

Acta Naturae



ЛИГАНДЫ ПРОТОН-АКТИВИРУЕМЫХ
КАНАЛОВ ASIC1a: МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ
И САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ
СТР. 4

КОНСЕНСУСНАЯ ИНТЕГРАЗА
НОВОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО
ВАРИАНТА CRF63_02A1 ВИЧ-1
СТР. 14

MERCK

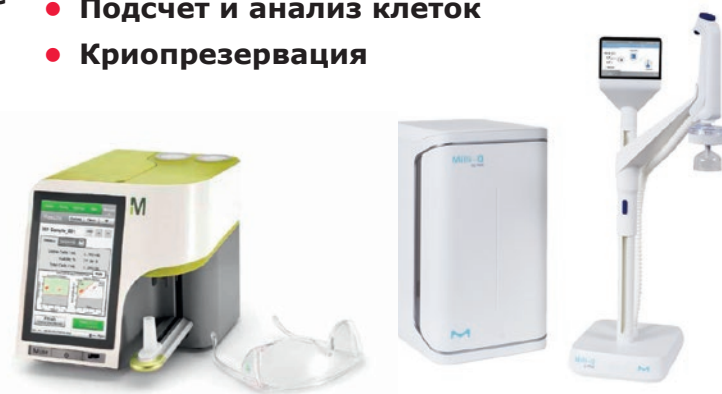
КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА



- Клеточные линии и первичные клетки
- Среды классические и специальные
- Стерилизующая фильтрация



- Биохимические реагенты
- Системы очистки воды
- Подсчет и анализ клеток
- Криопрезервация



Широкий выбор и высочайшее качество клеточных линий нашего партнера – Европейской коллекции клеточных культур (ECACC):

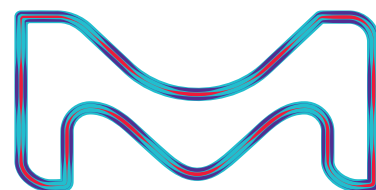
- 4000 клеточных линий животных и человека;
- Клетки 45 видов животных и 50 типов тканей;
- 370 эталонных В-лимфобластных клеточных линий с данными о типе лейкоцитарного антигена человека (HLA);
- 480 гибридомных клеточных линий, секретирующих моноклональные антитела;
- ДНК, РНК, кДНК, экстрагированные из клеточных линий коллекции;

SIGMAaldrich.com/ECACC

ООО «Мерк»

115054, г. Москва, ул. Валовая, д. 35, Тел.: +7 (495) 937-33-04
E-mail: mm.russia@merckgroup.com, ruorder@sial.com

SIGMAaldrich.com/cellculture
MERCKmillipore.com/cellculture

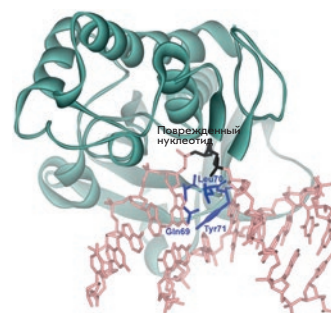


SIGMA-ALDRICH is now **MERCK**

Термодинамические параметры взаимодействия эндонуклеазы VIII с поврежденной ДНК

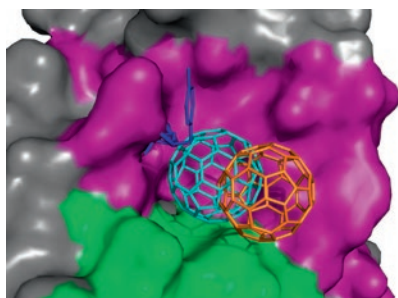
О. А. Кладова, Н. А. Кузнецов, О. С. Федорова

Проведен термодинамический анализ взаимодействия эндонуклеазы VIII (Endo VIII) с модельными ДНК, содержащими поврежденные нуклеотиды. Методом «остановленного потока» проведен анализ кинетики фермент-субстратного взаимодействия. Совокупный анализ кинетических и термодинамических данных о конформационных превращениях фермента Endo VIII и ДНК, протекающих в ходе их взаимодействия, позволил детализировать природу молекулярных процессов, происходящих на стадиях связывания субстрата, узнавания поврежденного основания и его удаления из ДНК.



Структура ковалентного комплекса фермента Endo VIII с дуплексом ДНК, содержащим AP-сайт

Структура FАВ-фрагментов антител к фуллерену C₆₀: структурные детерминанты связывания фуллерена



Смоделированное связывание C₆₀ в антигенсвязывающем кармане FabC₆₀

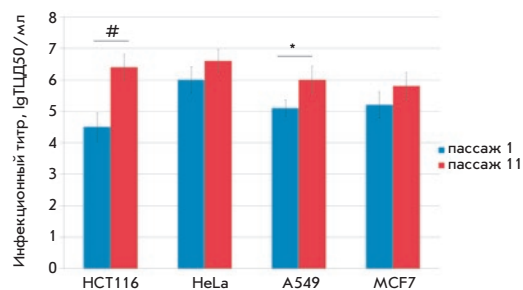
Е. М. Осипов, О. Д. Гендриксон, Т. В. Тихонова, А. В. Жердев, О. Н. Солопова, П. Г. Свешников, Б. Б. Дзантиев, В. О. Попов

Структура Fab-фрагментов антител к фуллерену C₆₀ (FabC₆₀) решена методом рентгеноструктурного анализа. Виртуальный докинг C₆₀ в антигенсвязывающем кармане FabC₆₀ показал, что связывание C₆₀ с FabC₆₀ обеспечивается энтальпийными и энтропийными факторами: π-π-стэкинг-взаимодействиями с ароматическими остатками антигенсвязывающего кармана и снижением площади доступной растворителю гидрофобной поверхности C₆₀. Фрагмент подвижной петли CDR H3, локализованный на поверхности FabC₆₀, затрудняет доступ C₆₀ в антигенсвязывающий центр, что может объяснять пониженную аффинность антител к C₆₀. Структура FabC₆₀ депонирована в Protein Data Bank с pdbid 6H3H.

Адаптация вируса болезни Ньюкасла к клеточным линиям с целью повышения онколитических свойств

К. С. Юрченко, И. Цзин, А. М. Шестопалов

Природные штаммы вируса болезни Ньюкасла, вызывающие заболевания птиц, обладают противоопухолевым действием и безопасны для человека. В работе продемонстрировано, что последовательные пассажы позволяют повысить инфекционный титр вируса на опухолевых клетках и добиться снижения их жизнеспособности после инфицирования штаммом, адаптированным на клеточных линиях. Результаты согласуются с литературными данными и важны в выборе стратегии разработки противоопухолевых препаратов на основе вируса.



Повышение инфекционного титра штаммов вируса болезни Ньюкасла в процессе адаптации к перевиваемым линиям опухолевых клеток человека

Acta Naturae

ТОМ 11, № 1 (40), ЯНВАРЬ—МАРТ 2019
издается с апреля 2009 года

Учредители:

ООО «Акта Натурэ»,
Национальный исследовательский университет
«Высшая школа экономики»

Редакционный совет:

Председатель: А.И. Григорьев
Главные редакторы: А.Г. Габибов, С.Н. Кочетков

В.В. Власов, П.Г. Георгиев, М.П. Кирпичников,
А.А. Макаров, А.И. Мирошников, В.А. Ткачук,
М.В. Угрюмов

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

К.В. Анохин (Москва, Россия),
И. Безпрозванный (Даллас, Техас, США),
И.П. Биленкина (Москва, Россия),
М. Блэкбёрн (Шеффилд, Великобритания),
Дж. Ву (Шанхай, Китай),
В.М. Говорун (Москва, Россия),
С.М. Деев (Москва, Россия),
О.А. Донцова (Москва, Россия),
К. Драуз (Ганау-Вольфганг, Германия),
М. Зуали (Париж, Франция),
М. Исагулянц (Стокгольм, Швеция),
А.Л. Конов (Москва, Россия),
М. Лукич (Аль Айн, ОАЭ),
П. Массон (Гренобль, Франция),
В.О. Попов (Москва, Россия),
И.А. Тихонович (Москва, Россия),
А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния, США),
А. Фрибуле (Компьень, Франция),
В.К. Швядас (Москва, Россия),
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Н.В. Соболева
Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева
Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин
Верстка: К.К. Опарин

Корректурa: Р.С. Шаймарданова
Дизайн-проект: Х. Шнайдер

Адрес редакции: 101000 Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 4
Телефон/факс: +7 (495) 727 38 60
E-mail: actanaturae@gmail.com

При перепечатке материалов ссылка на журнал
Acta Naturae обязательна. Любое воспроизведение опубликованных
материалов без письменного согласия редакции не допускается.
Редакция не несет ответственность за достоверность информации,
опубликованной в рекламных материалах.

