, $n = 5$), уменьшение площади ТПА (до $0.08 \pm 0.01 \text{ мм}^2$). Снижение частоты СПД и уменьшение площади сопровождается смещением точки активации ($0.8 \pm 0.1 \text{ мм}$, $p > 0.1$, $n = 5$) в направлении пограничного гребешка. Как в случае подавления спонтанной активности, так и в случае смещения ТПА при действии NPPB наблюдается формирование невозбудимой зоны ($n = 4$, рис. 5в) в той области САУ, в которой располагалась ТПА в контрольных условиях.

NPPB подавляет эффекты стимуляции $\alpha 1$ -АР: в присутствии NPPB ФЭ не вызывает увеличения площади ТПА ($0.09 \pm 0.01 \text{ мм}^2$) и частоты СПД, которая составляет $89.7 \pm 7.0\%$ от контрольного значения ($p < 0.05$, $n = 5$), однако вызывает небольшое смещение ТПА ($1.2 \pm 0.2 \text{ мм}$, $n = 5$, рис. 5з), которое наблюдается как при формировании невозбудимой зоны ($n = 2$), так и без нее ($n = 3$); небольшое смещение ТПА не направлено в сторону устья верхней поллой вены.

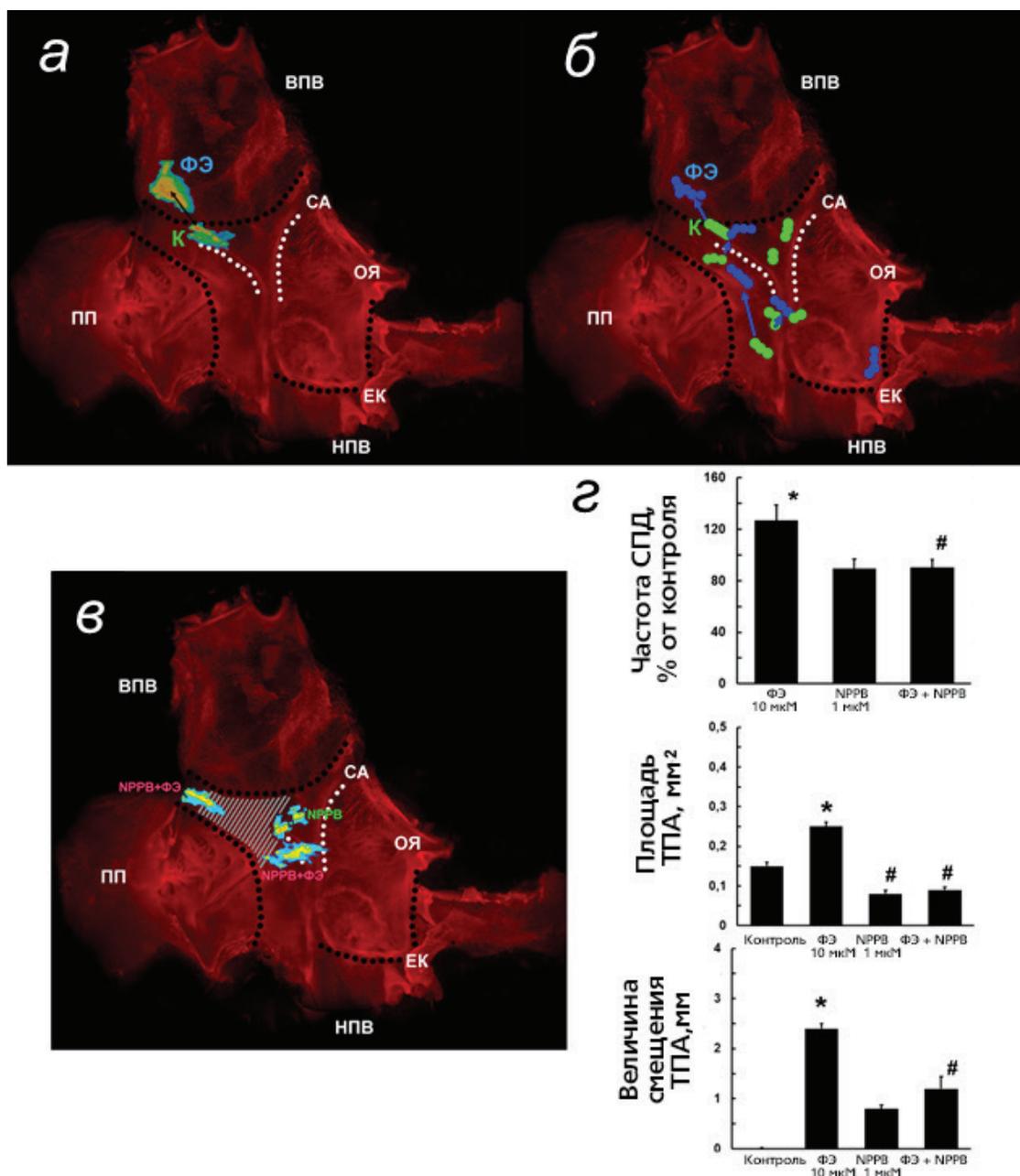


Рис. 5. Паттерн активации САУ крысы при стимуляции α_1 -адренорецепторов (α_1 -АР) в контрольных условиях и при действии блокатора хлорной проводимости NPPB. *а* — Репрезентативные примеры активации САУ в контроле (К) и при действии фенилэфрина (ФЭ). Показана локализация и площадь точки первичной активации (*, ТПА), а также направление смещения ТПА (стрелка) при действии ФЭ. *б* — Точки первичной активации САУ в контроле (К, показаны зеленым) и при действии ФЭ (показаны синим). Смещение ТПА в направлении устья верхней полой вены для каждого эксперимента показано стрелкой. *в* — Репрезентативный пример паттерна активации САУ при действии NPPB, а также действия ФЭ на фоне NPPB. NPPB вызывает формирование в САУ невозбудимой зоны (показано штриховкой) и смещение ТПА за пределы невозбудимой зоны. На фоне NPPB не происходит увеличения площади ТПА при действии ФЭ. *г* — Частота спонтанных ПД (сверху), площадь ТПА (в центре), а также величина смещения ТПА (снизу) в тканевых препаратах САУ при действии ФЭ и NPPB, * — статистически значимое ($p < 0.05$) отличие от контроля, # — статистически значимое ($p < 0.05$) отличие от ФЭ, однофакторная ANOVA с поправкой на множественное сравнение Tukey. ВПВ — верхняя полая вена, ПП — ушко правого предсердия и пограничный гребешок (отграничено черным пунктиром), НПВ — нижняя полая вена, ОЯ — овальная ямка, ЕК — Евстахийев клапан, СА — рудиментарный гребешок синоатриального клапана (показано белым пунктиром); устья полых вен отграничены черным пунктиром.

ОБСУЖДЕНИЕ

В представленной работе продемонстрирована экспрессия $\alpha 1$ -адренорецепторов в ткани ритмоводителя сердца крысы — синоатриальном узле. Экспрессия $\alpha 1$ -АР подтверждена на уровне белка, а также на уровне мРНК. Экспрессия транскриптов $\alpha 1$ -АР в ткани САУ ниже, чем в предсердном миокарде, тем не менее этот уровень статистически значим. Известно, что кардиомиоциты САУ имеют меньшие размеры, чем кардиомиоциты рабочего предсердного или желудочкового миокарда. Кроме того, САУ богат соединительной тканью и клетками немиокардиального типа, интеркалирующими между кардиомиоцитами. Иммунофлуоресцентное исследование позволило установить, что сигналы, соответствующие $\alpha 1$ -АР, обнаруживаются на периферии ядер отдельных мелких клеток, которые разбросаны в окрестностях ветвей артерии САУ, то есть в том участке правого предсердия, который включает именно пейсмекерный миокард. Характер флуоресцентных сигналов позволяет предположить, что $\alpha 1$ -АР локализируются именно в пейсмекерных кардиомиоцитах. Сниженный, по сравнению с предсердным, уровень экспрессии $\alpha 1$ -АР может быть обусловлен двумя причинами: значительной долей немиокардиальных элементов в САУ, а также гетерогенностью популяции пейсмекерных кардиомиоцитов, включающих не экспрессирующие $\alpha 1$ -АР клетки.

Подтвердив экспрессию $\alpha 1$ -АР в САУ, мы продемонстрировали, что стимуляция $\alpha 1$ -АР приводит к увеличению ритма изолированного сердца крысы, а также увеличению частоты спонтанных ПД, возникающих в тканевых препаратах синоатриального узла. Таким образом, по меньшей мере у крысы активация $\alpha 1$ -АР приводит к положительному хронотропному эффекту. Следует отметить, что в наших экспериментах положительный хронотропный эффект при активации $\alpha 1$ -АР сопровождается смещением (иначе «миграцией») точки первичной активации в САУ в направлении устья верхней полой вены. Миграция ТПА в САУ является одним из механизмов регуляции ритма сердца, а увеличение ЧСС связывают со смещением ТПА в направлении верхней полой вены [36–38].

Известно, что положительный хронотропный эффект, наблюдаемый при повышении уровня циркулирующего адреналина, увеличении активности симпатического отдела вегетативной нервной системы, высвобождении норадреналина реализуется посредством активации адренорецепторов β -типа [39]. Увеличение ЧСС, обусловленное $\alpha 1$ -адренергическим компонентом, вероятно,

будет маскировано или будет незначимым *in vivo* при одновременной активации $\alpha 1$ - и β -АР. Следует отметить, что флуоресцентные сигналы, соответствующие $\alpha 1$ -АР, обнаруживаются на периферии ядер клеток в САУ. Возможно, что эти сигналы соответствуют кластерам т.н. ядерных $\alpha 1$ -АР. Известно, что эффекты, обусловленные активацией этого пула рецепторов, отставлены во времени от момента высвобождения норадреналина на несколько минут (1–5 мин) [40], поскольку происходит только после трансмембранного переноса норадреналина из внеклеточной среды в цитоплазму кардиомиоцитов и транслокации в примембранную область протеинкиназ семейства PKC и Src [41]. Таким образом, роль $\alpha 1$ -АР в САУ может заключаться в поддержании высокого уровня ЧСС в период времени, соответствующий началу десенситизации β -АР [42, 43]. Однако функциональные эксперименты, выполненные в данной работе, позволяют предположить, что роль $\alpha 1$ -АР в САУ может сводиться не столько в отставленном «дублировании» эффектов β -АР, но в «подстройке» электрофизиологических свойств САУ, облегчающих активацию рабочего миокарда при высокой частоте сердечных сокращений.

В наших экспериментах установлено, что фенилэфрин приводит к уменьшению ВВФСУ и кВВФСУ, а также способствует ускорению аккомодации САУ. Однако этот эффект наблюдается только при высокой частоте электрической стимуляции САУ и не является значимым в том случае, когда навязываемый ритм стимуляции является низким. Таким образом, при активации $\alpha 1$ -АР способность САУ к автоматии «облегчается»; уменьшается время, необходимое для установления стационарной спонтанной автоматической активности САУ при высокой ЧСС.

Известно, что профиль экспрессии ионных каналов в центральной части САУ и на его периферии различается. Например, мелкие кардиомиоциты центральной части САУ лишены натриевых ионных каналов Nav1.5 и ионного тока I_{Na} , тогда как в периферических пейсмекерных кардиомиоцитах эти каналы и ток обнаруживаются. Одной из причин возрастания ВВФСУ/кВВФСУ при увеличении частоты электрической стимуляции САУ является повышение цитоплазматической концентрации ионов Na^+ ($[Na^+]_i$) в кардиомиоцитах периферии в результате индукции в них электрически вызванных ПД. Повышение $[Na^+]_i$ тем больше, чем выше частота стимуляции и частота электрически вызванных ПД. Увеличение $[Na^+]_i$ приводит к стимуляции Na^+ , K^+ -АТФ-азы, гиперполяризации мембраны, снижению скорости медленной диастолической

деполяризации и торможению спонтанной активности в электрически сопряженных пейсмекерных кардиомиоцитах центральной части САУ. Гиперполяризующее действие периферических кардиомиоцитов сопровождается снижением скорости проведения возбуждения из центральной части САУ к его периферии и может приводить к подавлению спонтанной активности на период времени, соответствующий длительности нескольких спонтанных кардиоциклов.

Роль $\alpha 1$ -АР в САУ может заключаться в уменьшении гиперполяризующего влияния периферии на пейсмекерные кардиомиоциты центральной части САУ и в поддержании проведения возбуждения в переходной зоне между тканью, генерирующей ритм, и рабочим миокардом предсердий при высокой ЧСС.

Известно, что $\alpha 1$ -АР посредством внутриклеточного сигнального каскада Gq/PLC/IP3 приводят к увеличению концентрации ионов Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) и активации РКС [44]. В наших экспериментах установлено, что блокада РКС не приводит к подавлению эффектов $\alpha 1$ -АР в САУ, то есть не отменяет увеличения ЧСС, а также снижения ВВФСУ и кВВФСУ, вызванного фенилэфрином. Таким образом, РКС, вероятно, не вовлечена в $\alpha 1$ -адренергическую регуляцию функциональной активности САУ.

Механизмы феноменов, наблюдаемых при активации $\alpha 1$ -АР в гладкой мускулатуре исследованы в значительной степени. Известно, что деполяризация и вазоконстрикция гладкомышечных клеток при активации $\alpha 1$ -АР обусловлена увеличением $[Ca^{2+}]_i$, активацией хлорных каналов разного типа и увеличением хлорной проводимости [32, 33]. Поскольку в кардиомиоцитах экспрессируется целый ряд хлорных ионных каналов и обменников, ионные механизмы опосредующие эффекты активации $\alpha 1$ -АР в гладкомышечных клетках и миокарде, могут быть сходными [34]. Известно, что в кардиомиоцитах обнаруживаются Ca^{2+} -управляемые хлорные каналы [45, 46].

Таким образом, повышение $[Ca^{2+}]_i$ при активации $\alpha 1$ -АР может приводить к увеличению трансмембранного хлорного тока, обусловленного Ca^{2+} -зависимыми хлорными каналами [47]. Деполяризующий эффект усиления хлорной проводимости может быть значим на периферии САУ в условиях смещения мембранного потенциала к более негативным значениям, чем хлорный равновесный потенциал [48]. Как указано выше, увеличение ЧСС или СПД вызывает гиперполяризацию в результате активации Na^+ , K^+ -АТР-азы. Возможно, что $\alpha 1$ -АР-зависимое усиление хлорной проводимости

предотвращает гиперполяризацию на периферии САУ или в областях миокарда, демонстрирующих свойства латентного пейсмекера, способствует облегчению проведения волны возбуждения от пейсмекерных кардиомиоцитов к рабочему миокарду при высокой ЧСС.