© ACTA NATURAE, 2019

Номер подписан в печать 29 марта 2019 г.
Тираж 100 экз. Цена свободная.
Отпечатано в типографии «МИГ ПРИНТ»

Включен в базы данных PubMed,
Web of Science, Scopus, РИНЦ

Журнал *Acta Naturae* входит
в Перечень ведущих периодических
изданий Высшей аттестационной комиссии
Минобрнауки России

Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 2.00

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Д. Б. Тихонов, Л. Г. Магазаник, Э. И. Нагаева
Лиганды протон-активируемых
каналов ASIC1a: механизмы действия
и сайты связывания 4

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Ю. Ю. Агапкина, М. А. Пустоварова,
С. П. Королев, Д. П. Зырянова,
В. В. Ивлев, А. В. Тотменин, Н. М. Гашникова,
М. Б. Готтих

Консенсусная интеграза нового
генетического варианта
CRF63_02A1 ВИЧ-1..... 14

С. М. Балдин, Т. А. Щербакова, В. К. Швядас
Выделение, очистка и характеристика
L,D-транспептидазы 2 *Mycobacterium*
tuberculosis..... 23

О. А. Кладова, Н. А. Кузнецов, О. С. Федорова Термодинамические параметры взаимодействия эндонуклеазы VIII с поврежденной ДНК 29	N. Rummun, R. E. Hughes, R. Beesoo, W. W. Li, O. Aldulaimi, K. G. Macleod, T. Bahorun, N. O. Carragher, A. Kagansky, V. S. Neergheen-Bhujun Mauritian Endemic Medicinal Plant Extracts Induce G2/M Phase Cell Cycle Arrest and Growth Inhibition of Oesophageal Squamous Cell Carcinoma <i>in Vitro</i>..... 81
Т. А. Ожаровская, О. В. Зубкова, И. В. Должикова, А. С. Громова, Д. М. Гроусова, А. И. Тухватулин, О. Попова, Д. В. Щепляков, Д. Н. Щербинин, А. Ш. Джаруллаева, А. С. Ерохова, М. М. Шмаров, С. Я. Логинова, С. В. Борисевич, Б. С. Народицкий, Д. Ю. Логунов, А. Л. Гинцбург Иммуногенность различных форм гликопротеина S коронавируса ближневосточного респираторного синдрома 38	Правила для авторов91
Р. У. Островская, С. В. Иванов, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин Оригинальный дипептидный миметик NGF, селективно активирующий путь PI3K/Akt, повышает выживаемость панкреатических β-клеток на модели диабета 48	
Е. М. Осипов, О. Д. Гендриксон, Т. В. Тихонова, А. В. Жердев, О. Н. Солопова, П. Г. Свешников, Б. Б. Дзантиев, В. О. Попов Структура FАВ-фрагментов антител к фуллерену C ₆₀ : структурные детерминанты связывания фуллерена..... 58	
К. С. Юрченко, И. Цзин, А. М. Шестопалов Адаптация вируса болезни Ньюкасла к клеточным линиям с целью повышения онколитических свойств 66	
А. С. Злобин, Д. А. Суплатов, К. Е. Копылов, В. К. Швядас CASBench: эталонный набор белков с аннотированными каталитическим и аллостерическим сайтами в их структурах 74	

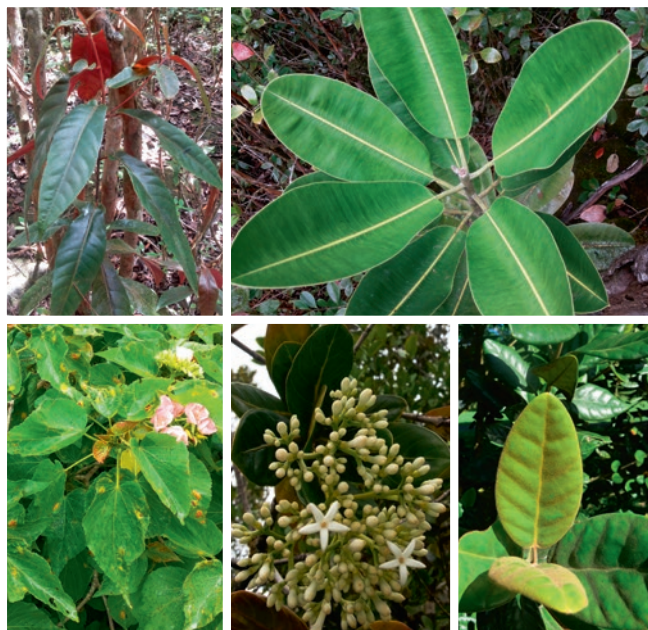


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью N. Rummun et al.)

УДК 576.54

Лиганды протон-активируемых каналов ASIC1a: механизмы действия и сайты связывания

Д. Б. Тихонов*, Л. Г. Магазаник, Э. И. Нагаева

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223,

Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44

*E-mail: denistikhonov2022@yahoo.com

Поступила в редакцию 16.04.2018

Принята к печати 28.11.2018

РЕФЕРАТ Протон-активируемые катионные каналы семейства ASIC широко распространены в ЦНС позвоночных и играют важную роль в ряде физиологических и патологических процессов. Наиболее чувствительны к закислению внешней среды каналы ASIC1a, что и обуславливает интерес к их функции и лигандам. В последнее время список лигандов, потенцирующих или ингибирующих эти каналы, существенно расширился. Он включает неорганические катионы, большой ряд малых органических молекул как эндогенных, так и синтетических, а также группу пептидных токсинов. Информация о местах связывания и молекулярных механизмах действия лигандов приходит из результатов электрофизиологических исследований, данных, полученных путем направленных аминокислотных замен, и рентгеноструктурного анализа. В обзоре предпринята попытка обобщить эти разнородные результаты и представить целостную современную картину взаимодействий различных соединений с ASIC1a.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ASIC, ингибирование, механизмы лиганд-рецепторных взаимодействий, потенциация, сайты связывания, ЦНС.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ФУНКЦИЯ ASIC В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

Протон-вызванные ионные токи были открыты Крышталем и Пидопличко в 1980 году [1], которые предположили, что понижение pH внеклеточной среды активирует популяцию управляемых протонами ионных каналов. Клонирование протон-активируемых ионных каналов в середине 90-х годов определило их как новое семейство (ASIC – acid-sensing ion channels), принадлежащее суперсемейству дегенерин эпителиальных натриевых каналов (DEG/ENaC) [2]. Гены, кодирующие ASIC, идентифицированы у многих видов позвоночных, начиная с круглоротых. На данный момент известны четыре гена *acsn1–4* млекопитающих, которые кодируют как минимум шесть различных субъединиц: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 и ASIC4. Эти субъединицы могут формировать как гомо-, так и гетеротримерные комплексы.

Протон-вызванные токи можно обнаружить в нейронах практически всех типов. Уровень экспрессии разных субъединиц ASIC заметно различается в зависимости от локализации. Так, субъединицы ASIC1a, -2a и -2b преимущественно обнаруживаются

в головном мозге [3–5], в то время как субъединицы ASIC1b и ASIC3 чаще можно встретить в сенсорных нейронах спинного мозга и спинальных ганглиях [6, 7]. На поверхности NG2-содержащих глиальных клеток гиппокампа обнаружена высокая плотность Ca²⁺-проницаемых ASIC1a, сходных по своим функциональным и фармакологическим свойствам с ASIC нейронов гиппокампа [8]. При этом в гиппокампе ASIC находятся главным образом в интернейронах, а в пирамидных клетках поля CA1 протон-вызванные токи крайне малы [9]. В центральной нервной системе ASIC, предположительно, вовлечены в механизмы синаптической передачи и синаптической пластичности, а также в такие системные функции, как память и обучение [10], страх и депрессия [3]. Их роль можно обнаружить при изучении механизмов наркотической зависимости [11] и патогенеза ряда психических заболеваний [12].

Вкусовые, слуховые и фоточувствительные рецепторные клетки [13–15], клетки гладкой мускулатуры, выстилающие стенки сосудов [16], экспрессируют на своей поверхности ASIC, хотя и в гораздо меньшей степени. На периферии ASIC отвечают за восприятие болевых стимулов, сопровождающих воспаление,

переломы, опухоли, гематомы и послеоперационные раны, а также участвуют в механорецепции [17]. Процессы опухолевого роста также способствуют экспрессии ASIC [18].

Стоит отметить, что большинство сведений о физиологической роли протон-активируемых ионных каналов являются косвенными, поскольку основаны на экспериментальных данных, полученных на «нокаутных» животных. Устранение отдельных субъединиц ASIC позволило проследить их роль в возникновении определенных поведенческих фенотипов, а также вовлеченность ASIC в развитие разнообразных патологических процессов в нервной системе [19].

Лишь недавно появились прямые свидетельства участия ASIC в синаптической передаче. Содержимое синаптических везикул имеет pH ~5.2–5.7 [20]. Соответственно в момент освобождения содержимого везикул pH среды в синаптической щели может снижаться на короткий промежуток времени на 0.2–0.6 единиц и приводить к активации как пре- [21–23], так и постсинаптических ASIC. Однако вклад ASIC-опосредуемых постсинаптических токов оказывается в 15–20 раз меньше вклада постсинаптических токов, опосредованных глутаматом [11, 24, 25].

Среди экспрессируемых в ЦНС протон-активируемых каналов наибольшей чувствительностью к закислению среды обладают ASIC1a [26]. Кроме того, специфический ингибитор гомомеров ASIC1a PcTx1 убирает большую часть протон-вызванных токов в культурах гиппокампа и коры головного мозга [27, 28]. Таким образом, большинство протон-вызванных токов в мозге, вероятно, опосредуется гомомерами ASIC1a или ASIC1a-содержащими гетеромерами. Эти факты и объясняют повышенный интерес к свойствам ASIC1a и их лигандам.

Основная проблема, стоящая на сегодняшний день перед нейрофизиологами, изучающими ASIC, состоит в разрешении противоречия между очевидной ролью этих каналов в физиологических и патологических процессах и малыми значениями ASIC-опосредованных токов, наблюдаемых при синаптической передаче в эксперименте. Между тем, токи, вызываемые искусственным закислением внеклеточной среды в нейронах ЦНС *in vitro*, не уступают по амплитуде токам, вызываемым аппликацией глутамата, который является основным возбуждающим медиатором. Вторая проблема состоит в том, что ASIC, экспрессируемые в ЦНС, быстро десенситизируют даже при небольшом закислении, т.е. теряют способность проводить ток. Так, при закислении всего до pH 7.0 равновесная десенситизация ASIC1a достигает 80% и фактически выключает функцию этих каналов [26].

Возможным решением этих проблем могло бы являться наличие эндогенных соединений, модулирующих работу ASIC в физиологических условиях. Классическим примером такой модуляции является ионотропный рецептор глутамата NMDA-типа. Эффективная активация этих каналов возможна только в присутствии ко-агониста – глицина [29]. Именно поэтому поиск и изучение новых лигандов ASIC, в частности, способных существенно потенцировать ASIC, представляют большой интерес не только с точки зрения традиционных задач фармакологии, но и с точки зрения нейрофизиологии.