В наших экспериментах блокада хлорных каналов приводила к подавлению эффектов фенилэфрина в САУ, увеличению кВВФСУ, которое было зависимо от частоты возбуждения. Важно, что при действии ФЭ на фоне NPPB после прекращения стимуляции автоматия САУ возобновлялась так же медленно как в контроле, а кроме того, восстановление автоматической активности происходило ступенчато. Такой характер изменения ритма указывает на значительное, быстрое смещение точки первичной активации в миокарде правого предсердия, которое возможно при кратковременном возникновении в пейсмекерном миокарде зон функциональной невозбудимости [49]. В наших экспериментах установлено, что NPPB действительно вызывает формирование невозбудимой зоны в САУ, а также предотвращает смещение ТПА при действии ФЭ в область миокарда, прилегающую к устью верхней полой вены. Известно, что хлорная составляющая ионного тока I_{to} , типичного для рабочего миокарда всех млекопитающих, является кальций-зависимой [46]. Вероятно, хлорная проводимость в САУ также может обеспечиваться именно кальций-зависимыми хлорными каналами.

В совокупности, результаты наших экспериментов позволяют предположить, что хлорные каналы участвуют в реализации автоматии САУ, а также вовлечены в $\alpha 1$ -адренергическую модуляцию электрофизиологических свойств ритмоводителя сердца. Вероятно, $\alpha 1$ -АР миокарда межвенной области правого предсердия критически важны для поддержания пейсмекерной функции САУ при частоте сердечных сокращений, близкой к максимальной.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант РНФ 22–15–00189).

Соответствие принципам этики. Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chandler N., Greener I., Tellez J., Inada S., Musa H., Molenaar P., DiFrancesco D., Baruscotti M., Longhi R., Anderson R., Billeter R., Sharma V., Sigg D., Boyett M., Dobrzynski H. 2009. Molecular architecture of the human sinus node insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation*. **119** (12), 1562–1575.
2. Lakatta E., Maltsev V., Vinogradova T. 2010. A Coupled SYSTEM of intracellular Ca²⁺ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circ. Res.* **106** (4), 659–673.
3. Keith A., Flack M. 1907. The form and nature of the muscular connections between the primary divisions of the vertebrate heart. *J. Anat. Physiol.* **41** (3), 172–189.
4. James T. 1961. Anatomy of the human sinus node. *Anat. Rec.* **141** (2), 109–139.
5. Dobrzynski H., Li J., Tellez J., Greener I., Nikolski V., Wright S., Parson S., Jones S., Lancaster M., Yamamoto M., Honjo H., Takagishi Y., Kodama I., Efimov I., Billeter R., Boyett M. 2005. Computer three-dimensional reconstruction of the sinoatrial node. *Circulation*. **111** (7), 846–854.
6. Boyett M., Honjo H., Kodama I. 2000. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc. Res.* **47** (4), 658–687.
7. Fahrenbach J., Mejia-Alvarez R., Banach K. 2007. The relevance of non-excitable cells for cardiac pacemaker function. *J. Physiol.* **585** (2), 565–578.
8. Кузьмин В.С., Каменский А.А. 2021. Молекулярные механизмы онтогенеза ритмоводителя сердца у позвоночных животных. *Вестник МГУ. Серия 16. Биология.* **76** (4), 183–201.
9. Csepe T., Kalyanasundaram A., Hansen B., Zhao J., Fedorov V. 2015. Fibrosis: A structural modulator of sinoatrial node physiology and dysfunction. *Front. Physiol.* **6**, 1–9.
10. Csepe T., Zhao J., Hansen B., Li N., Sul L., Lim P., Wang Y., Simonetti O., Kilic A., Mohler P., Janssen P., Fedorov V. 2016. Human sinoatrial node structure: 3D microanatomy of sinoatrial conduction pathways. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **120** (1–3), 164–178.
11. Kamkin A., Kiseleva I., Wagner K., Pylaev A., Leiterer K., Theres H., Scholz H., Günther J., Isenberg G., 2002. A possible role for atrial fibroblasts in postinfarction bradycardia. *Am.J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **282** (3), H842–849.
12. Dobrzynski H., Boyett M., Anderson R. 2007. New insights into pacemaker activity: Promoting understanding of sick sinus syndrome. *Circulation*. **115** (14), 1921–1932.
13. Fedorov V., Schuessler R., Hemphill M., Ambrosi C., Chang R., Voloshina A., Brown K., Hucker W., Efimov I. 2009. Structural and functional evidence for discrete exit pathways that connect the canine sinoatrial node and atria. *Circ. Res.* **104** (7), 915–923.
14. Fedorov V., Glukhov A., Chang R. 2012. Conduction barriers and pathways of the sinoatrial pacemaker complex: Their role in normal rhythm and atrial arrhythmias. *Am.J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **302** (9), 1773–1783.
15. MacDonald E., Rose R., Quinn T. 2020. Neurohumoral control of sinoatrial node activity and heart rate: Insight from experimental models and findings from humans. *Front. Physiol.* **11**, 1–26.
16. Saito K., Suetsugu T., Oku Y., Kuroda A., Tanaka H. 1994. α 1-Adrenoceptors in the conduction system of rat hearts. *Br.J. Pharmacol.* **111** (2), 465–468.
17. Michel M., Hanft G., Groß G. 1994. Functional studies on α 1-adrenoceptor subtypes mediating inotropic effects in rat right ventricle. *Br.J. Pharmacol.* **111** (2), 539–546.
18. Коротаева Ю.В., Циркин В.И. 2015. Альфа2-адренорецепторы миокарда. *Изв. Коми научного центра УРО РАН.* **2** (22), 57–64.
19. Motiejunaite J., Amar L., Vidal-Petiot E. 2021. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. **82** (3–4), 193–197.
20. Saitoh H., Nomura A., Osaka M., Sasabe N., Atarashi H., Hayakawa H. 1995. Developmental changes of α 1-adrenergic chronotropic action on human sinus node. *Am.J. Cardiol.* **76** (1–2), 89–91.
21. Posner P., Baney R., Prestwich K. 1984. The electrophysiological actions of phenylephrine on the rabbit S-A node. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **44** (2), 315–318.
22. Hewett, K., Rosen M. 1985. Developmental changes in the rabbit sinus node action potential and its response to adrenergic agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **235** (2), 308–312.
23. Hashimoto K., Chiba S., Hashimoto K. 1971. Negative chronotropic response to phenylephrine of the canine S-A node. *Tohoku J. Exp. Med.* **105** (1), 1–9.
24. Khabibrakhmanov I., Ziyatdinova N., Khisamieva L., Krulova A., Zefirov T. 2019. Age-related features influence of alpha (1) — adrenoceptor stimulation on isolated rat heart. *Biosci. Biotechnol. Res. Commun.* **12** (5), 351–354.
25. Khabibrakhmanov I., Ziyatdinova N., Kuptsova A., Zefirov T. 2018. Effect of α 1A-adrenergic receptors stimulation to the isolated rat hearts. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.* **9** (525), 525–529.
26. Mommersteeg M., Domínguez J., Wiese C., Norden J., De Gier-De Vries C., Burch J., Kispert A., Brown N., Moorman A., Christoffels V. 2010. The sinus venosus progenitors separate and diversify from the first and second heart fields early in development. *Cardiovasc. Res.* **87** (1), 92–101.
27. Ivanova A., Filatova T., Abramochkin D., Atkinson A., Dobrzynski H., Kokaeva Z., Merzlyak E., Pustovit K., Kuzmin V. 2021. Attenuation of inward rectifier potassium current contributes to the α 1-adrenergic receptor-induced proarrhythmicity in the caval vein myocardium. *Acta Physiol.* **231** (4), 1–17.
28. Ivanova A., Kuzmin V. 2018. Inhibition of inward rectifier potassium currents by chloroquine causes significant electrophysiological changes in the rat thoracic veins

- myocardium. *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естествозн.* **160** (4), 645–653.
29. Ivanova A., Kuzmin V. 2018. Electrophysiological characteristics of the rat azygos vein under electrical pacing and adrenergic stimulation. *J. Physiol. Sci.* **68** (5), 617–628.
 30. Kuzmin V., Ivanova A., Potekhina V., Samoiloa D., Ushenin K., Shvetsova A., Petrov A. 2021. The susceptibility of the rat pulmonary and caval vein myocardium to the catecholamine-induced ectopy changes oppositely in postnatal development. *J. Physiol.* **599** (11), 2803–2821.
 31. Pustovit K., Samoiloa D., Abramochkin D., Filatova T., Kuzmin V. 2022. $\alpha 1$ -adrenergic receptors accompanied by GATA4 expression are related to proarrhythmic conduction and automaticity in rat interatrial septum. *J. Physiol. Biochem.* **78** (4), 793–805.
 32. Gould D., Hill C. 1996. α -Adrenoceptor activation of a chloride conductance in rat iris arterioles. *Am.J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **271** (40), 2469–2476.
 33. Lamb F., Kooy N., Lewis S. 2000. Role of Cl⁻ channels in α -adrenoceptor-mediated vasoconstriction in the anesthetized rat. *Eur. J. Pharmacol.* **401** (3), 403–412.
 34. Duan D. 2013. Phenomics of cardiac chloride channels. *Compr. Physiol.* **3** (2), 667–692.
 35. Ramteke V., Tandan S., Kumar D., Aruna Devi R., Shukla M., Ravi Prakash V. 2009. Increased hyperalgesia by 5-nitro-2, 3-(phenylpropylamino)-benzoic acid (NPPB), a chloride channel blocker in crush injury-induced neuropathic pain in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **91** (3), 417–422.
 36. Glukhov A., Fedorov V., Anderson M., Mohler P., Efimov I. 2010. Functional anatomy of the murine sinus node: High-resolution optical mapping of ankyrin-B heterozygous mice. *Am.J. Physiol. — Hear. Circ. Physiol.* **299** (2), 482–491.
 37. Abramochkin D., Kuzmin V., Sukhova G., Rosenshtraukh L. 2009. Modulation of rabbit sinoatrial node activation sequence by acetylcholine and isoproterenol investigated with optical mapping technique. *Acta Physiol.* **196** (4), 385–394.
 38. Lang D., Petrov V., Lou Q., Osipov G., Efimov I. 2011. Spatiotemporal control of heart rate in a rabbit heart. *J. Electrocardiol.* **44** (6), 626–634.
 39. Chakraborti S., Chakraborti T., Shaw G. 2000. β -Adrenergic mechanisms in cardiac diseases: A perspective. *Cell Signal.* **12** (8), 499–513.
 40. Ivanova A., Filatova T., Abramochkin D., Atkinson A., Dobrzynski H., Kokaeva Z., Merzlyak E., Pustovit K., Kuzmin V. 2021. Attenuation of inward rectifier potassium current contributes to the $\alpha 1$ -adrenergic receptor-induced proarrhythmicity in the caval vein myocardium. *Acta Physiol.* **231** (4), 1–17.
 41. Wu S., O'Connell T. 2015. Nuclear compartmentalization of a $\beta 1$ -adrenergic receptor signaling in adult cardiac myocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **65** (2), 91–100.
 42. Roth N., Campbell P., Caron M., Lefkowitz R., Lohse M. 1991. Comparative rates of desensitization of β -adrenergic receptors by the β -adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88** (14), 6201–6204.
 43. Mahmood A., Ahmed K., Zhang Y. 2022. β -Adrenergic receptor desensitization/down-regulation in heart failure: A friend or foe? *Front. Cardiovasc. Med.* **9** (July), 1–5.
 44. Motiejunaite J., Amar L., Vidal-Petiot E. 2021. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. **82** (3–4), 193–197.
 45. Berg J., Yang H., Jan L. 2012. Ca²⁺-activated Cl⁻ channels at a glance. *J. Cell Sci.* **125** (6), 1367–1371.
 46. Hume J., Duan D., Collier M., Yamazaki J., Horowitz B. 2000. Anion transport in heart. *Physiol. Rev.* **80** (1), 31–81.
 47. Burashnikov A., Antzelevitch C. 1999. Differences in the electrophysiologic response of four canine ventricular cell types to $\alpha 1$ -adrenergic agonists. *Cardiovasc. Res.* **43** (4), 901–908.
 48. Duan D. 2009. Phenomics of cardiac chloride channels: The systematic study of chloride channel function in the heart. *J. Physiol.* **587** (10), 2163–2177.
 49. Tapilina S., Abramochkin D., Sukhova G., Rosenshtraukh L. 2010. Cholinergic inexcitability in the sinoatrial node of the mouse. *Dokl. Biol. Sci.* **435** (1), 393–397.

α 1-Adrenergic Receptors Control the Activity of Sinoatrial Node by Modulating Transmembrane Transport of Chloride Anions

© 2024 г. Y. A. Voronina^{1, 2, *}, A. V. Fedorov¹, M. A. Chelombitko³, U. E. Piunova¹, V. S. Kuzmin^{1, 2}

¹Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119234 Russia

²National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov, Moscow, 121552 Russia

³Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119992 Russia

*e-mail: voronina.yana.2014@post.bio.msu.ru

Norepinephrine (NE), which is released by sympathetic nerve endings, causes an increase in the frequency of spontaneous action potentials in the pacemaker cardiomyocytes of the sinoatrial node (SAN), also known as the “pacemaker” of the heart. This results in an increase in heart rate (HR). It is known that two types of postsynaptic adrenoceptors (ARs), α 1-AR and β -AR, can mediate the effects of NE. The role of α 1-AR in the sympathetic control of heart rate and SAN automaticity, as well as the membrane mechanisms mediation the effects of α 1-AR on the pacemaker, have not yet been elucidated. In this study, we utilized immunofluorescence confocal microscopy to examine the distribution of α 1A-AR in the SAN of rats. Additionally, we assessed the expression of α 1A-AR mRNA in the SAN tissue using RT-PCR. Furthermore, we investigated the impact of α 1-AR stimulation on key functional parameters of the pacemaker, including the corrected sinus node recovery time (SNRT/cSNRT) and the SAN accommodation, using the Langendorff perfused heart technique. We also used optical mapping of the electrical activity of perfused, isolated tissue preparations to study the effect of α 1-AR stimulation on the spatiotemporal characteristics of SAN excitation. We tested the effects of chloride transmembrane conductance blockade on alteration of functional parameters and pattern of SAN excitation caused by α 1-AR. Fluorescent signals corresponding to α 1A-AR have been identified in SAN cardiomyocytes, indicating the presence of α 1A-AR at protein level. The expression of α 1A-AR in SAN has been also confirmed at the mRNA level. The stimulation of α 1-AR affects SAN functioning Phenylephrine (PHE) utilized as α 1A-AR agonist causes a decrease in SNRT/cSNRT, as well as an acceleration of SAN accommodation. These effects were rate dependent and were observed at a high frequency of pacemaker tissue stimulation. PHE induces changes in the excitation pattern of the SAN. The effects of PHE on functional parameters and SAN excitation pattern are attenuated by Ca²⁺-dependent chloride channel blocker NPPB but remains unaffected by the protein kinase C inhibitor BIM. Our results suggest that cardiac α 1-ARs are important for maintaining function of SAN pacemaker at high heart rates and that α 1-AR signalling cascades in the SAN target Ca²⁺-dependent chloride channels are involved in the α 1-adrenergic modulation of the electrophysiological properties of the heart pacemaker.

Keywords: cardiac pacemaker, automaticity, sinoatrial node, α 1 adrenergic receptors, chloride transmembrane conductance, chloride ion channels

УДК 578.233

АКТИВАЦИЯ ГИСТАМИНОМ СОРБЦИИ ФАКТОРА КОМПЛЕМЕНТА C3/C3b НА ПОВЕРХНОСТИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК КАК ОДНА ИЗ ПРИЧИН ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ COVID-19

© 2024 г. П. П. Авдонин^а, Ю. В. Маркитантова^а, Е. Ю. Рыбакова^а, Н. В. Гончаров^б,
П. В. Авдонин^{а, *}

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

^бИнститут эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

*e-mail: pvavdonin@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.09.2023 г.

Подписана в печать 18.10.2023 г.

Принята к публикации 19.10.2023 г.

Повреждение эндотелия в результате активации системы комплемента является одной из причин тромботических осложнений при COVID-19. Ключевую роль в этом процессе играет фактор C3. Присоединение к мембране продукта его протеолиза C3b инициирует начало формирования мембраноатакующего комплекса C5b-9, образующего пору в плазматической мембране и гибель клетки. В настоящей работе мы исследовали, каким образом гистамин, секретируемый в организме в местах локального воспаления лейкоцитами и тучными клетками, может повлиять на связывание C3b с эндотелиальными клетками (ЭК). Для его визуализации были использованы конъюгированные с FITS антитела против C3c фрагмента. Данные антитела связываются с интактным C3 и с C3b, но не с C3a. Мы показали, что при инкубации плазмы крови человека с культивируемыми ЭК из пупочной вены человека происходит накопление фактора C3/C3b в виде округлых локальных и диффузных очагов на поверхности клеточного монослоя. Предварительная активация ЭК гистамином увеличивает количество мест прикрепления C3/C3b. Эти данные позволяют предполагать, что гистамин способен усиливать повреждение эндотелиального слоя при гиперактивации системы комплемента при COVID-19 и эндотелиопатиях, вызванных другими заболеваниями.

Ключевые слова: комплемент, эндотелиальные клетки, COVID-19, фактор C3, гистамин, мембраноатакующий комплекс

Список сокращений: МАК – мембраноатакующий комплекс; MASP-2 – сериновая протеаза-2, ассоциированная с связывающим маннозу белком; ЭК – эндотелиальные клетки; фВБ – фактор Виллебранда; HUVEC – эндотелиальные клетки из пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells).

DOI: 10.31857/S0233475524010051, **EDN:** zmbcfc

ВВЕДЕНИЕ

Повреждение эндотелия в результате гиперактивации системы комплемента является одной из главных причин тромботических осложнений при COVID-19 и таких заболеваниях, как атипичный гемолитикоуремический синдром [1–7]. Комплемент представляет собой эволюционно древнюю врожденную систему иммунитета. Он включает в себя несколько десятков белковых факторов [8]. Часть из них — это протеазы. Классический путь активации комплемента начинается после связывания иммуноглобулина

G (IgG) или иммуноглобулина M (IgM) с антигенами чужеродного объекта. Далее белок комплемента C1 присоединяется к домену CH2 молекулы IgG или домену CH3 молекулы Ig M. После этого запускается каскад протеолитических реакций, который завершается формированием многокомпонентного мембраноатакующего комплекса (МАК), состоящего из факторов C5b, C6, C7, C8 и C9 и образующего пору в мембране микроорганизмов или собственных поврежденных клеток (рис. 1).

Помимо классического, система комплемента может активироваться по альтернативному

и лектиновому путям, но во всех случаях ключевую роль играет фактор С3 (рис. 1). Протеолиз С3 представляет собой точку схождения всех путей активации комплемента. При протеолизе С3 расщепляется на две части — анафилотоксин С3а и фактор С3b. Последний присоединяется к биологическим поверхностям — стенкам микроорганизмов, к собственным клеткам, межклеточному веществу за счет образования ковалентных связей с гидроксильными и аминогруппами углеводов и белковых молекул [9]. После прикрепления С3b в комплексе с другими факторами запускает дальнейший процесс активации комплемента, приводящий к формированию МАК. Кроме того, опсонизация проникших в кровь микроорганизмов фактором С3b делает их доступными мишенями для фагоцитоза. В нормальных условиях в здоровых клетках организма срабатывают регуляторные механизмы, предотвращающие активацию комплемента на следующих этапах после сорбции С3b.

Функция С3b в протеолитическом каскаде реакций активации комплемента заключается в расщеплении (конвертации) фактора С5. При классическом и лектиновом путях С5-конвертаза представляет собой комплекс С4b2a3b. При альтернативном пути С3b взаимодействует с фактором В с образованием сначала С3-конвертазы (С3bBb) и запуском петли амплификации альтернативного пути, т.е. расщепления С3 до С3а и С3b. Далее новообразованный С3b и С3bBb объединяются в комплекс С3bBbС3b. Он уже начинает работать как С5-конвертаза, расщепляющая неактивный фактор С5 до анафилактического пептида С5а и белка С5b. Как уже отмечено выше, к С5b на мембране последовательно присоединяются факторы С6, С7, С8 и С9. В итоге формируется мембраноатакующий комплекс (МАК) С5b-9 — крупная пора, нарушающая целостность мембраны бактерий [2].

Кроме уничтожения инородных биологических объектов система комплемента осуществляет удаление собственных отмирающих или зараженных клеток организма хозяина. При патологических состояниях, связанных с гиперактивностью системы комплемента [1–7], клетки эндотелия кровеносных сосудов могут восприниматься комплементом как чужеродные, что приводит к повреждению сосудистой стенки, тромбообразованию и нарушению кровообращения в целом. Образование МАК на поверхности эндотелия зависит от присутствия в плазме крови активных факторов комплемента — прежде всего С3b, от функционального состояния фактора Н и других регуляторных компонентов этой системы, а также от состояния ЭК, т.е. от их способности сорбировать фактор С3b и другие факторы комплемента на своей поверхности [10,

11]. На активность ЭК влияет множество гормонов, нейромедиаторов, ростовых факторов, продуктов превращения арахидоновой кислоты и т.д., которые потенциально могут влиять на экспонирование участков связывания факторов комплемента с клеточной поверхностью.

Целью работы было исследовать, каким образом активация ЭК гистамином влияет на присоединение к ним фактора С3b. Гистамин является мощным активатором клеток эндотелия. В организме этот биогенный амин вырабатывается тучными клетками и базофилами [12, 13], а также лимфоцитами [14]. Действуя через рецепторы Н1 и Н2, гистамин вызывает в ЭК увеличение концентрации ионов кальция в цитоплазме [15, 16] и синтез сАМР [17] соответственно. В качестве объекта исследования были выбраны культивируемые ЭК из пупочной вены человека (HUVES — human umbilical vein endothelial cells). Используя флуоресцентно окрашенные антитела, мы показали, что гистамин активирует присоединение С3/С3b к поверхности HUVES.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

HUVES выделяли согласно методу, описанному ранее [18]. Клетки выращивали в покрытых желатином пластиковых флаконах в среде М199 с солями Эрла и 20 мМ HEPES, содержащей 20% фетальной телячьей сыворотки (Invitrogen, США). К среде добавляли фактор роста эндотелия (300 мкг/мл), выделенный из мозга кролика, 100 мкг/мл гепарина и смесь антибиотиков (пенициллин со стрептомицином). Использовали клетки ранних пассажей (2–4). Для пассирования HUVES применяли аккутазу® (SigmaAldrich, США).

Для определения связывания фактора С3b с клетками их пересаживали в 48-луночный планшет. HUVES трижды отмывали от среды роста физиологическим солевым раствором (ФСР, рН 7.4), содержащим NaCl (145), KCl (5), HEPES (10), MgCl₂ (1), CaCl₂ (1), глюкозу (10 мМ). Далее HUVES инкубировали 10 мин при комнатной температуре в отсутствие или в присутствии 100 мкМ гистамина, трижды отмывали ФСР и инкубировали 2 ч с ФСР и 20% плазмы крови здорового донора при 35°C. Плазму получали из крови, взятой из локтевой вены с антикоагулянтом, содержащим цитрат натрия. После инкубации клетки отмывали холодным фосфатным солевым буфером (ФСБ) и фиксировали холодным 3% параформальдегидом в течение 25 мин. Клетки отмывали 3 раза раствором ФСБ, инкубировали 45 мин с 2% раствором бычьего сывороточного альбумина в ФСБ и далее в течение ночи инкубировали при

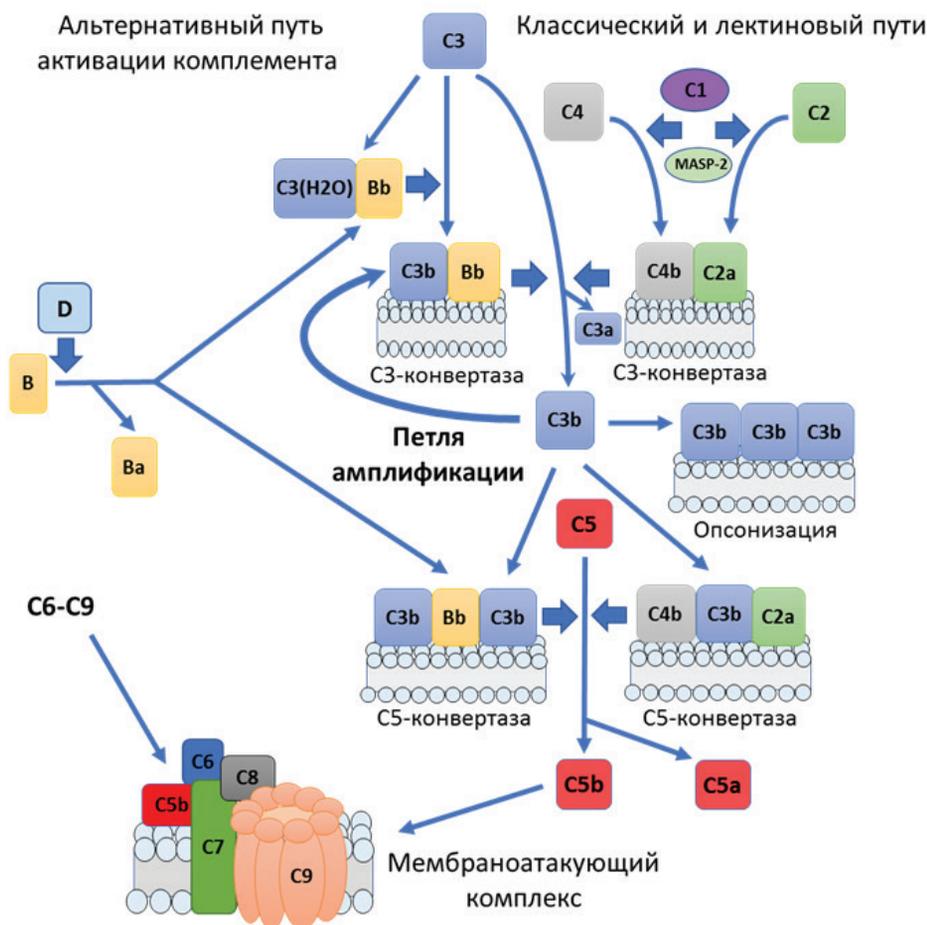


Рис. 1. Пути активации комплемента. Жирными стрелками обозначены места протеолиза факторов комплемента. MASP-2 — сериновая протеаза-2, ассоциированная с связывающим маннозу белком (mannose-binding protein-associated serine protease).

4°C с разведенными в 100 раз поликлональными FITS-конъюгированными антителами, специфичными к C3c (DAKO, F0201). C3c — это следующий после C3b продукт протеолитического расщепления фактора C3. Антитела против C3c связываются с C3 и C3b и не связываются с C3a [19]. Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000 (Leica, Германия) с использованием объектива 10×, диодного осветителя с длиной волны 488 нм и флуоресцентного фильтра L5 ET (Leica).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Excel 10. Достоверность отличий оценивали согласно *t*-критерию Стьюдента для независимых выборок. Каждое значение представляет собой среднее 6 независимых измерений ± стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс активации системы комплемента по альтернативному пути с небольшой скоростью идет в организме постоянно [20]. При этом образующийся в плазме в небольших количествах C3b ковалентно связывается с биологической поверхностью, где он инактивируется либо запускает в комплексе с фактором Bb петлю амплификации альтернативного пути (рис. 1). В последнем случае идет локальное накопление C3b с переходом к следующему этапу активации системы комплемента. В нормальных условиях работа системы комплемента направлена на инактивацию появляющихся в крови в небольшом количестве чужеродных микроорганизмов, на удаление отмирающих клеток, однако при ее избыточной активности может происходить повреждение нормальных клеток

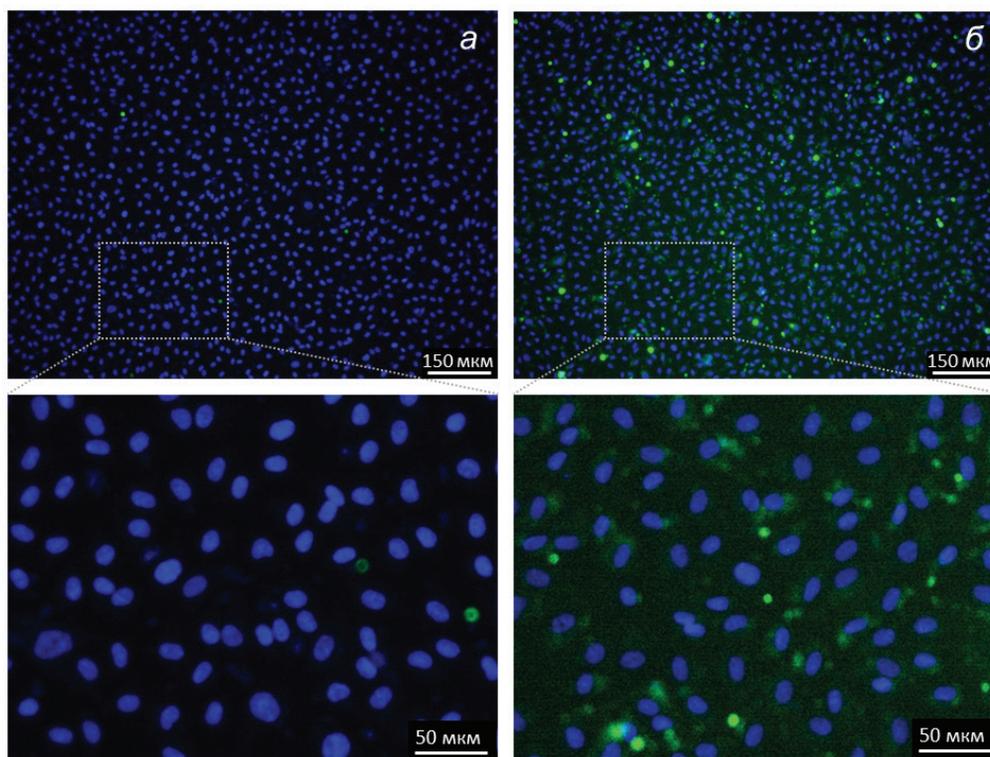


Рис. 2. Связывание фактора комплемента C3/C3b с HUVEC после инкубации их плазмой крови человека. *а* — Клетки инкубировали с ФСР без плазмы; *б* — в течение 2 ч HUVEC инкубировали с разведенной в 3 раза в ФСР плазмой крови здорового донора. Ядра окрашены Hoechst 33342.