ЛИГАНДЫ ASIC1a

Исследования связи между структурами и молекулярными механизмами действия модуляторов ASIC1a важны как для выяснения их физиологической роли, так и для появления нового класса лекарственных веществ. Среди модуляторов ASIC1a встречаются синтетические соединения, эндогенные органические вещества и катионы, а также ряд пептидных токсинов из компонентов природных ядов. Структуры некоторых низкомолекулярных лигандов приведены на рис. 1.

Амилорид

K⁺-сберегающее диуретическое средство, назначаемое при гипертонической болезни и сердечной недостаточности, было первым обнаруженным блокатором протон-активируемых ионных каналов [30, 31]. Амилорид действует как неселективный блокатор ASIC с низким сродством к сайту связывания (IC₅₀ = 5–100 мкМ), способный к тому же блокировать другие ионные каналы и ионообменники [32]. Интересно, что при более высоких концентра-



Рис. 1. Химические структуры низкомолекулярных лигандов ASIC1a

циях амилорида его ингибирующее действие сменяется потенцирующим или даже активирующим. Апликация амилорида ($EC_{50} = 560 \text{ мкМ}$) совместно с нейтральным физиологическим раствором (рН 7.4) активирует гомомерные ASIC3- и гетеромерные ASIC3/ASIC1b-каналы, а также синергически усиливает токи через эти каналы в ответ на умеренное закисление внеклеточной среды [33]. Таким образом, очевидно, что существует двойное разнонаправленное действие амилорида на протон-активируемые ионные каналы.

2-Гуанидин-4-метилхиназолин (GMQ)

Открытие необычного действия амилорида на протон-активируемые ионные каналы вдохновило исследователей на синтез похожих по структуре соединений, содержащих гуанидиновую группу и гетероциклическое кольцо [34, 35]. Среди всех этих соединений специфичностью своего активирующего действия выделяется 2-гуанидин-4-метилхиназолин (GMQ). GMQ был первым синтетическим активатором ASIC3, отличным от протонов, что позволило предположить существование других синтетических/эндогенных активаторов ASIC. В высоких концентрациях ($EC_{50} = 1 \text{ мМ}$) GMQ способен вызывать стационарный недесенситизирующий ток через ASIC3-каналы, который во много раз превосходит по амплитуде недесенситизирующий ток, возникающий под действием насыщающей концентрации естественного агониста – протонов. При этом действие GMQ зависит от внеклеточной концентрации Ca^{2+} и увеличивается со снижением содержания этого иона в среде [36, 37]. Помимо активирующего действия на ASIC3, GMQ специфически взаимодействует и с ASIC1a. Воздействие состоит в том, что рН-зависимости активации и равновесной десенситизации сдвигаются в сторону более кислых значений на величину порядка 0.2 единицы. Оба эффекта имеют конкурентно-подобный характер, т.е. и равновесная десенситизация, и активация развиваются полностью, хотя и при более низких значениях рН [38].

4-Аминопиридин

Еще одной небольшой молекулой, способной блокировать гомомерные ASIC1a-каналы ($IC_{50} \sim 760 \text{ мкМ}$) и гетеромеры, содержащие субъединицы ASIC1a, ASIC1b и ASIC2a, является известный блокатор калиевых каналов 4-аминопиридин. Место связывания 4-аминопиридина в ASIC и других дегенерин эпителиальных каналах, как и в случае с калиевыми каналами, находится в области поры, поскольку его действие отличается выраженной потенциалзависимостью [39].

Ионы металлов

ASIC ингибируются различными ионами металлов [40–42]. Показано, что сродство H^+ к каналу напрямую зависит от концентрации кальция в среде [43, 44] – чем меньше Ca^{2+} , тем больше сродство протонов и соответственно больше ответы.

Спермин

Эндогенный полиамин, усиливающий протон-вызванные токи через каналы ASIC1a и ASIC1a/2a [45]. Механизм потенциации ASIC1a-каналов состоит из нескольких компонентов и включает в себя замедление инактивации, т.е. активированный канал остается открытым более продолжительное время; снижение сродства протонов к рецептору и, следовательно, увеличения их ответов в условиях пониженного фонового рН; сокращение времени восстановления канала в условиях повторяющейся стимуляции. Все эти изменения приводят к увеличению входа Ca^{2+} внутрь нейрона через ASIC1a в условиях ишемического воздействия и, как следствие, к гибели клетки. Показано, что как блокада эндогенного синтеза спермина, так и выключение ASIC1a-каналов, значительно увеличивали процент выживших нейронов в *in vivo* и *in vitro* моделях ишемии на мышцах [45].

FMRF-амиды

FMRF-амиды (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂), преобладающие в нервной системе беспозвоночных, и родственные им пептиды, обнаруженные в нервной системе млекопитающих, являются активаторами некоторых представителей семейства дегенерин эпителиальных Na^+ -каналов [46]. Они не способны сами активировать ASICs, однако могут значительно потенцировать ответы ASIC1a- и ASIC3-каналов на закисление среды [47, 48]. Эти пептиды действуют непосредственно на канал и замедляют десенситизацию рецептора, увеличивая время пребывания канала в открытом состоянии [49, 50]. Существенное влияние эти пептиды оказывают и на равновесную десенситизацию, смещая ее в сторону более сильных закислений [48]. Эндогенные опиадные нейропептиды – динорфин А и большой динорфин, также смещают равновесную инактивацию, усиливая ответы ASIC1a при слабом закислении [51].

Псалмотоксин-1 (PcTx1)

Полипептидный токсин, выделенный из яда южноамериканского тарантула *Psalmopoeus cambridgei*, является первым описанным специфическим ингибитором ASIC1a-каналов ($IC_{50} \sim 1 \text{ нМ}$) [52]. PcTx1 состоит из 40 аминокислот, он образован тремя антипараллельными β -листами, скрученными в три петли,

в центре которых лежит компактное ядро из трех дисульфидных мостиков [53]. Псалмотоксин-1 ингибирует ASIC1a-каналы, увеличивая чувствительность рецептора к протонам, но при этом сдвигая кривую инактивации рецептора к менее кислым значениям pH [54]. Поскольку ASIC1a активируются в ответ на незначительное повышение концентрации протонов, даже небольшое увеличение сродства H⁺ к протонсвязывающим сайтам оказывается достаточным для перевода большинства рецепторов в десенситизированное состояние. В результате в присутствии PcTx1 при pH 7.4 основное количество ASIC1a становится неактивным вследствие десенситизации. Токсин наилучшим образом связывается с десенситизированным каналом и стабилизирует его в этом состоянии [55].

MitTx

Был выделен в 2011 году из яда техасского аспида *Micrurus tener tener* [56]. Токсин, напоминающий по своей структуре β-бунгаротоксин, состоит из двух нековалентно связанных субъединиц. MitTx не ингибирует ASICs, но активирует как гомо-, так и гетеротримерные каналы [56, 57]. Наиболее чувствительны к его действию гомомеры ASIC1a и ASIC1b (EC₅₀ ~ 9 и 23 нМ соответственно), ASIC3 гораздо менее чувствительны (EC₅₀ ~ 830 нМ). При совместной аппликации с нейтральным раствором MitTx практически не оказывает действия на ASIC2a-каналы, однако сильно потенцирует протон-вызванные токи через эти каналы за счет сдвига кривой активации в сторону менее кислых значений.

Мамбалгины

Это группа из трех токсинов длиной 57 аминокислот. Два из них, мамбалгины-1 и -2, отличающиеся только одной аминокислотой в положении 4, выделены в 2012 году из яда африканской черной мамбы *Dendroaspis polylepis polylepis* [58]. Мамбалгин-3 был выделен из яда зеленой мамбы *D. angusticeps* и назван так, поскольку от двух предыдущих его отличает только один аминокислотный остаток в положении 23 [59]. Все три белка по структуре относятся к семейству трехпальцевых токсинов, имеют сходные фармакологические характеристики и ингибируют ASIC1a [59]. Мамбалгин-1 ингибирует ASIC1a по следующему механизму: он предпочтительнее связывается с закрытым каналом и сильно сдвигает кривую pH-зависимости активации в сторону более кислых значений pH. В то же время токсин умеренно сдвигает кривую инактивации в щелочную сторону, стабилизируя тем самым десенситизированное состояние канала и усиливая ингибирование [58].

Гидрофобные моноамины

Недавно в лаборатории биофизики синаптических процессов ИЭФБ РАН было обнаружено, что соединения с простой химической структурой, содержащие гидрофобное/ароматическое ядро и аминокгруппу (гидрофобные моноамины), являются модуляторами нативных и рекомбинантных ASIC [60, 61]. Из четырех соединений, протестированных на первом этапе, только ИЭМ-1921 не проявил активности в отношении гомомерных ASIC1a-каналов даже в концентрации 1000 мкМ. Три других – 9AA, ИЭМ-2117 и мемантин вызывали концентрационно-зависимый ингибирующий эффект разной степени выраженности [60]. Наиболее активным ингибитором оказался 9-аминоакридин. В концентрации 1000 мкМ это соединение вызывало 67 ± 8% (n = 6) ингибирования при совместной аппликации с активирующим раствором с pH 6. Действие 9-аминоакридина оказалось pH-зависимым: 300 мкМ ингибировали ответ, вызванный слабым (pH 6.8) закислением, на 80%, а при активации сильным закислением (pH 5.0) ингибирующий эффект сокращался до 12%. Таким образом, ингибирующее действие 9-аминоакридина обусловлено смещением кривой активации ASIC1a. Особенностью действия мемантина было резкое ускорение десенситизации ответа. Подобный эффект мемантин оказывал и на ASIC1b [61]. Более подробное исследование механизма действия мемантина позволило установить, что в этом случае ингибирующее действие обусловлено блокадой открытого канала. Данный вывод основан на том, что эффект мемантина оказался потенциалзависимым, но не зависел от конкретной величины активирующего pH [62].

Проведенный в дальнейшем структурно-функциональный анализ [63] позволил обнаружить и потенциаторы ASIC1a. Оказалось, что встраивание метиленовой группы между фенилциклогексильным кольцом и аминокгруппой ИЭМ-1921 приводило к появлению слабой потенцирующей активности у этого соединения, а введение второй группы усиливало потенциацию (соединение ИЭМ-2044).