и тканей. В такой ситуации объектом повреждения в числе первых становится эндотелий сосудов.

Взаимодействие комплемента с эндотелием можно оценивать в модельных экспериментах *ex vivo* при инкубации культивируемых клеток эндотелия с плазмой крови человека [20]. Мы проводили определение иммобилизованного на поверхности HUVEC фактора C3/C3b с помощью FITS-меченых антител. Используемые нами антитела активно применяются для визуализации фактора C3b на клетках [3, 10], но они могут связываться также с интактным фактором C3, но не с C3a. Поэтому, строго говоря, мы не можем исключить, что помимо C3b при флуоресцентной микроскопии мы получаем также изображение сорбированного на HUVEC интактного C3. Поэтому мы используем обозначение C3/C3b.

На рис. 2*а* показаны клетки HUVEC, которые инкубировали 2 ч в среде ФСР без добавления плазмы, и клетки, которые инкубировали с разведенной в 3 раза в среде ФСР плазмой крови человека (рис. 2*б*). По плотности расположения ядер видно, что HUVEC образуют сплошной монослой. После инкубации HUVEC с плазмой крови на поверхности клеток происходит сорбция фактора комплемента C3/C3b. Иммунопозитивные

структуры имеют вид округлых пятен диаметром в несколько микрон, наиболее крупные из которых сопоставимы по размерам с клеточными ядрами. Общее количество ярких пятен в поле зрения составляло около трех десятков. Помимо яркоокрашенных округлых пятен на HUVEC после инкубации с плазмой можно увидеть участки диффузного окрашивания клеток антителами, а также большое количество более бледных округлых пятен (рис. 2*б*). На поверхности контрольных клеток иммунопозитивных структур в виде пятен было многократно меньше — при внимательном рассмотрении можно увидеть несколько слабоокрашенных антителами пятен (рис. 2*а*). Диффузные иммунопозитивные структуры на поверхности контрольных клеток полностью отсутствовали. Мы предполагаем, что участки окрашивания фактора C3/C3b, которые выглядят как округлые пятна, — это места, где происходит запуск петель амплификации альтернативного пути активации комплемента, локальная генерация C3b и его аккумуляция на HUVEC.

На рис. 3 показано влияние гистамина на связывание C3/C3b с HUVEC. Видно, что после инкубации клеток с гистамином число участков клеточной поверхности, окрашенных FITS-мечеными

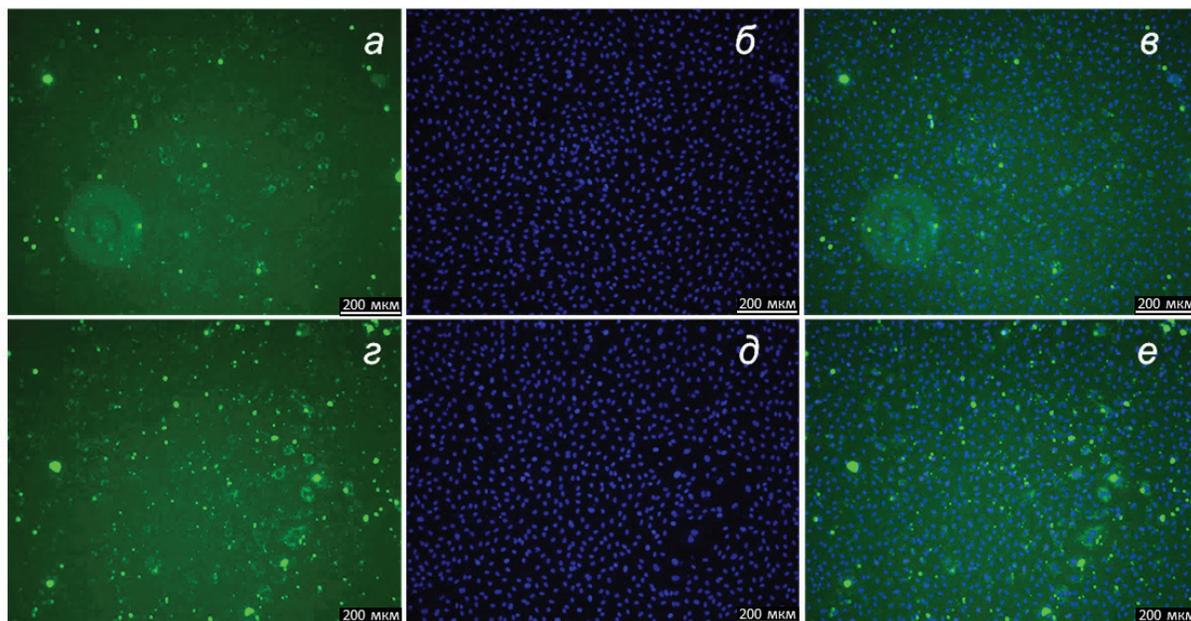


Рис. 3. Иммунофлуоресцентное окрашивание фактора C3/C3b и клеточных ядер в контрольных HUVEC (*a, б, в*) и в HUVEC, активированных гистамином (*г, д, е*). *a, г* — Клетки, окрашенные FITC-мечеными антителами против C3/C3b; *б, д* — ядра клеток, окрашенные с помощью Hoechst 33342; *в* — наложение изображений *a* и *б*, *е* наложение изображений *г* и *д*. Клетки 10 мин инкубировали в ФСР в отсутствие (*a, в*) или в присутствии 100 мкМ гистамина (*б, г*). После этого отмывали от гистамина и инкубировали в течение 2 ч в ФСР с разведенной в 3 раза плазмой крови здорового донора.

антителами, значительно возрастает. Для количественной оценки действия гистамина была использована программа CellProfiler. При анализе проводился подсчет иммунопозитивных структур разной степени яркости и количества ядер в поле зрения для определения числа клеток. Количество окрашенных антителами против C3/C3b пятен в пересчете на число клеток в отсутствие гистамина составляло чуть более 3 на 10 клеток (рис. 4*a*). После 10-минутной инкубации HUVEC с гистамином количество окрашенных антителами участков клеточной поверхности возрастало в 1.7 ± 0.2 раза.

Основным источником фактора поступления C3 в плазму крови являются печень, однако известно, что в эндотелии также происходит синтез этого фактора комплемента, где он может расщепляться до C3b и экспонироваться на ЭК [21]. С помощью программы CellProfiler было определено количество окрашенных антителами участков в клетках, которые инкубировали без плазмы. Оно составило менее 1% от числа участков экспонирования C3/C3b в HUVEC после инкубации в присутствии плазмы, причем в условиях без плазмы гистамин не увеличивал количество окрашенных частиц (рис. 4*б*).

Присоединение C3/C3b из плазмы крови человека к поверхности культивируемых ЭК показано в работах Noris и соавт. [10]. Этими авторами была продемонстрирована количественная связь между содержанием в плазме фактора C3b и его сорбцией на поверхности культивируемых ЭК. На основе этого метода ими предложен тест для оценки состояния системы комплемента при гемолитикоуремическом синдроме. Наши исследования говорят о том, что количество фактора C3/C3b, присоединяющегося к мембране, зависит не только от содержания его в плазме, но и от количества посадочных мест на клетках. Как показали результаты представленного эксперимента (рис. 3, 4), плотность участков связывания C3/C3b увеличивается при активации клеток гистамином. Присоединение C3b к поверхности клеток приводит к следующему этапу активации комплемента — образованию C5-конвертазы, расщепляющего фактор C5 до C5b и C5a. При этом можно ожидать, что для данного процесса характерно самоусиление, поскольку высвобождение анафилактического пептида C5a будет стимулировать секрецию гистамина находящимися рядом базофилами и тучными клетками [12, 13].

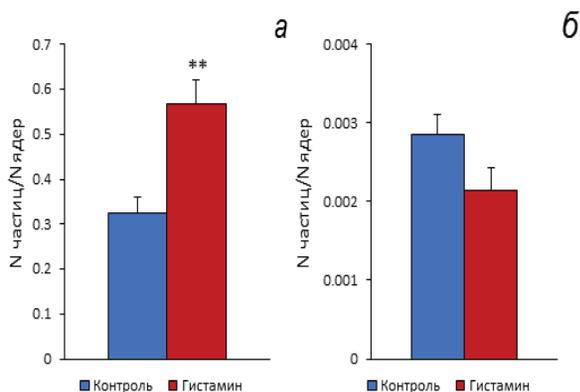


Рис. 4. Влияние гистамина на присоединение фактора С3/С3b к HUVEC. Клетки инкубировали с разведенной в 3 раза в ФСР плазмой крови (а) или в ФСР без плазмы (б). Показано среднее количество участков отложения С3/С3b в пересчете на одну клетку без инкубации с гистамином или после предварительной активации HUVEC гистамином. Приведены результаты 6 независимых измерений (** $p < 0.01$).

Вопрос о том, каким образом гистамин стимулирует сорбцию С3/С3b на мембране HUVEC, требует дальнейшего изучения. Нам представляется наиболее вероятным сценарий, согласно которому под влиянием гистамина на мембране HUVEC увеличивается количество участков, по которым происходит ковалентное присоединение С3b к клеткам. С3b и С3а постоянно образуются в плазме крови в результате протеолиза С3 так называемой жидкофазной С3-конвертазой (рис. 1а). Эта ферментативная активность появляется у фактора С3 после спонтанного гидролиза в его молекуле тиоэфирной связи. Изоформа фактора С3 с гидролизованной внутренней тиоэфирной связью носит название С3(Н₂О). В С3b сохраняется внутренняя тиоэфирная связь. Ее разрыв сопровождается образованием ковалентной эфирной связи с гидроксильными или аминогруппами углеводных остатков гликопротеинов на поверхности клеток [22]. В качестве посадочного места на HUVEC могут выступать фактор Виллебранда (фВБ) и Р-селектин. Bettoni и соавт. [1] показали, что С3b присоединяется к экспонированной на мембране ЭК молекуле фВБ по трем А-доменам его мономера, но сборка активной С5-конвертазы и запуск альтернативного пути активации комплемента с расщеплением С5 и формированием С5b-9 происходит на домене А2. В свою очередь, группа Del Conde продемонстрировала способность Р-селектина связывать С3b и инициировать активацию комплемента [23].

Известно, что гистамин вызывает экзоцитоз телец Вейбеля–Паладе, содержащих фВБ и Р-селектин, и таким образом увеличивает экспонирование этих гликопротеинов на поверхности ЭК [24–27]. Помимо образования ковалентных связей с гидроксильными и аминогруппами поверхностных гликопротеинов и углеводов, С3b может нековалентно связываться с фактором Н, с мембранным кофакторным белком (МСР или CD46) [28, 29]. В ряде клеток организма человека (В- и Т-лимфоцитах, моноцитах, макрофагах, нейтрофилах, эритроцитах и эпителиальные клетках клубочков) экспрессируется специфический рецептор С3b — CR1/CD35, однако в ЭК данный рецептор отсутствует [30].

Можно предположить, что, помимо присоединения к HUVEC фактора С3/С3b из плазмы крови, на поверхности клеток происходит активация системы комплемента и локальная генерация С3b. Ранее было показано, что активация комплемента по альтернативному пути может происходить на апоптозных клетках HUVEC, отрывающихся от монослоя [31]. Установлено, что при этом С3b присоединяется к клеткам за счет образования эфирных и амидных связей с мембранными белками. Помимо альтернативного, на ЭК может происходить активация классического пути комплемента. Этот путь запускается после связывания первого компонента системы комплемента С1q со своим рецептором на мембране ЭК — gC1qR/p33. Активация комплемента по классическому пути происходит на HUVEC при апоптозе, вызванном гипоксией/реоксигенацией [32, 33] и при воздействии на клетки напряжения сдвига [34]. При классическом пути так же, как и при альтернативном, происходит накопление на мембране фактора С3b.

При коронавирусной инфекции у умерших больных на поверхности эндотелия капилляров легких, печени и почек выявлено отложение факторов комплемента Вb, С1q, С4, С3 и С5b-9, что указывает на активацию комплемента по классическому и альтернативному путям [35]. Маркеры лектинового пути MBL и MASP-2 в легких практически не обнаруживались. В сосудах головного мозга повреждение эндотелия у больных COVID-19 происходит в результате активации комплемента по классическому пути [36]. Есть данные о запуске N-белком коронавируса SARS-CoV-2 лектинового пути активации комплемента [37]. Как уже отмечено выше, точкой конвергенции всех путей активации системы комплемента является образование активного компонента С3b (рис. 1) в результате протеолиза фактора С3. С3b присоединяется к ЭК сосудов и запускает финальные этапы процесса формирования мембраноатакующего комплекса

C5b-9. Увеличение связывания C3b с эндотелием под влиянием гистамина должно усиливать этот процесс и оказывать дополнительное отягощающее действие при тромботических осложнениях у больных с коронавирусной инфекцией.

Действительно, клинические данные свидетельствуют о вкладе гистамина в патогенез коронавирусной инфекции. Вирус SARS-CoV-2 активирует секрецию гистамина тучными клетками [38]. Гистамин, в свою очередь, способствует цитокиновому шторму и усиливает воспалительные реакции. Напротив, при подавлении действия гистамина течение болезни становится более благоприятным. По данным Hogan и соавт. [39], применение блокаторов H1 и H2 рецепторов цетиризина (cetirizine) и фамотидина (famotidine) у тяжелых и крайне тяжелых больных COVID-19 на 15.5% снижало смертность и уменьшало продолжительность госпитализации. В эксперимента *ex vivo* мы показали, что гистамин усиливает активацию комплемента на HUVEC. Исходя из этих результатов, мы предполагаем, что при COVID-19 гистамин также способствует гиперактивации системы комплемента, повреждению сосудистого эндотелия и развитию тромботических осложнений. Такой эффект гистамина представляет еще одно звено в патогенетическом механизме коронавирусной инфекции.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21–15–00441).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bettoni S., Galbusera M., Gastoldi S., Donadelli R., Tentori C., Sparta G., Bresin E., Mele C., Alberti M., Tortajada A., Yebenes H., Remuzzi G., Noris M. 2017. Interaction between multimeric von Willebrand factor and complement: A fresh look to the pathophysiology of microvascular thrombosis. *J. Immunol.* **199**, 1021–1040. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601121>
- Blasco M., Guillen-Olmos E., Diaz-Ricart M., Palomo M. 2022. complement mediated endothelial damage in thrombotic microangiopathies. *Front Med (Lausanne)*. **9**, 811504. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.811504>
- Noris M., Benigni A., Remuzzi G. 2020. The case of complement activation in COVID-19 multiorgan impact. *Kidney Int.* **98**, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.05.013>
- Cugno M., Meroni P.L., Gualtierotti R., Griffini S., Grovetti E., Torri A., Lonati P., Grossi C., Borghi M.O., Novembrino C., Boscolo M., Uceda Renteria S.C., Valenti L., Lamorte G., Manunta M., Prati D., Pesenti A., Blasi F., Costantino G., Gori A., Bandera A., Tedesco F., Peyvandi F. 2021. Complement activation and endothelial perturbation parallel COVID-19 severity and activity. *J. Autoimmun.* **116**, 102560. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102560>
- Ge X., Yu Z., Guo X., Li L., Ye L., Ye M., Yuan J., Zhu C., Hu W., Hou Y. 2023. Complement and complement regulatory proteins are upregulated in lungs of COVID-19 patients. *Pathol. Res. Pract.* **247**, 154519. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154519>
- Marchetti M. 2020. COVID-19-driven endothelial damage: complement, HIF-1, and ABL2 are potential pathways of damage and targets for cure. *Ann. Hematol.* **99**, 1701–1707. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-04138-8>
- Perico L., Benigni A., Casiraghi F., Ng L.F.P., Renia L., Remuzzi G. 2021. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat. Rev. Nephrol.* **17**, 46–64. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-00357-4>
- Arbore G., Kemper C., Kolev M. 2017. Intracellular complement — the complosome — in immune cell regulation. *Mol. Immunol.* **89**, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.05.012>
- Boudhabhay I., Grunenwald A., Roumenina L.T. 2021. Complement C3 deposition on endothelial cells revealed by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* **2227**, 97–105. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1016-9_9
- Noris M., Galbusera M., Gastoldi S., Macor P., Banterla F., Bresin E., Tripodo C., Bettoni S., Donadelli R., Valoti E., Tedesco F., Amore A., Coppo R., Ruggenenti P., Gotti E., Remuzzi G. 2014. Dynamics of complement activation in aHUS and how to monitor eculizumab therapy. *Blood.* **124**, 1715–1726. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-558296>
- Noris M., Mescia F., Remuzzi G. 2012. STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nat. Rev. Nephrol.* **8**, 622–633. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2012.195>
- Ponomaryov T., Payne H., Fabritz L., Wagner D.D., Brill A. 2017. Mast cells granular contents are crucial for deep vein thrombosis in mice. *Circ. Res.* **121**, 941–950. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311185>
- Borriello F., Iannone R., Marone G. 2017. histamine release from mast cells and basophils. *Handb. Exp. Pharmacol.* **241**, 121–139. https://doi.org/10.1007/164_2017_18
- Schmutzler W., Bolsmann K., Zwadlo-Klarwasser G. 1995. Comparison of histamine release from human blood monocytes, lymphocytes, adenoidal and skin

- mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **107**, 194–196. <https://doi.org/10.1159/000236974>
15. Hamilton K.K., Sims P.J. 1987. Changes in cytosolic Ca²⁺ associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine. Study of microcarrier cell monolayers using the fluorescent probe indo-1. *J. Clin. Invest.* **79**, 600–608. <https://doi.org/10.1172/JCI112853>
 16. Ryan U.S., Avdonin P.V., Posin E.Y., Popov E.G., Danilov S.M., Tkachuk V.A. 1988. Influence of vasoactive agents on cytoplasmic free calcium in vascular endothelial cells. *J. Appl. Physiol.* **65**, 2221–2227. <https://doi.org/10.1152/jappl.1988.65.5.2221>
 17. Hekimian G., Cote S., Van Sande J., Boeynaems J.M. 1992. H2 receptor-mediated responses of aortic endothelial cells to histamine. *Am.J. Physiol.* **262**, H220–H224. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1992.262.1.H220>
 18. Goncharov N.V., Sakharov I., Danilov S.M., Sakandelidze O.G. 1987. Use of collagenase from the hepatopancreas of the Kamchatka crab for isolating and culturing endothelial cells of the large vessels in man. *Biull. Eksp. Biol. Med.* **104**, 376–378.
 19. Galbusera M., Noris M., Gastoldi S., Bresin E., Mele C., Breno M., Cuccarolo P., Alberti M., Valoti E., Piras R., Donadelli R., Vivarelli M., Murer L., Pecoraro C., Ferrari E., Perna A., Benigni A., Portalupi V., Remuzzi G. 2019. An ex vivo test of complement activation on endothelium for individualized eculizumab therapy in hemolytic uremic syndrome. *Am.J. Kidney Dis.* **74**, 56–72. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.11.012>
 20. Meuleman M.S., Duval A., Fremeaux-Bacchi V., Roumenina L.T., Chauvet S. 2022. Ex vivo test for measuring complement attack on endothelial cells: From research to bedside. *Front. Immunol.* **13**, 860689. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.860689>
 21. West E.E., Kemper C. 2023. Complosome — the intracellular complement system. *Nat. Rev. Nephrol.* **19**, 426–439. <https://doi.org/10.1038/s41581-023-00704-1>
 22. Law S.K.A., Levine R.P. 1919. The covalent binding story of the complement proteins C3 and C4 (I) 1972–1981. *Immunobiology.* **224**, 827–833. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.08.003>
 23. Del Conde I., Cruz M.A., Zhang H., Lopez J.A., Afshar-Kharghan V. 2005. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J. Exp. Med.* **201**, 871–879. <https://doi.org/10.1084/jem.20041497>
 24. Esposito B., Gambarà G., Lewis A.M., Palombi F., D'Alessio A., Taylor L.X., Genazzani A.A., Ziparo E., Galione A., Churchill G.C., Filippini A. 2011. NAADP links histamine H1 receptors to secretion of von Willebrand factor in human endothelial cells. *Blood.* **117**, 4968–4977. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-266338>
 25. Avdonin P.V., Rybakova E.Y., Avdonin P.P., Trufanov S.K., Mironova G.Y., Tsitrina A.A., Goncharov N.V. 2019. VAS2870 inhibits histamine-induced calcium signaling and vWF secretion in human umbilical vein endothelial cells. *Cells.* **8** (2), 196. <https://doi.org/10.3390/cells8020196>
 26. Avdonin P.P., Trufanov S.K., Rybakova E.Y., Tsitrina A.A., Goncharov N.V., Avdonin P.V. 2021. The use of fluorescently labeled ARC1779 aptamer for assessing the effect of H₂O₂ on von Willebrand factor exocytosis. *Biochemistry (Mosc).* **86**, 123–131. <https://doi.org/10.1134/S0006297921020012>
 27. Jones D.A., Abbassi O., McIntire L.V., McEver R.P., Smith C.W. 1993. P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. *Biophys. J.* **65**, 1560–1569. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81195-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81195-0)
 28. Schramm E.C., Roumenina L.T., Rybkine T., Chauvet S., Vieira-Martins P., Hue C., Maga T., Valoti E., Wilson V., Jokiranta S., Smith R.J., Noris M., Goodship T., Atkinson J.P., Fremeaux-Bacchi V. 2015. Mapping interactions between complement C3 and regulators using mutations in atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood.* **125**, 2359–2369. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-609073>
 29. McNearney T., Ballard L., Seya T., Atkinson J.P. 1989. Membrane cofactor protein of complement is present on human fibroblast, epithelial, and endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **84**, 538–545. <https://doi.org/10.1172/JCI114196>
 30. Alexander J.J., He C., Adler S., Holers V.M., Quigg R.J. 1997. Characterization of C3 receptors on cultured rat glomerular endothelial cells. *Kidney Int.* **51**, 1124–1132. <https://doi.org/10.1038/ki.1997.155>
 31. Tsuji S., Kaji K., Nagasawa S. 1994. Activation of the alternative pathway of human complement by apoptotic human umbilical vein endothelial cells. *J. Biochem.* **116**, 794–800. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124598>
 32. Collard C.D., Vakeva A., Bukusoglu C., Zund G., Sperati C.J., Colgan S.P., Stahl G.L. 1997. Reoxygenation of hypoxic human umbilical vein endothelial cells activates the classic complement pathway. *Circulation.* **96**, 326–333. <https://doi.org/10.1161/01.cir.96.1.326>
 33. Mold C., Morris C.A. 2001. Complement activation by apoptotic endothelial cells following hypoxia/reoxygenation. *Immunology.* **102**, 359–364. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01192.x>
 34. Yin W., Ghebrehiwet B., Weksler B., Peerschke E.I. 2007. Classical pathway complement activation on human endothelial cells. *Mol. Immunol.* **44**, 2228–2234. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.11.012>
 35. Macor P., Durigutto P., Mangogna A., Bussani R., De Maso L., D'Errico S., Zanon M., Pozzi N., Meroni P.L., Tedesco F. 2021. Multiple-organ complement deposition on vascular endothelium in COVID-19 patients. *Biomedicines.* **9**, 1003. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081003>

36. Maicu S.I., Tatomir A., Cuevas J., Rus V., Rus H. 2023. COVID, complement, and the brain. *Front Immunol.* **14**, 1216457. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1216457>
37. Gao T., Zhu L., Liu H., Zhang X., Wang T., Fu Y., Li H., Dong Q., Hu Y., Zhang Z., Jin J., Liu Z., Yang W., Liu Y., Jin Y., Li K., Xiao Y., Liu J., Zhao H., Liu Y., Li P., Song J., Zhang L., Gao Y., Kang S., Chen S., Ma Q., Bian X., Chen W., Liu X., Mao Q., Cao C. 2022. Highly pathogenic coronavirus N protein aggravates inflammation by MASP-2-mediated lectin complement pathway overactivation. *Signal Transduct. Target Ther.* **7**, 318. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01133-5>
38. Conti P., Caraffa A., Tete G., Gallenga C.E., Ross R., Kritas S.K., Frydas I., Younes A., Di Emidio P., Ronconi G. 2020. Mast cells activated by SARS-CoV-2 release histamine which increases IL-1 levels causing cytokine storm and inflammatory reaction in COVID-19. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* **34**, 1629–1632. <https://doi.org/10.23812/20-2EDIT>
39. Hogan Ii R.B., Hogan Iii R.B., Cannon T., Rappai M., Studdard J., Paul D., Dooley T.P. 2020. Dual-histamine receptor blockade with cetirizine — famotidine reduces pulmonary symptoms in COVID-19 patients. *Pulm Pharmacol Ther.* **63**, 101942. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2020.101942>

Activation of Complement Factor C3/C3b Deposition on the Surface of Endothelial Cells by Histamine As one of the Causes of Endothelium Damage in COVID-19

© 2024 г. П. П. Авдонин¹, Ю. В. Маркитантова¹, Е. Ю. Рыбакова¹, Н. В. Гончаров², П. В. Авдонин^{1, *}

¹Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

²Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia

*e-mail: pvavdonin@yandex.ru

Damage of the endothelium as a result of activation of the complement system is one of the causes of thrombotic complications in COVID-19. Factor C3 plays a key role in this process. The attachment of its proteolytic product C3b to the cells initiates the formation of the membrane attack complex C5b-9, which forms a pore in the plasma membrane and cell death. Here, we investigated how histamine, secreted in the body by leukocytes and mast cells, can affect the binding of C3b to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). To visualize it, FITS-conjugated antibodies against the C3c were used. These antibodies bind to intact C3 and to C3b but not to C3a. We have shown that when cultured HUVECs are incubated with human blood plasma, factor C3/C3b accumulates in the form of rounded and diffuse foci on the surface of the endothelial cell monolayer. Pre-activation of HUVEC by histamine increases the number of C3/C3b attachment sites. These data suggest that histamine may enhance endothelial damage during complement hyperactivation in COVID-19 and in endotheliopathies caused by other diseases.

Keywords: complement, endothelial cells, COVID-19, factor C3, histamine, membrane attack complex

УДК 576.5

МОДУЛЯЦИЯ АДГЕЗИИ И МИГРАЦИИ КЛЕТОК NIH/3T3 В КОЛЛАГЕНОВЫХ МАТЕРИАЛАХ ПРОИЗВОДНЫМИ ТАКСИФОЛИНА

© 2024 г. Ю. В. Шаталин^a, М. И. Кобякова^{a, b}, В. С. Шубина^{a, *}

^aИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

^bИнститут клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, 630060 Россия

*e-mail: shubinavictoria@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.09.2023 г.

Подписана в печать 20.09.2023 г.

Принята к публикации 21.09.2023 г.

Одной из актуальных задач тканевой инженерии является разработка стабильных нетоксичных материалов, поддерживающих миграцию клеток в процессе регенерации ткани. Данное исследование направлено на получение новых гелевых материалов на основе коллагена и производных таксифолина, пентаглутарата таксифолина и конъюгата таксифолина с глиоксалевой кислотой и изучение их свойств. В работе было показано, что увеличение доли полифенолов в геле приводит к уменьшению скорости деградации материала. Полученные материалы не оказывают негативного влияния на жизнеспособность фибробластов мыши линии NIH/3T3. Клетки прикрепляются к поверхности материалов и распластаются на поверхности материала, содержащего пентаглутарат таксифолина. Было также установлено, что фибробласты мигрируют через полученные материалы. Увеличение доли конъюгата таксифолина с глиоксалевой кислотой в материале приводит к ингибированию миграции через материал, тогда как увеличение доли пентаглутарата таксифолина в материале, напротив, приводит к значительному увеличению миграции клеток через него. Полученные результаты указывают на возможность модуляции адгезии и миграции клеток в биоматериалах путем включения различных производных таксифолина в их состав. Таким образом, материалы, полученные на основе коллагена и производных таксифолина, могут представлять интерес для регенеративной медицины.

Ключевые слова: конъюгат таксифолина с глиоксалевой кислотой, пентаглутарат таксифолина, коллаген, деградация, жизнеспособность фибробластов, адгезия, миграция

DOI: 10.31857/S0233475524010062, EDN: zlbkxh

ВВЕДЕНИЕ

Проблема ожогов является одной из самых серьезных на сегодняшний день [1]. Эффективность заживления ран зависит от нескольких факторов, в том числе размера, глубины, местоположения, инфицирования и пр. Хотя на данный момент в клинической практике применяются различные ранозаживляющие материалы, нет четкого алгоритма выбора материалов при различных видах ран [2]. Кроме того, с расширением представлений о механизмах заживления ран изменяются требования к разрабатываемым материалам [2]. Следует также отметить, что эффективность ранозаживляющего действия таких покрытий зависит от фазы регенерации и существенно различается

при поражениях различной степени тяжести, что исключает универсальность их применения [3]. Материалы, полученные на основе коллагена, играют важную роль в лечении ран и стимуляции регенеративных процессов [4, 5]. Коллаген является основным белком внеклеточного матрикса [6]. Он продуцируется фибробластами и вовлечен во все фазы регенерации. Данный биополимер нетоксичен, биоразлагаем, обладает низкой иммуногенностью, способствует организации новосинтезированного коллагена [7]. Тем не менее проводятся постоянные исследования, направленные на получение новых материалов на основе данного биополимера. Многие из них нацелены на преодоление высокой скорости биодеградации

материалов, полученных на основе коллагена, а также включение в состав коллагеновой матрицы различных биологически активных соединений (например, антибактериальных средств, таких как цефтазидим и доксициклин [8–10], или соединений, способствующих регенерации ткани [11–13]). Коллагеновая матрица рассматривается как средство адресной доставки биологически активных веществ, из которой соединения высвобождаются постепенно, благодаря чему они способны оказывать пролонгированное действие в зоне повреждения [14–16]. Для стабилизации структуры коллагена и материалов на его основе, полипептидные цепи данного биополимера сшивают. Существуют химические, физические и ферментативные методы сшивки коллагена. Достоинства и недостатки данных методов рассмотрены в следующих обзорах [17, 18]. Можно отметить несколько моментов. Использование кросс-сшивающих агентов позволяет получать материалы с более высокой степенью сшивки и равномерным распределением сшивок внутри материала [18, 19]. Однако при деградации ряда таких материалов в организме могут формироваться токсичные продукты [8, 20–22]. Формирование нетоксичных материалов с улучшенными механическими свойствами возможно в результате непосредственной сшивки карбоксильных групп глутаминовой/аспарагиновой кислот с аминокетонами лизина полипептидных цепей коллагена [23]. Однако в этом случае вовлечение карбоксильных групп глутаминовой кислоты полипептида в формирование сшивки приводит к уменьшению миграции клеток в материале: снижается их прикрепление, распластывание, выживаемость и рост [24]. В последнее время все большую популярность приобретают природные нетоксичные кросс-сшивающие агенты [18], в том числе полифенолы [25–29]. Согласно существующим данным, природные полифенолы стабилизируют структуру коллагена и увеличивают его устойчивость к деградации в биологических системах [25, 30, 31]. Стабилизация структуры полипептидов полифенолами может быть обусловлена как межмолекулярными взаимодействиями (водородные связи, гидрофобные взаимодействия) [27, 32], так и ковалентными связями полипептид — полифенол [22, 27, 33–36]. В частности, в качестве перспективных природных кросс-сшивающих агентов рассматривают генипин [37–40] и полифенол — дубильную кислоту [28, 40, 41].