Обнаружение потенцирующей активности у ИЭМ-2044 позволило расширить поиск новых потенциально активных препаратов. Химическая структура этого соединения имеет сходство со структурой гистамина, ряда лигандов рецепторов гистамина и иных эндогенных аминов, например тирамина и триптамина. Гистамин [64] и его производные, альфа-метилгистамин и 1-метилгистамин [65] оказались сильными и избирательными потенциаторами ASIC1a. Потенцирование осуществляется за счет смещения кривой активации, так как ответ на глубокое закисление не увеличивается. Среди лигандов рецепторов гистамина подобным действием обладали тиоперамид

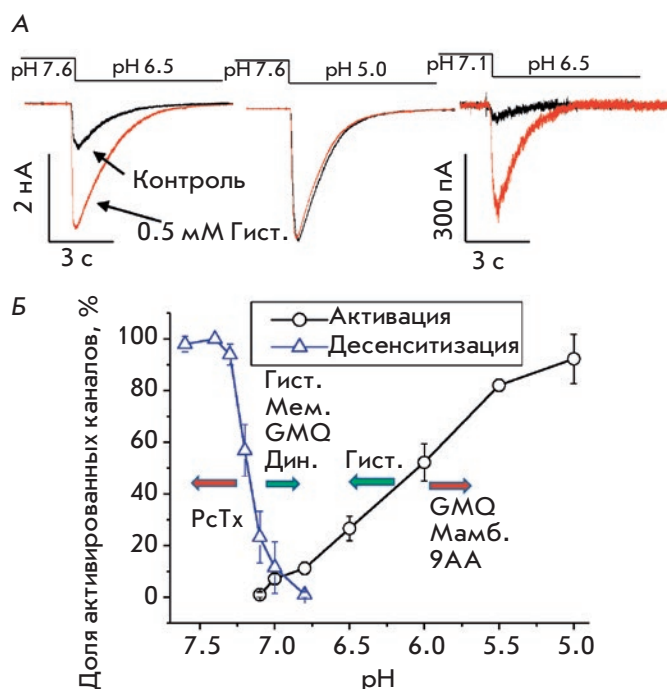


Рис. 2. Механизмы действия лигандов ASIC1a. А – действие гистамина на ASIC1a. Гистамин не потенцирует ответ на максимальное закисление (с 7.6 до 5.0), но потенцирует ответ на неполное закисление (с 7.6 до 6.5), особенно в условиях частичной десенситизации (с 7.1 до 6.5). Б – pH-зависимости активации и равновесной десенситизации ASIC1a. Стрелки показывают направление сдвигов кривых под действием соответствующих лигандов

и димеприт. А вот соединение A943931 вызывало ингибирование, зависевшее от величины потенциала, но не от величины активирующего pH, что говорит о каналоблокирующем механизме действия [65].

Первоначальное исследование [64] не выявило влияния гистамина на десенситизацию ASIC1a. Однако более подробный анализ показал, что при исходных значениях pH (pH 7.1, т.е. в условиях частичной десенситизации) эффект гистамина усиливается (рис. 2). Подобный эффект оказывали также тирамин и триптамин, которые не вызывали смещения кривой активации [66]. Даже мемантин – ингибитор открытых ASIC1a-каналов, проявлял потенцирующую активность при аппликации между активациями канала при подкислении pH до 7.1, т.е. в условиях взаимодействия только с закрытыми и десенситизированными каналами [65]. Таким образом, различные моноамины вызывают сдвиг кривой равновесной десенситизации ASIC1a в сторону более сильных закислений.

Обобщение данных по механизмам модуляции ASIC1a

Соотнести разнообразные данные и гипотезы о действии конкретных лигандов достаточно сложно. Однако накопление большого числа экспериментальных данных позволяет выявить некоторые закономерности.

По совокупности признаков ряд соединений можно отнести к блокаторам поры ASIC1a. К лигандам этого типа относятся амилорид, мемантин, 4-аминопиридин. Связывание этих соединений в поре приводит к ингибированию транспорта ионов независимо от степени активации и десенситизации рецептора. Блокаторы пор катионных каналов являются, как правило, катионами, и в этом случае их действие зависит от потенциала на мембране.

Второй распространенный тип действия лигандов – смещение кривой активации, которое приводит к ингибированию или потенцированию токов (рис. 2Б). Пептидный токсин мамбалгин и низкомолекулярные соединения GMQ и 9AA сдвигают кривую в сторону более сильных закислений, а гистамин, наоборот, позволяет каналу активироваться при более высоких значениях pH. Особенностью этого механизма является выраженность действия лигандов при низких уровнях закисления, когда активация ASIC1a невелика. Смещение кривой активации может реализовываться за счет аллостерического влияния на средство рецептора к протонам или за счет прямого взаимодействия с протонсвязывающим сайтом. В последнем случае лиганды этого типа выступают как агонисты или как конкурентные антагонисты в зависимости от направленности действия.

Третий тип действия – изменение равновесной десенситизации ASIC1a (рис. 2Б). В качестве наиболее известного примера соединения, усиливающего десенситизацию можно привести псалмотоксин. Спермин и моноамины ослабляют десенситизацию, позволяя ASIC1a функционировать в условиях длительного закисления среды. Ряд лигандов, например GMQ и гистамин, одновременно влияет на активацию и десенситизацию. При этом не наблюдается корреляции между этими эффектами. Так, GMQ смещает обе кривые в сторону более глубокого закисления, а гистамин смещает кривую активации в сторону меньших закислений (рис. 2А). Псалмотоксин, хорошо известный как промотор десенситизации, может приводить к активации канала при щелочных значениях pH.

Вопрос о сайтах связывания еще более сложен. Традиционным методом выявления сайта связывания лиганда считается направленный мутагенез рецептора. Однако этот подход не позволяет получить однозначно интерпретируемые результаты. Мутации

могут влиять непосредственно на сайт связывания лиганда, если мутируемые аминокислоты входят в его состав, или аллостерически, меняя сродство рецептора к лиганду путем изменения его конформации. Кроме того, мутации могут существенно влиять на работу самого канала, его активацию и десенситизацию, что также затрудняет интерпретацию данных. В некоторых случаях мутации приводят к полной потере функциональности канала, и тогда не представляется возможным выяснить эффект мутации на связывание лиганда. Таким образом, несмотря на высокую ценность данных, полученных с помощью направленных мутаций, к их структурной интерпретации надо подходить с большой осторожностью. Эту проблему можно решать только с учетом данных о строении ASIC и о молекулярных механизмах их активации и десенситизации.

СТРОЕНИЕ ASIC

В 2007 году впервые был проведен рентгеноструктурный анализ канала ASIC1a курицы [67], что позволило установить основные элементы его строения (рис. 3). Позже с более низким разрешением (3 Å) получили кристаллическую структуру функционирующего мутанта, у которого отсутствовала С-концевая область, но сохранилась N-концевая область и входящий в нее участок, необходимый для открытия канала [68]. Оба белка были кристаллизованы при низких значениях pH. В таких условиях канал ASIC1a находится в десенситизированном состоянии. Позднее были получены структуры ASIC1a в открытом и закрытом состояниях [69], что позволило установить механизмы активации и десенситизации.

ASIC представляют собой тримеры, субъединицы которых симметрично расположены вокруг центральной поры канала. Экстраклеточный домен (ЭКД) каждой субъединицы напоминает сжатую человеческую руку, которая крепится к мембранным сегментам посредством подвижного «запястья» [67]. Видимо, учитывая такое сходство, авторы статьи о первой кристаллической структуре описали ЭКД в терминах человеческой кисти, держащей мяч. Впоследствии эта терминология стала общепринятой, поскольку оказалась довольно удобной. ЭКД можно разделить на пять субдоменов: «ладонь» – palm-домен, «палец» – finger-домен, «большой палец» – thumb-домен, «сустав» – knuckle и домен под названием «бета-болл» (β-ball) (рис. 3).

Важная особенность структуры ЭКД – наличие так называемого «кислотного кармана» (acidic pocket) – скопление кислых аминокислот в одном небольшом участке. Он располагается на расстоянии 45 Å от трансмембранного участка и образован взаимодействиями между thumb-, β-ball- и finger-

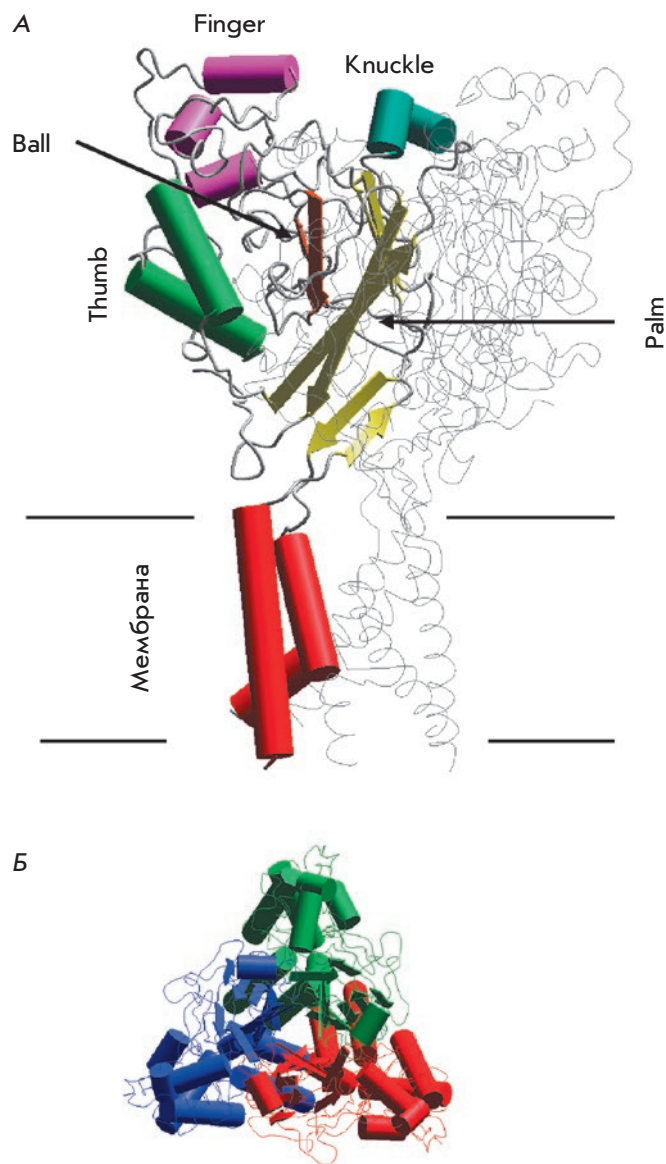


Рис. 3. Принципиальное строение ASIC1a по данным рентгеноструктурного анализа. А – вид сбоку, в одной субъединице выделены основные структурные элементы: Finger (палец), Knuckle (сустав), Ball (мяч), Thumb (большой палец), Palm (ладонь). Б – вид в плоскости мембраны. ASIC представляет собой тример, в котором субъединицы (показаны разным цветом) окружают пору канала в центре

доменами одной субъединицы и частью palm-домена соседней субъединицы. Внутри этого кармана три пары кислых аминокислотных остатков (Асп²³⁸-Асп³⁵⁰, Глу²³⁹-Асп³⁴⁶ и Глу²²⁰-Асп⁴⁰⁸) находятся на близком расстоянии. Электростатическое отталкивание между отрицательными зарядами боковых

цепей этих пар аминокислотных остатков удерживает кислотный карман в развернутом состоянии, канал при этом закрыт. При закислении внешней среды происходит связывание протонов между парами карбоксилатов, что приводит к стягиванию кармана в более компактную структуру. Это вызывает конформационные изменения в thumb-домене, что, в свою очередь, приводит к изменениям в «запястье» и далее в трансмембранном домене. Таким образом, кислотный карман является местом связывания протонов, необходимых для активации канала [69].

Однако, помимо «карманных» аминокислот, в нижней части palm-домена есть еще несколько аспарагиновых, глутаминовых и гистидиновых остатков, pK_a которых находится также в пределах pH, активирующих ASIC1-каналы [70]. Кроме того, полное удаление всех трех пар «карманных» аминокислот резко снижает чувствительность рецептора к протонам, но не устраняет его способность активироваться в ответ на сильное закисление внеклеточной среды [71]. В связи с этим считается, что в пределах одной субъединицы существует несколько участков, ответственных за связывание протонов и дальнейшую активацию канала.

Трансмембранный домен ASIC образован шестью α -спиралями – по две (TM1 и TM2) от каждой из трех субъединиц, входящих в состав функционального ASIC. Трансмембранные сегменты каждой субъединицы участвуют в формировании поры канала. TM2 непосредственно выстилает просвет ионной поры, в то время как TM1 выполняет опорную роль, контактируя с липидным бислоем и образуя множество связей с TM2 той же молекулы и сегментами TM2 и TM1 соседней субъединицы. Только небольшая часть C-концевого участка TM1-сегмента непосредственно выстилает пору канала [72].

САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ МОДУЛЯТОРОВ ASIC

Наиболее точные данные о местах связывания лигандов получены с помощью рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии. В настоящее время имеется несколько структур ASIC высокого разрешения в комплексе с такими лигандами, как псалмотоксин, MitTx и амилорид [73, 74].

С помощью активирующего токсина MitTx была получена структура ASIC1a в открытом состоянии. Каждый гетеродимер токсина связывается с субъединицей канала, т.е. всего связываются три молекулы токсина, формирующие множественные контакты по всей длине thumb-домена от поверхности мембраны до knuckle-домена (рис. 4А). Хотя молекула токсина обнаруживается вблизи «кислотного кармана», непосредственно в него MitTx не проникает. Таким образом, токсин механически стабилизирует откры-

тое состояние канала, не влияя напрямую на протонсвязывающий центр.

Помимо пептидного токсина в той же структуре разрешен комплекс ASIC1a с амилоридом. Три молекулы амилорида расположены в верхней части канала, в интерфейсах между субъединицами (рис. 4В). Их заряженные группы выставлены в пору. С другой стороны, данные мутагенеза свидетельствуют о более глубоком залегании места связывания амилорида в пору [75]. Авторы предполагают, что место связывания, обнаруженное в рентгеновской структуре, отражает промежуточное положение амилорида, и одна молекула может проходить глубже, стерически блокируя канал. Второе место связывания амилорида расположено в кислотном кармане (рис. 4Г). Две молекулы образуют димер, стабилизируемый посредством стекинг-взаимодействия ароматических группировок и противоположно ориентированных гуанидиновых групп. В настоящий момент не известно, какую функциональную нагрузку несет это место связывания, но представляется вероятным, что оно имеет отношение к способности амилорида активировать ASIC [33].

Сайт связывания псалмотоксина, выявленный Vasonguis и соавт. [73], в значительной степени перекрывается с регионом связывания MitTx. Однако средняя петля молекулы псалмотоксина заходит в кислотный карман, где положительно заряженные остатки токсина напрямую взаимодействуют с кислотными остатками рецептора (рис. 4Б), т.е. механизмы стабилизации открытого состояния токсином MitTx и десенситизированного состояния псалмотоксином принципиально различны: псалмотоксин воздействует на рецептор протонов, а MitTx – на исполнительный механизм активации.

Вероятные места связывания других лигандов ASIC можно установить по косвенным свидетельствам, анализируя совокупность механизмов их действия, влияние точечных мутаций и данные о конкуренции с лигандами, места связывания которых известны. Например, сведения о совпадении регионов связывания MitTx и псалмотоксина хорошо согласуются с данными о взаимоисключающем действии этих токсинов [56]. Согласно последним данным [76], мамбалгины также связываются вблизи кислотного кармана, как и псалмотоксин.

К псалмотоксину можно «привязать» еще несколько типов лигандов. Так, согласно [45], анализ совместного действия спермина и псалмотоксина позволяет предполагать, что эти два соединения могут конкурировать за общий сайт связывания, хотя модулируют функцию ASIC1a в противоположных направлениях. Псалмотоксин и кальций также находятся в конкурентных отношениях [54], при этом

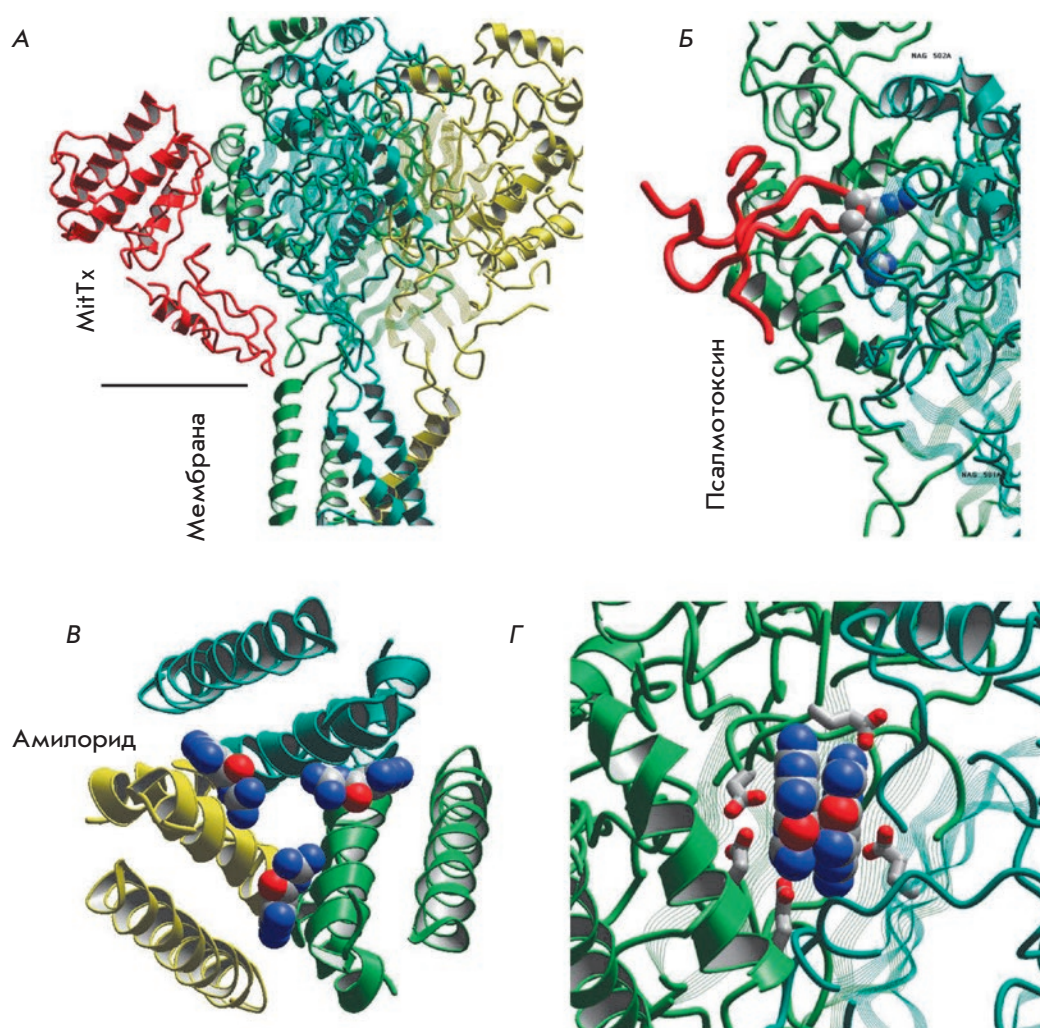


Рис. 4. Сайты связывания лигандов ASIC1a. А – токсин MitTx, переводящий канал в открытое состояние, связывается вдоль palm-домена. Б – псалмотоксин связывается с верхней частью palm-домена, а его центральная петля проникает в кислотный карман. В – три молекулы амилорида связываются в интерфейсах между трансмембранными сегментами. Г – две молекулы амилорида образуют димер, связывающийся в области кислотного кармана

известно, что кальций конкурирует с протонами [43, 77]. Конкуренция с псалмотоксином показана также для динорфина [51]. Исходя из изложенного можно предположить, что лиганды, влияющие на рН-зависимость активации и равновесной десенситизации ASIC1a, связываются в области кислотного кармана рецептора и непосредственно влияют на его функциональные компоненты. Поскольку кислотный карман содержит несколько отрицательно заряженных аминокислотных остатков, различия в характере взаимодействия разных лигандов с этой областью могут определять конкретную моду действия каждого лиганда.