Мы предположили, что стабилизация коллагена с помощью производных таксифолина, содержащих в своей структуре карбоксильные группы, является рациональным подходом для получения материалов, которые будут более устойчивы

к деградации, чем нативный коллаген. При этом сшивка будет формироваться между карбоксильной группой полифенола и остатками лизина полипептида. Таким образом, карбоксильные группы глутаминовой кислоты боковых цепей полипептида будут оставаться свободными, что является критичным для прикрепления клеток к коллагену и их миграции через материал. Кроме того, материалы на основе коллагена и таксифолина будут постепенно высвобождать активный компонент (полифенол) в области повреждения. Существуют данные, согласно которым флавоноиды [42–44] и их производные [45–47], а также материалы, включающие в свой состав полифенольные соединения [11, 12, 48, 49], способствуют лучшему заживлению ран. В частности, нами было показано, что препараты, полученные на основе конъюгатов таксифолина с карбонильными соединениями — продуктами перекисного окисления липидов, такими как ацетальдегид и малоновый диальдегид, способствуют интенсификации регенерационных процессов и репарации волосяных фолликулов и сальных желез [49]. Целью настоящей работы являлось изучение биосовместимости новых материалов на основе коллагена и производных таксифолина, конъюгата таксифолина с глиоксалевой кислотой (DfTf) и пентаглутарата таксифолина (TfG5) (рис. 1). Основное внимание было сфокусировано на изучении влияния данных материалов на жизнеспособность клеток, оценке способности материалов поддерживать адгезию клеток и изучении миграции клеток через данные материалы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали коллаген (ЗАО “Зеленая Дубрава”, Россия) и таксифолин (96%), любезно предоставленный ЗАО “НПФ “Флавит” (Россия).

Получение гидрогелей на основе коллагена и производных таксифолина. Получение и характеристика конъюгата таксифолина с глиоксалевой кислотой и пентаглутарата таксифолина подробно описаны в работах [50, 51] и [52, 53] соответственно.

Материалы на основе коллагена и производных таксифолина получали следующим образом. К 1 мл 5% водного раствора полифенола добавляли 100 мМ раствор 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолина (DMTMM) [52] в молярном соотношении 1:3. В случае пентаглутарата таксифолина раствор содержал 10% диметилсульфоксида. Затем к 1 мл раствора полифенола добавляли 1 мл 4% раствора коллагена, смесь быстро перемешивали и заливали в подготовленные формы. Для оценки деградации материала смесь заливали в цилиндрические формы диаметром

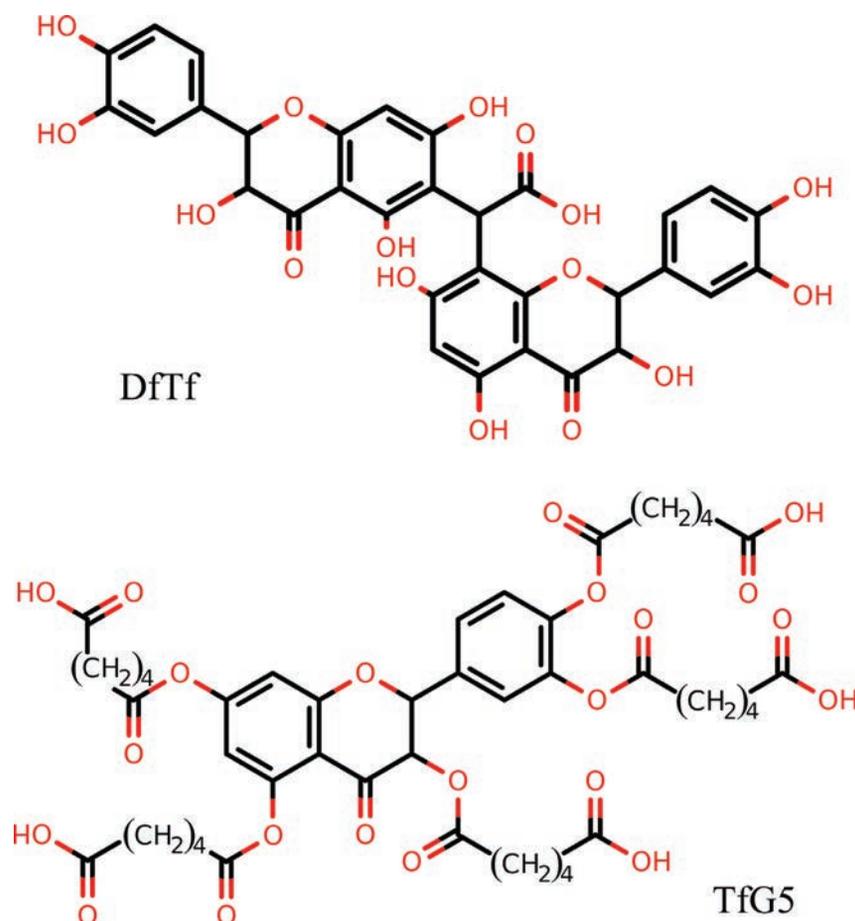


Рис. 1. Полифенолы, используемые для стабилизации коллагена. DfTf — конъюгат таксифолина с глиоксальной кислотой, TfG5 — пентаглутарат таксифолина.

1.5 см и объемом 1 мл. Для оценки влияния материалов на жизнеспособность клеток и миграции клеток через материал 100 мкл смеси наносили на вкладыши с проницаемой мембраной (8 мкм, SPL, Южная Корея) для 24-луночного планшета. Для оценки способности материалов поддерживать адгезию клеток и возможного контактного цитотоксического действия 1 мл смеси помещали в 35-мм чашки Петри (SPL). Концентрация полифенола в геле составляла 0; 0.5; 1.0; и 2.5%, концентрация коллагена — 2%. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом [53].

Доля аминокрупп, участвующих в формировании сшивки. Долю аминокрупп, участвующих в формировании сшивки, определяли по изменению количества терминальных аминокрупп полипептида нингидриновым методом [53]. Для этого 100 мг геля предварительно лиофилизировали, после чего помещали в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (pH 7.4). К полученной суспензии добавляли 25 мкл 0.2% раствора нингидрина в ацетоне. Приготовленный раствор инкубировали при 90 °C в течение 15 мин, охлаждали до комнатной температуры и регистрировали оптическую плотность

супернатанта при 570 нм. Расчет доли аминокрупп, участвующих в формировании поперечных сшивок, проводили по формуле:

$$\text{Доля аминокрупп} = (A_m - A_{cp}) / (A_{np} - A_{cp}) \times 100\%,$$

где A_m — оптическая плотность анализируемого материала; A_{np} — оптическая плотность нативного коллагена; A_{cp} — оптическая плотность коллагена, кросс-сшитого с использованием глиоксальной кислоты.

Анализ деградации материала. Деградацию гелевого материала оценивали по количеству полипептида, перешедшего в раствор в процессе инкубации в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4). Количество полипептида считали эквивалентным количеству терминальных аминокрупп, регистрируемых в растворе нингидриновым методом. К образцу гелевого материала объемом 100 мкл добавляли 1 мл раствора фосфатно-солевого буфера (pH 7.4) и помещали в термостат (37 °C) с орбитальным перемешиванием (100 об/мин). Через определенные промежутки времени отбирали 100 мкл водной фазы, центрифугировали при 10000 об/мин для удаления нерастворимой фракции и определяли количество

аминогрупп в суспензии. Степень деградации определяли по формуле:

$$\text{Степень деградации} = (A_c - A_6)/(A_{np} - A_6) \times 100\%,$$

где A_c – оптическая плотность анализируемой суспензии; A_{np} – оптическая плотность нативного коллагена; A_6 – оптическая плотность буферного раствора.

Динамика высвобождения полифенола из геля.

Для определения динамики высвобождения полифенола из коллагенового геля фрагмент геля объемом 100 мкл помещали в фосфатно-солевой буфер (рН 7.4) объемом 1 мл, после чего смесь помещали в термостат (37 °С) с орбитальным перемешиванием (100 об/мин). Через определенные промежутки времени отбирали 100 мкл водной фазы, центрифугировали при 10000 об/мин для удаления нерастворимой фракции и определяли концентрацию полифенола, перешедшего в раствор, спектрофотометрическим методом. Расчет концентрации полифенола в растворе проводили по среднему коэффициенту экстинкции ($\epsilon_{330} = 3146 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\epsilon_{228} = 5765 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для DfTf и TfG5 соответственно).

Влияние DfTf, TfG5 и материалов, полученных на их основе, на жизнеспособность клеток. В работе использовали эмбриональные мышечные фибробласты N1H 3T3, полученные из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Himedia, Бразилия), 80 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma-Aldrich, США) и 24 мкг/мл флуконазола (Белмедпрепараты, Белоруссия) при 37 °С и 5% CO_2 . Для открепления клеток от поверхности культурального пластика использовали раствор трипсина–EDTA 0.05% (ПанЭко, Россия).

Влияние DfTf и TfG5 на жизнеспособность клеток.

В лунки 96-луночного планшета высевали клетки (15 тыс. клеток/см²) и культивировали в течение 24 ч. Затем к клеткам добавляли полифенолы (DfTf и TfG5) в различных концентрациях (0.0; 0.8; 1.6; 3.1; 6.3; 12.5; 25.0; 50.0; 100.0 мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. Далее оценивали жизнеспособность клеток. Для этого клетки фиксировали 70% этанолом в течение 30 мин, после чего окрашивали 0.5% раствором кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Клетки лизировали раствором 0.1% додецилсульфата натрия, затем измеряли оптическую плотность (A) на микропланшетном ридере Infinite F200 (Tecan, Австрия) при 550 нм. Долю жизнеспособных клеток в присутствии полифенолов определяли следующим образом: Доля клеток, % от контроля = (A клеток,

окрашенных после инкубации с полифенолами / A окрашенных контрольных клеток) × 100%.

Влияние материалов, полученных на основе коллагена и производных таксифолина (DfTf и TfG5), на жизнеспособность клеток. В лунки 24-луночного планшета высевали клетки (15 тыс. клеток/см²) и культивировали в течение 24 ч. Затем в лунки устанавливали вкладыши с проницаемой мембраной (8 мкм), покрытые материалами на основе DfTf и TfG5, и инкубировали еще в течение 24 ч. Далее оценивали жизнеспособность клеток. Для этого клетки фиксировали 70% этанолом в течение 30 мин, затем окрашивали 0.5% раствором кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Клетки лизировали раствором 0.1% додецилсульфата натрия и измеряли оптическую плотность (A) на микропланшетном ридере Infinite F200 (Tecan, Австрия) при 550 нм. Долю жизнеспособных клеток определяли следующим образом: Доля клеток, % от контроля = (A клеток, окрашенных после инкубации с материалами / A окрашенных контрольных клеток) × 100%.

Оценка миграции фибробластов через материалы, полученные на основе коллагена и производных таксифолина (DfTf и TfG5). Материалы готовили на вкладыше с проницаемой мембраной (8 мкм). Клетки (50 тыс. клеток) высевали на поверхность данных материалов и инкубировали в течение 5 ч в среде DMEM/F-12, содержащей 10% ЭТС. В лунки 24-луночного планшета, в которых находились вкладыши, также добавляли среду DMEM/F-12, содержащую 10% ЭТС. Спустя 5 ч инкубации во вкладыше заменяли среду на DMEM/F-12, не содержащую ЭТС, и инкубировали еще 24 ч. После этого клетки, мигрировавшие через материалы, снимали с поверхности лунок 24-луночного планшета и внешней стороны мембраны вкладыша с помощью раствора трипсина–EDTA 0.05% и подсчитывали в камере Горяева. В качестве контроля на вкладыш наносили нативный коллаген. Концентрация полифенола в исследуемых материалах составляла 0; 0.5; 1.0; и 2.5%.

Оценка адгезии и распластывания фибробластов на поверхности полученных материалов. Материалы, содержащие 2.5% полифенола, готовили в 35-мм чашках Петри. Затем на их поверхность высевали клетки (15 тыс. клеток/см²) и инкубировали в течение 24 ч. Далее образцы окрашивали в течение 30 мин Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, США) (5 мкг/мл), пропидий иодидом (Sigma-Aldrich, США) (10 мкг/мл), а также ацетоксиметилловым эфиром кальцеина (кальцеин-AM) (Sigma-Aldrich, США) (100 нМ) и изучали с помощью конфокального микроскопа TCS SP5 (Leica Microsystems,

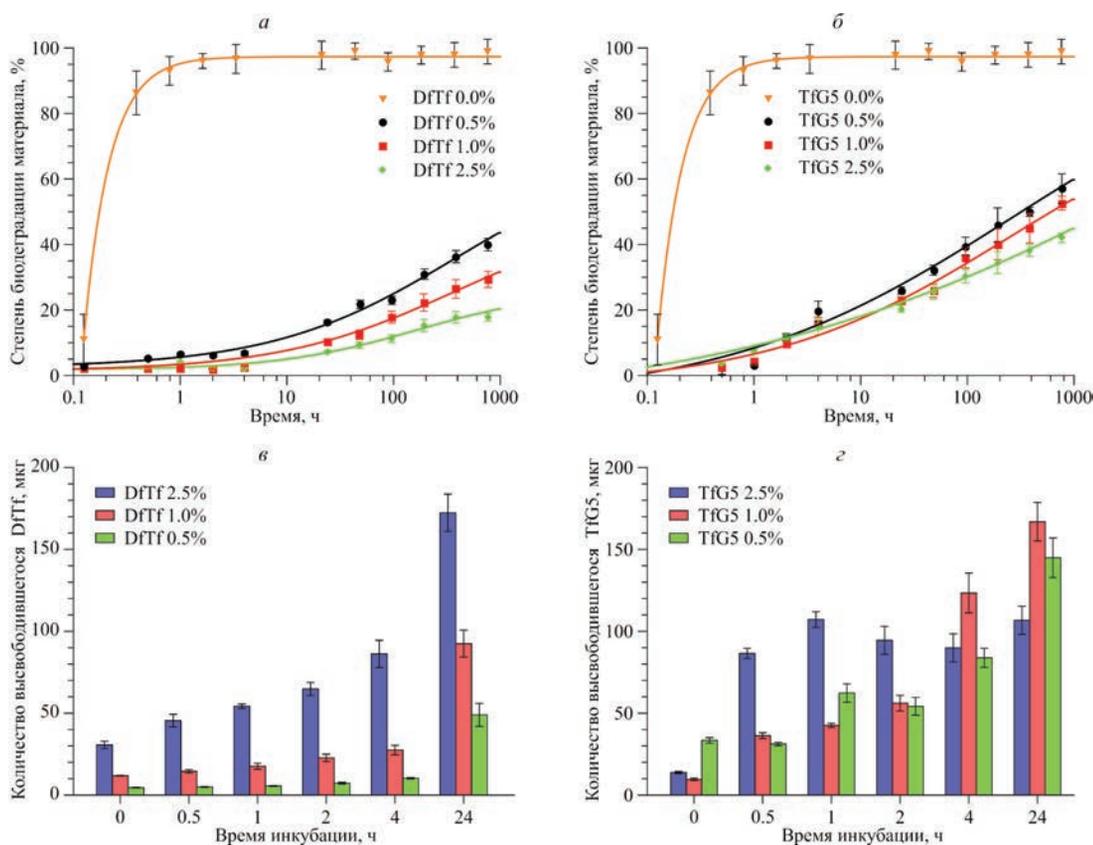


Рис. 2. Характеристика гелевых материалов. а, б — Деградация гелевых материалов, полученных на основе коллагена и полифенолов. в, г — Динамика высвобождения полифенолов из гелевых материалов.