Однако ряд данных не вполне согласуется с этой концепцией. Во-первых, как отмечено выше, кислотный карман не является единственной областью связывания протонов, необходимых для активации канала [70, 71]. Замены аминокислотных остатков в palm-домене влияют на десенситизацию и действие ряда лигандов. В недавней работе [78] было система-

тически изучено взаимное влияние эффектов GMQ, амилорида, псалмотоксина и мамбалгина. Оказалось, что влияние GMQ и мамбалгина на кривую активации ASIC1a полностью аддитивно, что предполагает независимость механизмов действия. Напротив, влияние GMQ и псалмотоксина на равновесную инактивацию взаимосвязано, поскольку между ними существует отрицательная кооперативность. Таким образом, вопрос о точных местах связывания лигандов, влияющих на активацию и десенситизацию ASIC1a, остается открытым и требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные о влиянии разнообразных лигандов на ASIC1a выявляют три основные моды действия: блокада поры канала, смещение рН-зависимости активации и смещение рН-зависимости десенситизации канала. Многие лиганды одновременно влияют на две последние характеристики. Вероятно, влия-

ния такого типа определяются связыванием лигандов с внеклеточным сайтом, управляющим активационными и инактивационными характеристиками ASIC1a. Хотя величины сдвигов этих кривых обычно не превосходят 0.2–0.5 единицы pH, они оказывают сильное влияние на функционирование канала поскольку активация ASIC1a происходит в диапазоне между pH 7.0 и 5.0, а равновесная десенситизация развивается между pH 7.5 и 7.0. Такие характеристики существенно ограничивают возможности активации ASIC1a в физиологических условиях. В частности, даже небольшое общее закисление вызывает десенситизацию и потерю функциональности канала. С этой точки зрения перспективным представляется поиск эндогенных лигандов, смещающих десенситизацию в сторону более кислых значений pH, а активацию – наоборот, в сторону меньших за-

кислений. В присутствии таких лигандов ASIC1a могли бы активироваться небольшими закислениями внешней среды, имеющими место при синаптической передаче. В этом случае умеренное закисление среды не приводило бы к десенситизации, а, наоборот, усиливало ответ и, таким образом, вклад ASIC1a в возбудимость нейрона. Если принять во внимание, что усиление активации ASIC1a способно оказывать благоприятное влияние на течение ряда патологических процессов, то обнаружение лигандов, потенцирующих ASIC1a, обретает клинический смысл. ●

Авторы выражают благодарность

В.Ю. Штейникову за предоставленные записи действия гистамина в разных условиях.

Работа поддержана грантом РФФ № 16-14-00122.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. // *Neuroscience*. 1980. V. 5. № 12. P. 2325–2327.
- Kellenberger S., Schild L. // *Pharmacol. Rev.* 2015. V. 67. № 1. P. 1–35.
- Wemmie J.A., Askwith C.C., Lamani E., Cassell M.D., Freeman J.H., Welsh M.J. // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. № 13. P. 5496–5502.
- Coryell M.W., Wunsch A.M., Haenfler J.M., Allen J.E., Ziemann A.E., Cook M.N., Dunning J.P., Margaret P., Rainier J.D., Liu Z., et al. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 17. P. 5381–5388.
- Price M.P., Gong H., Parsons M.G., Kundert J.R., Reznikov L.R., Bernardinelli L., Chaloner K., Buchanan G.F., Wemmie J.A., Richerson G.B., et al. // *Genes, Brain Behav.* 2014. V. 13. № 2. P. 179–194.
- Delaunay A., Gasull X., Salinas M., Noel J., Friend V., Lingueglia E., Deval E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 32. P. 13124–13129.
- Deval E., Lingueglia E. // *Neuropharmacology*. 2015. V. 94. P. 49–57.
- Lin Y.C., Liu Y.C., Huang Y.Y., Lien C.C. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 9. P. 735–744.
- Bolshakov K.V., Essin K.V., Buldakova S.L., Dorofeeva N., Skatchkov S.N., Eaton M.J., Tikhonov D.B., Magazanik L.G. // *Neuroscience*. 2002. V. 110. № 4. P. 723–730.
- Wemmie J.A., Chen J., Askwith C.C., Hruska-Hageman A.M., Price M.P., Nolan B.C., Yoder P.G., Lamani E., Hoshi T., Freeman J.H., et al. // *Neuron*. 2002. V. 34. № 3. P. 463–477.
- Kreple C.J., Lu Y., Taugher R.J., Schwager-Gutman A.L., Du J., Stump M., Wang Y., Ghobbeh A., Fan R., Cosme C.V., et al. // *Nat. Neurosci.* 2014. V. 17. № 8. P. 1083–1091.
- Baldwin D.S., Hou R., Gordon R., Huneke N.T.M., Garner M. // *CNS Drugs*. 2017. V. 31. № 4. P. 307–317.
- Lin W., Ogura T., Kinnamon S.C. // *J. Neurophysiol.* 2002. V. 88. P. 133–141.
- Ettaiche M., Guy N., Hofman P., Lazdunski M., Waldmann R. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 5. P. 1005–1012.
- Ugawa S., Inagaki A., Yamamura H., Ueda T., Ishida Y., Kajita K., Shimizu H., Shimada S. // *Neuroreport*. 2006. V. 17. № 12. P. 1235–1239.
- Grifoni S.C., Jernigan N.L., Hamilton G., Drummond H.A. // *Microvasc. Res.* 2008. V. 75. № 2. P. 202–210.
- Wemmie J.A., Price M.P., Welsh M.J. // *Trends Neurosci.* 2006. V. 29. № 10. P. 578–586.
- Damaghi M., Wojtkowiak J.W., Gillies R.J. // *Front. Physiol.* 2013. V. 4. P. 370.
- Lin S.H., Sun W.H., Chen C.C. // *Neuropharmacology*. 2015. V. 94. P. 99–118.
- Miesenböck G., De Angelis D.A., Rothman J.E. // *Nature*. 1998. V. 394. № 6689. P. 192–195.
- DeVries S.H. // *Neuron*. 2001. V. 32. № 6. P. 1107–1117.
- Palmer M.J., Hull C., Vigh J. // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. № 36. P. 11332–11341.
- Vessey J.P. // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. № 16. P. 4108–4117.
- Du J., Reznikov L.R., Price M.P., Zha X.M., Lu Y., Moninger T.O., Wemmie J.A., Welsh M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 24. P. 8961–8966.
- González-Inchauste C., Urbano F.J., Di Guilmi M.N., Uchitel O.D. // *J. Neurosci.* 2017. V. 37. № 10. P. 2589–2599.
- Hesselager M., Timmermann D.B., Ahring P.K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 12. P. 11006–11015.
- Baron A., Waldmann R., Lazdunski M. // *J. Physiol.* 2002. V. 539. Pt 2. P. 485–494.
- Coryell M.W., Ziemann A.E., Westmoreland P.J., Haenfler J.M., Kurjakovic Z., Zha X.M., Price M., Schnizler M.K., Wemmie J.A. // *Biol. Psychiatry*. 2007. V. 62. № 10. P. 1140–1148.
- Kleckner N., Dingledine R. // *Science*. 1988. V. 241. № 4867. P. 835–837.
- Waldmann R., Champigny G., Voilley N., Lauritzen I., Lazdunski M. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 18. P. 10433–10436.
- Waldmann R., Champigny G., Bassilana F., Heurteaux C., Lazdunski M. // *Nature*. 1997. V. 386. № 6621. P. 173–177.
- Kleyman T.R., Cragoe E.J. // *J. Membr. Biol.* 1988. V. 105. № 1. P. 1–21.
- Li W.G., Yu Y., Huang C., Cao H., Xu T.L. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 49. P. 42635–42646.
- Chen X., Orser B.A., MacDonald J.F. // *Eur. J. Pharmacol.* 2010. V. 648. № 1–3. P. 15–23.
- Kuduk S.D., Chang R.K., Wai J.M.C., Di Marco C.N., Cofre V., DiPardo R.M., Cook S.P., Cato M.J., Jovanovska A., Urban M.O., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009. V. 19. № 15. P. 4059–4063.

36. Yu Y., Chen Z., Li W., Cao H., Feng E., Yu F., Liu H., Jiang H., Xu T. // *Neuron*. 2010. V. 68. P. 61–72.
37. Yu Y., Li W.G., Chen Z., Cao H., Yang H., Jiang H., Xu T. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 28. P. 24996–25006.
38. Alijevic O., Kellenberger S. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 43. P. 36059–36070.
39. Boiko N., Kucher V., Eaton B.A., Stockand J.D. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 13. P. 9418–9427.
40. Staruschenko A., Dorofeeva N.A., Bolshakov K.V., Stockand J.D. // *Dev. Neurobiol.* 2007. V. 67. № 1. P. 97–107.
41. De Weille J., Bassilana F. // *Brain Res.* 2001. V. 900. № 2. P. 277–281.
42. Chu X.P., Wemmie J.A., Wang W.Z., Zhu X.M., Saugstad J.A., Price M.P., Simon R.P., Xiong Z.G. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 40. P. 8678–8689.
43. Babini E., Paukert M., Geisler H.S., Gründer S. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 41597–41603.
44. Immke D.C., McCleskey E.W. // *Nat. Neurosci.* 2001. V. 4. № 9. P. 869–870.
45. Duan B., Wang Y.Z., Yang T., Chu X.P., Yu Y., Huang Y., Cao H., Hansen J., Simon R.P., Zhu M.X., et al. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 6. P. 2101–2112.
46. Lingueglia E., Deval E., Lazdunski M. // *Peptides*. 2006. V. 27. № 5. P. 1138–1152.
47. Askwith C.C., Cheng C., Ikuma M., Benson C., Price M.P., Welsh M.J. // *Neuron*. 2000. V. 26. № 1. P. 133–141.
48. Sherwood T.W., Askwith C.C. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 4. P. 1818–1830.
49. Deval E., Baron A., Lingueglia E., Mazarguil H., Zajac J.M., Lazdunski M. // *Neuropharmacology*. 2003. V. 44. № 5. P. 662–671.
50. Frey E.N., Pavlovicz R.E., Wegman C.J., Li C., Askwith C.C. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 8. e71733.
51. Sherwood T.W., Askwith C.C. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 45. P. 14371–14380.
52. Escoubas P., De Weille J.R., Lecoq A., Diochot S., Waldmann R., Champigny G., Moinier D., Menez A., Lazdunski M. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 33. P. 25116–25121.
53. Escoubas P., Bernard C., Lambeau G., Lazdunski M., Darbon H. // *Protein Sci.* 2003. V. 12. № 7. P. 1332–1343.
54. Chen X., Kalbacher H., Gründer S. // *J. Gen. Physiol.* 2005. V. 126. № 1. P. 71–79.
55. Chen X., Kalbacher H., Gründer S. // *J. Gen. Physiol.* 2006. V. 127. № 3. P. 267–276.
56. Bohlen C.J., Chesler A.T., Sharif-Naeini R., Medzihradzky K.F., Zhou S., King D., Sánchez E.E., Burlingame A.L., Basbaum A.I., Julius D. // *Nature*. 2011. V. 479. № 7373. P. 410–414.
57. Bohlen C.J., Julius D. // *Toxicon*. 2012. V. 60. № 3. P. 254–264.
58. Diochot S., Baron A., Salinas M., Douguet D., Scarzello S., Dabert-Gay A.S., Debayle D., Friend V., Alloui A., Lazdunski M., et al. // *Nature*. 2012. V. 490. № 7421. P. 552–555.
59. Baron A., Diochot S., Salinas M., Deval E., Noël J., Lingueglia E. // *Toxicon*. 2013. V. 75. P. 187–204.
60. Tikhonova T.B., Nagaeva E.I., Barygin O.I., Potapieva N.N., Bolshakov K.V., Tikhonov D.B. // *Neuropharmacology*. 2015. V. 89. P. 1–10.
61. Nagaeva E.I., Potapieva N.N., Tikhonov D.B. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. № 25. P. 95–101.
62. Shteinikov V.Y., Tikhonova T.B., Korkosh V.S., Tikhonov D.B. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2018. V. 38. № 4. P. 869–881.
63. Nagaeva E.I., Potapieva N.N., Nikolaev M.V., Gmiro V.E., Magazanik L.G., Tikhonov D.B. // *Eur. J. Pharmacol.* 2016. V. 788. P. 75–83.
64. Nagaeva E.I., Tikhonova T.B., Magazanik L.G., Tikhonov D.B. // *Neurosci. Lett.* 2016. V. 632. P. 136–140.
65. Shteinikov V.Y., Korosteleva A.S., Tikhonova T.B., Potapieva N.N., Tikhonov D.B. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. V. 490. № 4. P. 1314–1318.
66. Barygin O.I., Komarova M.S., Tikhonova T.B., Korosteleva A.S., Nikolaev M.V., Magazanik L.G., Tikhonov D.B. // *Channels*. 2017. V. 11. № 6. P. 648–659.
67. Jasti J., Furukawa H., Gonzales E.B., Gouaux E. // *Nature*. 2007. V. 449. № 7160. P. 316–323.
68. Gonzales E.B., Kawate T., Gouaux E. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7255. P. 599–604.
69. Yoder N., Yoshioka C., Gouaux E. // *Nature*. 2018. V. 55. № 7696. P. 397–401.
70. Liechti L.A.L., Bernèche S., Bargeton B., Iwaszkiewicz J., Roy S., Michielin O., Kellenberger S. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 21. P. 16315–16329.
71. Li T., Yang Y., Canessa C.M. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 7. P. 4689–4694.
72. Li T., Yang Y., Canessa C.M. // *Nat. Commun.* 2011. V. 2. № 399. P. 1–7.
73. Bacongus I., Gouaux E. // *Nature*. 2012. V. 489. № 7416. P. 400–405.
74. Bacongus I., Bohlen C.J., Goehring A., Julius D., Gouaux E. // *Cell*. 2014. V. 156. № 4. P. 717–729.
75. Kellenberger S., Gautschi I., Schild L. // *Mol. Pharmacol.* 2003. V. 64. № 4. P. 848–856.
76. Schroeder C.I., Rash L.D., Vila-Farrés X., Rosengren K.J., Mobli M., King G.F., Alewood P.F., Craik D.J., Durek T. // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2014. V. 53. № 4. P. 1017–1020.
77. Immke D.C., McCleskey E.W. // *Neuron*. 2003. V. 37. № 1. P. 75–84.
78. Besson T., Lingueglia E., Salinas M. // *Neuropharmacology*. 2017. V. 125. P. 429–440.

УДК 577.151.45:578.287

Консенсусная интеграна нового генетического варианта CRF63_02A1 ВИЧ-1

Ю. Ю. Агапкина^{1,2}, М. А. Пустоварова^{1,2}, С. П. Королев^{1,2}, Д. П. Зырянова³, В. В. Ивлев³, А. В. Тотменин³, Н. М. Гашникова³, М. Б. Готтих^{1,2*}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы 1, стр. 3

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы 1, стр. 40

³Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, Кольцово Новосибирской обл.

*E-mail: gottikh@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 12.10.2018

Принята к печати 21.01.2019

РЕФЕРАТ Высокая генетическая изменчивость вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) приводит к постоянному появлению новых генетических вариантов, к числу которых относится рекомбинантный вирус CRF63_02A1, широко распространенный на территории Сибирского федерального округа России. Нами изучена интеграна CRF63_02A1 ВИЧ-1, катализирующая встраивание вирусной ДНК в геном инфицированной клетки. Проведен дизайн консенсусной последовательности, получен препарат рекомбинантной интеграты и охарактеризована ее ДНК-связывающая и каталитическая активность. Стабильность комплекса интеграты CRF63_02A1 с ДНК-субстратом такая же, как у комплексов интеграт подтипов А и В, однако скорость его образования существенно выше. Более высокими оказались скорости и эффективности реакций, катализируемых этой интегратой: 3'-процессинга и переноса цепи. Это может быть связано с характерными для интеграты CRF63_02A1 аминокислотными заменами в N-концевом домене, играющем важную роль в мультимеризации фермента и его связывании с ДНК-субстратом. Установлено также, что мутации лекарственной устойчивости Q148K/G140S и G118R/E138K существенно снижают каталитическую активность интеграты CRF63_02A1 и ее чувствительность к ингибитору интеграции ралтегравиру. При этом наиболее сильное снижение чувствительности обеспечивает двойная мутация Q148K/G140S.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирус иммунодефицита человека, генетический вариант CRF63_02A1, интеграна, ингибитор переноса цепи, мутации лекарственной устойчивости.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека типа 1; ИН – интеграна; ИН_CRF – консенсусная интеграна генетического варианта CRF63_02A1 ВИЧ-1; ИН_A – консенсусная интеграна подтипа А ВИЧ-1 штамма FSU-A; ИН_B – интеграна подтипа В ВИЧ-1 штамма НХВ-2; CRF – циркулирующие рекомбинантные формы ВИЧ-1; URF – уникальные рекомбинантные формы ВИЧ-1; IC₅₀ – концентрация ингибитора, подавляющая активность фермента на 50%; FC – изменение величины IC₅₀ мутантных белков по сравнению с диким типом; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ДСН – додецилсульфат натрия; ПААГ – полиакриламидный гель; ДТТ – дитиотреитол.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) обладает высокой генетической изменчивостью, что приводит к существованию различных его подтипов, циркулирующих рекомбинантных форм (CRF) и уникальных рекомбинантных форм (URF) [1]. Широкое разнообразие генетических вариантов ВИЧ-1 формируется за счет высокой скорости

репликации, склонности к рекомбинации и ошибок в работе обратной транскриптазы [2–4]. Различные подтипы ВИЧ-1 имеют определенное географическое распределение. На территории бывшего СССР преобладает подтип А [5, 6], но присутствуют и различные CRF [7–9]. С 2010–2012 гг. на территориях страны с наибольшими темпами развития эпидемии – Кемеровской, Новосибирской, Томской обла-

стей, Алтайского края – доминирует генетический вариант CRF63_02A1 [10–12], который из-за своего быстрого распространения нуждается в углубленном изучении.

Важным этапом исследования новой формы вируса является характеристика его ферментов, один из которых – интегразы (ИН), катализирует встраивание вирусной ДНК в геном зараженной клетки [13]. В клинической практике используют три ингибитора ИН: ралтегравир, элвитегравир и долутегравир [14], к которым, однако, развивается устойчивость вируса [15, 16]. Известно, что как мутации лекарственной устойчивости, так и механизмы их возникновения у вирусов разных подтипов могут различаться [17–22]. В этой связи актуально изучение влияния естественного полиморфизма ИН на ее свойства.

В настоящей работе охарактеризована ИН генетического варианта CRF63_02A1 ВИЧ-1 (ИН_CRF) и проведено ее сравнение с ИН ВИЧ-1 подтипа А (ИН_А), также широко распространенного на территории России. Работа включает изучение влияния структурных различий между ферментами на их ДНК-связывающую и каталитическую активность. Изучено также влияние мутаций устойчивости к применяемым на практике ингибиторам интеграции на каталитическую и ДНК-связывающую активности ИН_CRF, а также на ее чувствительность к ингибитору ралтегравир.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дизайн консенсусной последовательности ИН_CRF

Подтип ВИЧ-1 определяли с использованием филогенетического, рекомбинационного анализа как описано ранее [10, 11, 23]. Консенсусная последовательность ИН создана с использованием программного обеспечения BioEdit (Ibis Biosciences, США).