Германия). В качестве контроля на чашки Петри наносили нативный коллаген.

Статистический анализ. Все эксперименты были выполнены в трех независимых повторах. Каждый образец был проанализирован в трех технических повторах. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Сравнение средних значений проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим попарным сравнением с помощью Тьюки-теста. Для расчетов применяли статистический программный пакет GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика полученных материалов. Формирование сшивок между полипептидными цепями осуществлялось с помощью TfG5 и DfTf. DfTf содержит в своей структуре одну карбоксильную группу, тогда как TfG5 содержит пять карбоксильных групп, способных после активации формировать ковалентную связь с аминокетонами белка. Отметим, что полифенолы, по всей видимости,

также могут стабилизировать структуру коллагена за счет нековалентных взаимодействий.

Было показано, что доля аминокетонных групп, участвующих в формировании поперечных сшивок, дозозависимо возрастает с увеличением количества полифенола, введенного в состав материала. Так, доля аминокетонных групп, участвующих в формировании сшивки, составляет 73 ± 7 , 80 ± 3 и $90 \pm 5\%$ при доле DfTf в материале 0.5, 1.0 и 2.5% соответственно. Доля аминокетонных групп, участвующих в формировании сшивки, составляет 69 ± 3 , 73 ± 5 и $78 \pm 4\%$ при доле TfG5 в материале 0.5, 1.0 и 2.5% соответственно. Было установлено, что доля фрагментов полипептида, высвобождающихся в процессе деградации материалов, уменьшается с увеличением доли полифенола в материале (рис. 2а, 2б). Полной деградации материалов на протяжении всего эксперимента не наблюдалось. Было обнаружено, что в процессе деградации материала в окружающую среду высвобождается (биологически активный) полифенол (рис. 2в, 2г).

Влияние DfTf, TfG5 и материалов, полученных на их основе, на жизнеспособность клеток NIH 3T3. Было показано, что DfTf и TfG5 не влияют на жизнеспособность клеток NIH 3T3 во всем диапазоне

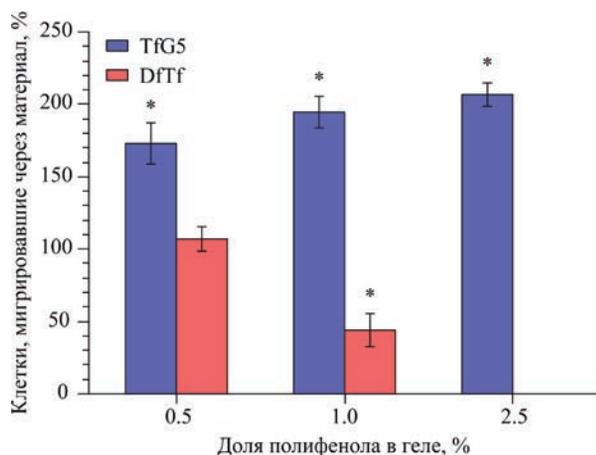


Рис. 3. Миграция фибробластов N1H 3T3 через гелевые материалы. За 100% принимали количество клеток, мигрировавших через нативный коллаген. * Достоверные различия по сравнению с контролем (коллаген), $p < 0.001$.

исследуемых концентраций (0.8–100 мкМ). Изучение влияния материалов на основе DfTf и TfG5 на жизнеспособность клеток проводили без непосредственного контакта клеток с поверхностью материалов. Клетки находились в лунках 24-луночных планшетов, в которые были погружены вкладыши с проницаемой мембраной (8 мкм), покрытые материалами на основе коллагена и производных таксифолина (DfTf и TfG5). Спустя 24 ч инкубации оценивали жизнеспособность клеток. За время инкубации материалы частично деградировали, а продукты их распада переходили в раствор. Было установлено, что во всех образцах количество живых клеток соответствовало контрольным значениям. Таким образом, бесконтактного цитотоксического действия материалов выявлено не было.

Миграция фибробластов через материалы, полученные на основе коллагена и производных таксифолина (DfTf и TfG5). Было обнаружено, что TfG5 способствует миграции клеток через материал. Увеличение доли TfG5 в материале приводит к увеличению числа клеток, мигрировавших через материал (рис. 3). DfTf при его доле в материале 0.5% не влияет на миграцию клеток, тогда как увеличение доли данного полифенола в материале до 1.0% приводит к снижению миграции клеток в среднем на 55%. При доле DfTf в материале 2.5% клеток, мигрировавших через материал, обнаружено не было. За 100% принимали количество клеток, мигрировавших через нативный коллаген.

Для последующей оценки способности материалов поддерживать адгезию клеток и возможного контактного цитотоксического действия были

отобраны материалы, содержащие максимальное количество полифенола (2.5%).

Адгезия и распластывание фибробластов на поверхности полученных материалов. Было установлено, что в процессе культивирования контрольный образец (коллаген, нанесенный на поверхность чашки) полностью деградирует, фибробласты прикрепляются к поверхности чашки и распластываются на ней (рис. 4). Показано, что исследуемые материалы подвергаются частичной деградации. Однако в поле зрения были обнаружены крупные фрагменты геля, которые в дальнейшем изучали с помощью конфокального микроскопа. Несмотря на полное отсутствие миграции клеток через материал, содержащий 2.5% DfTf, было установлено, что фибробласты прикрепляются к поверхности данного материала (рис. 4). Они имеют округлую форму, но сохраняют жизнеспособность. Сканирование образцов в разных плоскостях позволило обнаружить единичные мертвые клетки. Изучение фрагментов геля, содержащего 2.5% TfG5, миграция через который превышала в 2 раза миграцию через контрольный образец (коллаген), показало, что фибробласты прикрепляются к поверхности данного материала и распластываются на ней. Сканирование образцов позволило выявить единичные мертвые клетки.

Таким образом, токсического действия на клетки, вызванного взаимодействием с поверхностью исследуемых материалов, в том числе в местах деградации материалов, выявлено не было.

Полученные результаты говорят о том, что включение производных таксифолина, DfTf и TfG5, в состав коллагеновой матрицы позволяет получать нетоксичные стабильные материалы. О стабилизации структуры коллагена полифенольными соединениями ранее уже сообщалось в литературе [25, 30, 31]. Стабилизация структуры полипептидов полифенолами может быть обусловлена как межмолекулярными взаимодействиями (водородные связи, гидрофобные взаимодействия) [27, 32], так и ковалентными связями полипептид — полифенол [22, 27, 33–36]. В рамках данной работы также установлено, что способность фибробластов к адгезии и распластыванию на поверхности полученных материалов различна. Отличается способность клеток мигрировать через материалы, полученные на основе DfTf и TfG5. Таким образом, полученные данные подчеркивают влияние агента, стабилизирующего структуру коллагена, на свойства полученного материала. Показано, что увеличение доли DfTf в материале приводит к снижению миграции клеток через материал. Увеличение доли полифенола в материале приводит

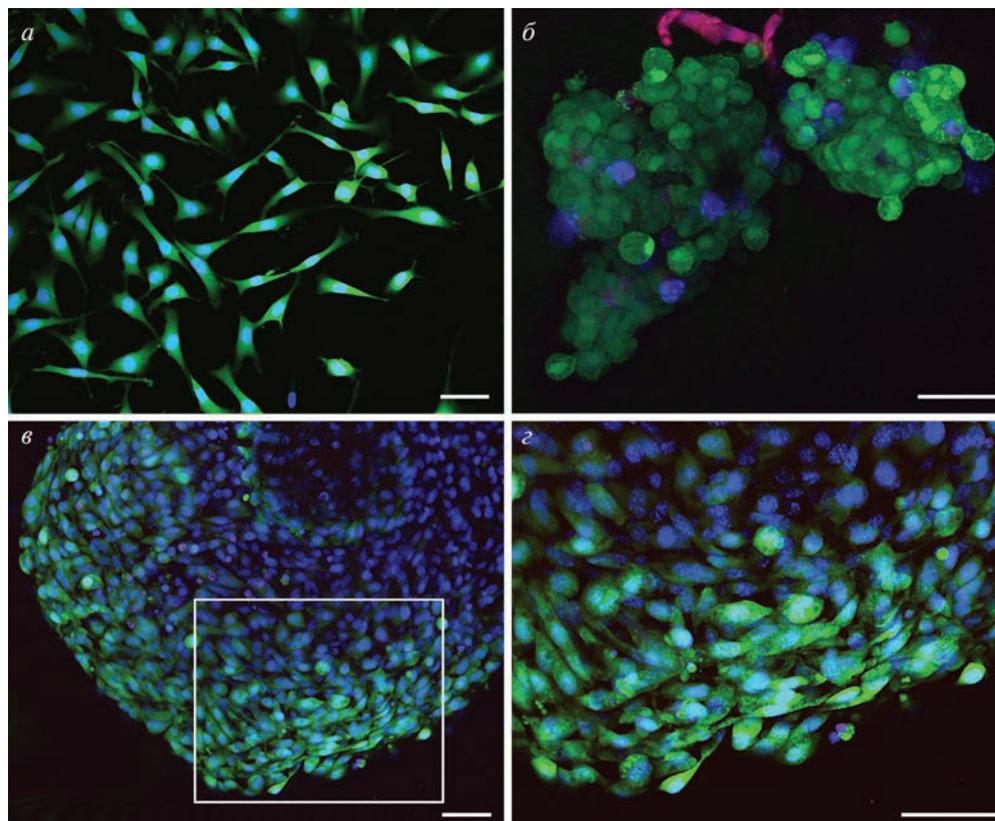


Рис. 4. Фибробласты NIH 3ТЗ на поверхности гелевых материалов после инкубации в течение 24 ч. *a* — Контроль. Клетки высевали на поверхность коллагеновой матрицы, не содержащей полифенол. В процессе инкубации коллагеновая матрица деградировала, и фибробласты прикрепились к поверхности чашки. *б–г* — Клетки на поверхности гелевого материала, содержащего 2.5% DfTf (*б*), 2.5% TfG5 (*в*), 2.5% TfG5 при большем увеличении (*г*). Ядра клеток окрашены Hoechst 33342 (синий канал) и пропидий иодидом (красный канал) для выявления мертвых клеток. Цитоплазма живых клеток окрашена кальцеином-АМ (зеленый канал). Масштабный отрезок 50 мкм.

к увеличению взаимодействий между фрагментами полифенола и аминокислотными остатками коллагена, изменению трехмерной архитектуры материала в целом, которая, как известно, влияет на прикрепление, распластывание и миграцию клеток. Важную роль в данных процессах играют карбоксильные группы остатков глутаминовой кислоты полипептида. В частности, было показано, что формирование сшивки за счет данных карбоксильных групп приводит к снижению прикрепления, распластывания, миграции, а также выживаемости и роста клеток [24]. Согласно существующим данным, в трехспиральной структуре коллагена присутствуют аминокислотные остатки, которые в совокупности формируют области взаимодействия коллагена с интегриновыми рецепторами клеток. Карбоксильные группы глутаминовой кислоты (E) играют первостепенную роль в этих взаимодействиях [54, 55]. Так области GxOGEx' важны для взаимодействия с $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$ и $\alpha11\beta1$ интегриновыми рецепторами. GFOGER имеет наибольшее сходство к $\alpha2\beta1$ и $\alpha11\beta1$ рецепторами, тогда как GLOGEN имеет

большее сходство к $\alpha1\beta1$ и $\alpha10\beta1$ рецепторам [55]. Первоначально мы полагали, что карбоксильная группа DfTf будет формировать ковалентную связь с аминогруппами аминокислотных остатков лизина полипептидной цепи, таким образом изменяя и стабилизируя структуру коллагеновых волокон. Мы также предполагали, что нековалентные взаимодействия между функциональными группами и циклическими структурами полифенола и аминокислотными остатками полипептида будут вносить свой вклад в стабилизацию материала. Однако данные о стабильности исследуемых материалов, полученные в ходе данной работы, говорят о том, что материалы, полученные на основе DfTf являются более стабильными, чем материалы, полученные на основе TfG5, хотя последний содержит в своей структуре пять карбоксильных групп, которые потенциально могут участвовать в формировании ковалентной связи полифенола с аминогруппами аминокислотных остатков полипептида. Эти данные позволяют нам предположить, что, во-первых, не все карбоксильные группы TfG5 участвуют в формировании ковалентной связи,

и, во-вторых, вероятно, DfTf может формировать дополнительные связи с коллагеном. Предположительно, отдельные гидроксильные группы DfTf взаимодействуют с карбоксильными группами аминокислотных остатков коллагена. Взаимодействия гидроксильных групп с карбоксильными группами могут быть электростатическими или же в результате реакции этерификации может формироваться ковалентная (сложноэфирная) связь. Это могло бы объяснить снижение миграции клеток через материал при увеличении доли DfTf в нем, а также плохое распластывание фибробластов на поверхности материала с долей DfTf 2.5%. С другой стороны, мы не можем исключать того, что карбоксильные группы полипептида остаются свободными, но формирующаяся трехмерная архитектура материала создает неблагоприятные условия для дальнейшего распластывания и миграции клеток через него.

Примечательным является то, что увеличение доли TfG5, напротив, приводит к усилению миграции клеток через материал. Как уже упоминалось, вероятно, часть карбоксильных групп TfG5 не вовлечена в формирование ковалентных сшивок и потенциально может стабилизировать структуру материала за счет нековалентных взаимодействий, а также участвовать в формировании областей взаимодействия материала с клетками, способствуя их распластыванию и миграции через материал. Полученные данные свидетельствуют о том, что модификация коллагеновых биоматериалов различными производными таксифолина позволяет модулировать адгезию клеток и их миграцию в материале. Полученные данные открывают новые направления в области регенеративной медицины и могут быть полезны, в частности, для разработки новых материалов, обеспечивающих направленную регенерацию тканей.

Авторы благодарны В.Г. Заикину (ЗАО «НПФ «Флавит») за любезно предоставленный таксифолин. Работа выполнена с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23–25–00149).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO Burns Available online: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/burns>
2. Shi C., Wang C., Liu H., Li Q., Li R., Zhang Y., Liu Y., Shao Y., Wang J. 2020. Selection of appropriate wound dressing for various wounds. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 182. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00182>
3. Rowan M. P., Cancio L.C., Elster E.A., Burmeister D.M., Rose L.F., Natesan S., Chan R.K., Christy R.J., Chung K.K. 2015. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit Care.* **19**, 243. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0961-2>
4. Chattopadhyay S., Raines R.T. 2014. Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers.* **101** (8), 821–833. <https://doi.org/10.1002/bip.22486>
5. Ермолов А. С., Смирнов С.В., Карасев Н.А., Курилин Б.Л., Кислухина Е.В., Киселевская-Бабинина И.В., Васильев В.А. 2016. Анализ основных показателей работы Московского городского ожогового центра после модернизации. *Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь».* (1), 60–62.
6. Fleck C. A., Simman R. 2010. Modern collagen wound dressings: Function and purpose. *J. Am. Coll. Certif. Wound Spec.* **2** (3), 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.jcws.2010.12.003>
7. Liu R., Dai L., Si C., Zeng Z. 2018. Antibacterial and hemostatic hydrogel via nanocomposite from cellulose nanofibers. *Carbohydr. Polym.* **195**, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.085>
8. Adhirajan N., Shanmugasundaram N., Shanmuganathan S., Babu M. 2010. Collagen-based wound dressing for doxycycline delivery: In-vivo evaluation in an infected excisional wound model in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **61** (12), 1617–1623. <https://doi.org/10.1211/jpp.61.12.0005>
9. Jana P., Mitra T., Selvaraj T.K.R., Gnanamani A., Kundu P.P. 2016. Preparation of guar gum scaffold film grafted with ethylenediamine and fish scale collagen, cross-linked with ceftazidime for wound healing application. *Carbohydr. Polym.* **153**, 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.053>
10. Simões D., Miguel S.P., Ribeiro M.P., Coutinho P., Mendonça A.G., Correia I.J. 2018. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **127**, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.022>
11. Gomathi K., Gopinath D., Rafiuddin Ahmed M., Jayakumar R. 2003. Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat. *Biomaterials.* **24** (16), 2767–2772. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00059-0)
12. Gopinath D., Ahmed M.R., Gomathi K., Chitra K., Sehgal P.K., Jayakumar R. 2004. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials.* **25** (10), 1911–1917. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00625-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00625-2)

13. Kim H., Kawazoe T., Han D.-W., Matsumara K., Suzuki S., Tsutsumi S., Hyon S.-H. 2008. Enhanced wound healing by an epigallocatechin gallate-incorporated collagen sponge in diabetic mice: Wound healing by EGCG-incorporated collagen sponge. *Wound Repair Regen.* **16** (5), 714–720. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00422.x>
14. Chak V., Kumar D., Visht S. 2013. A review on collagen based drug delivery systems. *Int. J. Pharm. Teach. Pract.* **4** (4), 811–820.
15. Hwang J., Sullivan M.O., Kiick K.L. 2020. Targeted drug delivery via the use of ECM-mimetic materials. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 69. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00069>
16. Terzopoulou Z., Michopoulou A., Palamidi A., Koliakou E., Bikiaris D. 2020. Preparation and evaluation of collagen-based patches as curcumin carriers. *Polymers.* **12** (10), 2393. <https://doi.org/10.3390/polym12102393>
17. Oryan A., Kamali A., Moshiri A., Baharvand H., Daeimi H. 2018. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. *Int. J. Biol. Macromol.* **107** (Pt A), 678–688. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184>
18. Gu L., Shan T., Ma Y., Tay F.R., Niu L. 2019. Novel biomedical applications of crosslinked collagen. *Trends Biotechnol.* **37** (5), 464–491. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.007>
19. Choi Y., Kim H.-J., Min K.-S. 2016. Effects of proanthocyanidin, a crosslinking agent, on physical and biological properties of collagen hydrogel scaffold. *Restor. Dent. Endod.* **41** (4), 296–303. <https://doi.org/10.5395/rde.2016.41.4.296>
20. Gough J. E., Scotchford C.A., Downes S. 2002. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films by the mechanism of apoptosis. *J. Biomed. Mater. Res.* **61** (1), 121–130. <https://doi.org/10.1002/jbm.10145>
21. Reddy N., Reddy R., Jiang Q. 2015. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends Biotechnol.* **33** (6), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008>
22. Wang X., Ma B., Chang J. 2015. Preparation of decellularized vascular matrix by co-crosslinking of procyanidins and glutaraldehyde. *Biomed. Mater. Eng.* **26** (1–2), 19–30. <https://doi.org/10.3233/BME-151548>
23. Huang G. P., Shanmugasundaram S., Masih P., Pandya D., Amara S., Collins G., Arinzech T.L. 2015. An investigation of common crosslinking agents on the stability of electrospun collagen scaffolds: An investigation of common crosslinking agents. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **103** (2), 762–771. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35222>
24. Bax D. V., Davidenko N., Gullberg D., Hamaia S.W., Farndale R.W., Best S.M., Cameron R.E. 2017. Fundamental insight into the effect of carbodiimide crosslinking on cellular recognition of collagen-based scaffolds. *Acta Biomater.* **49**, 218–234. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.059>
25. Shavandi A., Bekhit A.E.-D.A., Saeedi P., Izadifar Z., Bekhit A.A., Khademhosseini A. 2018. Polyphenol uses in biomaterials engineering. *Biomaterials.* **167**, 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.03.018>
26. Manjari M. S., Aaron K.P., Muralidharan C., Rose C. 2020. Highly biocompatible novel polyphenol cross-linked collagen scaffold for potential tissue engineering applications. *React. Funct. Polym.* **153**, 104630. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104630>
27. Zhang X., Li Z., Yang P., Duan G., Liu X., Gu Z., Li Y. 2021. Polyphenol scaffolds in tissue engineering. *Master. Horiz.* **8**, 145–167. <https://doi.org/10.1039/D0MH01317J>
28. Kaczmarek B. 2020. Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials — A minireview. *Materials.* **13** (14), 3224. <https://doi.org/10.3390/ma13143224>
29. Kaczmarek B., Mazur O. 2020. Collagen-based materials modified by phenolic acids — A review. *Materials.* **13** (16), 3641. <https://doi.org/10.3390/ma13163641>
30. Schlebusch H., Kern D. 1972. Stabilization of collagen by polyphenols. *Angiologica.* **9** (3–6), 248–252. <https://doi.org/10.1159/000157937>
31. Тараховский Ю. С., Селезнева И.И., Васильева Н.А., Егорочкин М.А., Ким Ю.А. 2007. Ускорение фибриллообразования и температурная стабилизация фибрилл коллагена в присутствии таксифолина (дигидроокверцетина). *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* **144** (12), 640–643. <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0433-z>
32. Madhan B., Subramanian V., Rao J.R., Nair B.U., Ramasami T. 2005. Stabilization of collagen using plant polyphenol: role of catechin. *Int. J. Biol. Macromol.* **37** (1–2), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.08.005>
33. Han B., Jaurequi J., Tang B.W., Nimni M.E. 2003. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J. Biomed. Mater. Res.* **65A** (1), 118–124. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10460>
34. Greco K. V., Francis L., Huang H., Ploeg R., Vocaccini A.R., Ansari T. 2018. Is quercetin an alternative natural crosslinking agent to genipin for long-term dermal scaffolds implantation? *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **12** (3), e1716-e1724. <https://doi.org/10.1002/term.2338>
35. He L., Mu C., Shi J., Zhang Q., Shi B., Lin W. 2011. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. *Int. J. Biol. Macromol.* **48** (2), 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.12.012>
36. Pinheiro A., Cooley A., Liao J., Prabhu R., Elder S. 2016. Comparison of natural crosslinking agents for the stabilization of xenogenic articular cartilage. *J. Orthop.*

- Res.* **34** (6), 1037–1046.
<https://doi.org/10.1002/jor.23121>
37. Scialla S., Gullotta F., Izzo D., Palazzo B., Scalera F., Martin I., Sannino A., Gervaso F. 2022. Genipin-crosslinked collagen scaffolds inducing chondrogenesis: A mechanical and biological characterization. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **110** (7), 1372–1385.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.37379>
38. Du A., Liu D., Zhang W., Wang X., Chen S. 2022. Genipin-crosslinked decellularized scaffold induces regeneration of defective rat kidneys. *J. Biomater. Appl.* **37** (3), 415–428.
<https://doi.org/10.1177/08853282221104287>
39. Isali I., Mclellan P., Wong T.R., Cingireddi S., Jain M., Anderson J.M., Hijaz A., Akkus O. 2022. In vivo delivery of M0, M1, and M2 macrophage subtypes via genipin-crosslinked collagen biotextile. *Tissue Eng. Part A.* **28** (15–16), 672–684.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2021.0203>
40. Нашекина Ю. А., Луконина О.А., Михайлова Н.А. 2020. Химические сшивающие агенты для коллагена: механизмы взаимодействия и перспективность применения в регенеративной медицине. *Цитология.* **62** (7), 459–472.
<https://doi.org/10.31857/S0041377120070044>
41. Chen C., Yang H., Yang X., Ma Q. 2022. Tannic acid: A crosslinker leading to versatile functional polymeric networks: A review. *RSC Adv.* **12** (13), 7689–7711, <https://doi.org/10.1039/D1RA07657D>
42. Shevelev A. B., La Porta N., Isakova E.P., Martens S., Biryukova Y.K., Belous A.S., Sivokhin D.A., Trubnikova E.V., Zylkova M.V., Belyakova A.V., Smirnova M.S., Deryabina Yu.I. 2020. In vivo antimicrobial and wound-healing activity of resveratrol, dihydroquercetin, and dihydromyricetin against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. *Pathogens.* **9** (4), 296.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9040296>
43. Carvalho M. T.B., Araújo-Filho H.G., Barreto A.S., Quintans-Júnior L.J., Quintans J.S.S., Barreto R.S.S. 2021. Wound healing properties of flavonoids: A systematic review highlighting the mechanisms of action. *Phytomedicine.* **90**, 153636.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153636>
44. Nguyen V.-L., Truong C.-T., Nguyen B.C.Q., Vo T.-N.V., Dao T.-T., Nguyen V.-D., Trinh D.-T.T., Huynh H.K., Bui C.-B. 2017. Anti-inflammatory and wound healing activities of calophyllolide isolated from *Calophyllum inophyllum* Linn. *PLoS One.* **12** (10), e0185674.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185674>
45. Bhaskar Rao A., Ernala P., Deepthi Seelam S., Vennapusa H., Sistla R., Kuncha M., Surekha Mullapudi V., Rao Yerramilli S. 2015. Wound healing: A new perspective on glycosylated tetrahydrocurcumin. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 3579–3588.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S85041>
46. Yeh C.-J., Chen C.-C., Leu Y.-L., Lin M.-W., Chiu M.-M., Wang S.-H. 2017. The effects of artocarpin on wound healing: In vitro and in vivo studies. *Sci. Rep.* **7**, 15599.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-15876-7>
47. Шубина В. С., Шаталин Ю.В. 2012. Влияние липосомных препаратов на основе комплексов таксифолина с металлами переменной валентности на регенерацию кожи при химическом ожоге. *Цитология.* **54** (3), 251–260.
48. Ang L., Darwis Y., Koh R., Gah Leong K., Yew M., Por L., Yam M. 2019. Wound healing property of curcuminoids as a microcapsule-incorporated cream. *Pharmaceutics.* **11** (5), 205.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050205>
49. Шубина В. С., Шаталин Ю.В. 2012. Регенерация кожи после химического ожога в присутствии препаратов на основе производных таксифолина. *Клеточные технологии в биологии и медицине.* **3**, 160–166.
50. Shubina V.S., Shatalin Y.V. 2017. Antioxidant and iron-chelating properties of taxifolin and its condensation product with glyoxylic acid. *J. Food Sci. Technol.* **54** (6), 1467–1475.
<https://doi.org/10.1007/s13197-017-2573-0>
51. Shubina V. S., Kozina V.I., Shatalin Yu.V. 2021. Comparison of antioxidant properties of a conjugate of taxifolin with glyoxylic acid and selected flavonoids. *Antioxidants (Basel).* **10** (8), 1262.
<https://doi.org/10.3390/antiox10081262>
52. Шаталин Ю. В., Шубина В.С. 2015. Материал на основе коллагена и таксифолина. *Биофизика.* **60** (3), 583–588.
53. Шаталин Ю. В., Шубина В.С. 2019. Железосвязывающая и железовосстанавливающая способность материала, полученного на основе коллагена и таксифолина (дигидрохверцетина), в физиологических и патофизиологических условиях. *Хим.-фарм. журн.* **53** (2), 52–56.
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2019-53-2-52-56>
54. Davidenko N., Hamaia S., Bax D.V., Malcor J.-D., Schuster C.F., Gullberg D., Farndale R.W., Best S.M., Cameron R.E. 2017. Selecting the correct cellular model for assessing of the biological response of collagen-based biomaterials. *Acta Biomater.* **65**, 88–101.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.10.035>
55. Majid Q. A., Fricker A.T.R., Gregory D.A., Davidenko N., Cruz O.H., Jabbour R.J., Owen T.J., Basnett P., Lukasiewicz B., Stevens M., Best S., Cameron R., Sinha S., Harding S.E., Roy I. 2020. Natural biomaterials for cardiac tissue engineering: A highly biocompatible solution. *Front Cardiovasc Med.* **7**, 554597.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.554597>

New Materials Based on Collagen and Taxifolin Derivatives: Production and Properties

© 2024 г. Yu. V. Shatalin¹, M. I. Kobyakova^{1,2}, V. S. Shubina^{1,*}

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

²*Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630060 Russia*

*e-mail: shubinavictoria@yandex.ru

In this work, the properties of gel materials based on collagen and derivatives of taxifolin, pentaglutarate of taxifolin, and conjugate of taxifolin with glyoxylic acid were studied. It was shown that the increase in the proportion of the polyphenols in a gel led to the decrease in the rate of degradation of the materials. The materials had no negative impact on the viability of NIH/3T3 cells. The cells attached to the surface of the materials. Moreover, it was shown that they spread to the surface of the material containing pentaglutarate of taxifolin. It was also found that fibroblast migrated throughout the materials. An increase in the proportion of conjugate of taxifolin with glyoxylic acid in a material led to a decrease in cell migration throughout the material, whereas an increase in the proportion of pentaglutarate of taxifolin in a material led to a significant increase in cell migration throughout the material. The obtained data suggest that new materials for regenerative medicine can be derived from collagen and taxifolin derivatives.

Keywords: taxifolin, conjugate of taxifolin with glyoxylic acid, taxifolin pentaglutarate, collagen, degradation, cell viability, adhesion, migration