РНК ВИЧ-1 выделяли с использованием набора РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ (АО «Вектор-Бест», Россия) из 250 мкл двух клинических образцов плазмы крови пациентов, инфицированных вирусом, у которого ген ИН имеет максимальное сходство с рассчитанной консенсусной нуклеотидной последовательностью гена ИН_CRF. Кодирование ИН фрагменты ДНК размером 878 п.н., дополненные сайтами рестрикции для последующего клонирования, получали с помощью ОТ-ПЦР, используя коммерческий набор LongRange 2Step RT-PCR (Qiagen, США).

Получение вектора для экспрессии ИН_CRF

Фрагменты ДНК, кодирующие ИН_CRF, встраивали в плазмиду pCR_2.1Торо с использованием коммерческого набора ТОРО® TA Cloning® Kit

(pCR™2.1-ТОРО®, Thermo Fisher Scientific Inc., США). Плазмидную ДНК из плазмид pCR_2.1Торо_ИН, по 30 мкг для каждого образца ВИЧ-1, выделяли с помощью коммерческого набора Plasmid Purification Mini Kit (Qiagen, США). По результатам секвенирования гена ИН выбрана плаزمида pCR_2.1Торо_ИН_CRF*, содержащая последовательность ИН, отличающуюся от консенсусной двумя аминокислотными заменами, для субклонирования в экспрессирующий вектор pET_15b, в структуру которого включен гистидиновый таг (His-tag) (Novagen, США).

Вектор pET_15b_ИН_CRF с консенсусной последовательностью ИН_CRF получали, последовательно вводя мутации, приводящие к аминокислотным заменам I32V и I259V в вектор pET-15b_ИН_CRF*. Конструкции, кодирующие ИН с заменами Q148K/G140S и G118R/E138K, получали сайт-направленным мутагенезом плазмиды pET_15b_ИН_CRF с использованием набора QuikChange II Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies, США).

Плазмиды pET_15b, содержащая ген консенсусной ИН_А, любезно предоставлена М.Г. Беликовой-Исагулянц (НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, Россия).

Получение рекомбинантных белков

Препараты белков ИН_А и ИН_CRF с консенсусными последовательностями и с мутациями Q148K/G140S и G118R/E138K выделяли из клеток штамма-продуцента Rosetta (DE3) *Escherichia coli* и очищали согласно [24, 25]. Белки анализировали методом электрофореза в 12% ПААГ по Лэммли с последующим окрашиванием SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen, США).

Олигодезоксирибонуклеотиды

Олигодезоксирибонуклеотиды U5B (5'-GTGTGGA-AAATCTCTAGCAGT-3'), U5B с остатком флуоресцеина на 5'-конце (5'-F1-U5B), U5B-2 (5'-GTGTGGA-AAATCTCTAGCA-3') и U5A (5'-ACTGCTAGAGATTTTCCACAC-3'), формирующие ДНК-субстраты ИН, и все праймеры («ДНК-синтез», Россия).

Радиоактивную ³²P-метку вводили на 5'-конец олигонуклеотидов U5B и U5B-2 и формировали ДНК-субстраты ИН как описано в [25].

Анализ ДНК-связывающей активности интегразы

Изучение скорости связывания ИН с ДНК-субстратом методом поляризации флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) по методике [26]. Дуплекс 5'-F1-

U5B/U5A (10 нМ) смешивали с 100 нМ ИН в 200 мкл буфера А (20 мМ HEPES (pH 7.2), 10 мМ DTT, 7.5 мМ MgCl₂) и измеряли значения поляризации флуоресценции флуоресцеина ($\lambda_{ex} = 492$ нм, $\lambda_{em} = 520$ нм) через определенные промежутки времени при 25°C. Строили кривую зависимости изменения поляризации флуоресценции от времени и определяли константу скорости связывания (k_{on}) ИН с субстратом согласно уравнению $[IN/DNA] = [DNA]_0 \times (1 - e^{-k_{on}t})$ [27].

Определение K_d комплекса ИН с субстратом проводили методом DRaCALA (Differential Radial Capillary Action of Ligand Assay) [28]. Дуплекс 5'-³²P-U5B/U5A (5 нМ) инкубировали с ИН в концентрации от 0 до 500 нМ в 10 мкл буфера А в течение 20 мин при 25°C. По 5 мкл смеси наносили на нитроцеллюлозную мембрану Amersham™ Hybond™-ECL. Мембрану визуализировали на приборе Typhoon FLA 9500 PhosphorImager (Molecular Dynamics, США).

Определение каталитической активности интегразы

Для реакции 3'-концевого процессинга 5 нМ дуплекс 5'-³²P-U5B/U5A инкубировали со 100 нМ ИН в буфере А как описано в [25]. ДНК осаждали и анализировали электрофорезом в 20% денатурирующем ПААГ. Гель визуализировали на приборе Typhoon FLA 9500 PhosphorImager (Molecular Dynamics, США). По соотношению интенсивностей излучения полос, соответствующих U5B и U5B-2, определяли эффективность процессинга с использованием программы Quantity One 4.6.6. (Bio-Rad Laboratories, США).

При анализе кинетики накопления продуктов 3'-процессинга реакцию смесь инкубировали при 37°C от 5 мин до 7 ч, строили графики зависимости эффективности реакции от времени, определяли начальную скорость реакции по углу наклона начального участка кривой (~60 мин).

Зависимость эффективности 3'-процессинга от концентрации субстрата определяли, варьируя концентрацию ДНК (0; 2.5; 4; 10; 20; 50; 100 нМ). Строили графики зависимости эффективности реакции от концентрации субстрата, определяли максимальную скорость реакции (V_{max}) и константу Михаэлиса (K_m).

Для реакции переноса цепи 10 нМ ДНК-дуплекс [5'-³²P]-U5B-2/U5A инкубировали со 100 нМ ИН в буфере А в течение 2 и 4 ч при 37°C. Выделение и анализ продуктов реакции проводили как описано выше.

Ингибирование переноса цепи

Реакцию переноса цепи проводили как описано выше в течение 2 ч в присутствии возрастающих

концентраций ингибитора (ралтегравир, Santa Cruz Biotechnology Inc., США). По результатам трех независимых экспериментов определяли значение IC₅₀.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн консенсусной последовательности ИН_CRF и получение белка

Последовательности гена ИН получены из 324 образцов ВИЧ-1, выделенных на территориях Сибирского (250) и Уральского (74) федеральных округов России от ВИЧ-инфицированных, не получавших антиретровирусную терапию. Филогенетический анализ показал, что выборка вирусных последовательностей, включенных в исследование, содержала генетические варианты подтипов А (24.3%) и В (3.3%), а также рекомбинантные формы CRF63_02A1 (55.3%) и различные URF, образованные в результате вторичной рекомбинации вирусов CRF63_02A1 и подтипа А (6.7%).

Проведено множественное выравнивание идентифицированных нуклеотидных последовательностей ИН_CRF, трансляция, построение аминокислотной консенсусной последовательности и ее выравнивание с последовательностями ИН подтипов А и В (рис. 1). Обнаружены мутации, характерные для этого геноварианта вируса: E11D (в 93.8% случаев), K14R (81.3%), S24N (100%) и M50I (75%). Замена L74I, специфичная для ИН_А, найдена лишь в 4% случаев ИН_CRF.

Среди исследованных последовательностей ВИЧ-1 отобран вариант, последовательность ИН у которого максимально близка к консенсусной ИН_CRF ВИЧ-1. Нарботка целевого фрагмента ДНК ИН_CRF и последовательные клонирования позволили получить экспрессирующий вектор pET-15b_ИН_CRF*, введение замен I32V и I259V в который привело к получению вектора pET-15b_ИН_CRF с консенсусной последовательностью ИН. На его основе получены конструкции, содержащие мутации лекарственной устойчивости, – G118R/E138K и Q148K/G140S. Полученные векторы использовались для прокариотической экспрессии белков с последующей очисткой на Ni-NTA-агарозе. Степень чистоты полученных препаратов ИН не менее 90% (рис. 2).

Характеристика ДНК-связывающей активности ИН_CRF

Ретровирусные интегразы в процессе функционирования связываются с концами вирусной ДНК, а затем взаимодействуют с клеточной ДНК, причем последнее взаимодействие не является специфичным к последовательности [29]. Рекомбинантная ИН ВИЧ-1 обычно имеет одинаковое сродство к ДНК-дуплексам

		11 14	24	32	50
ИН_CRF63_02A1	FLDGIDKAQE	<u>D</u> HE <u>R</u> YHSNWR	AMAN <u>D</u> FNLPP	IVAKEIVASC	DKCQLKGEA <u>I</u>
ИН_A	FLEGIDKAQE	EHEKYHSNWK	AMASDFNLPP	IVAKEIVASC	DKCQLKGEAM
ИН_B	FLDGIDKAQE	EHEKYHSNWR	AMASDFNLPP	<u>V</u> VAKEIVASC	DKCQLKGEAM
		N-концевой домен			
			72		
ИН_CRF63_02A1	HGQVDCSPGI	WQLDCTHLEG	<u>K</u> IILVAVHVA	SGYIEAEVIP	AETGQETAYF
ИН_A	HGQVDCSPGI	WQLDCTHLEG	KV <u>I</u> IVAVHVA	SGYIEAEVIP	AETGQETAYF
ИН_B	HGQVDCSPGI	WQLDCTHLEG	KVILVAVHVA	SGYIEAEVIP	AETGQETAYF
		118 119		138 140	148
ИН_CRF63_02A1	LLKLAGRWPV	KVVHTDNGPN	FTSSAVKAAC	WWANIQQE <u>E</u> FG	IPYNPQS <u>Q</u> GV
ИН_A	LLKLAGRWPV	KVVHTDNGPN	FTSSAVKAAC	WWANIQQEFG	IPYNPQSQGV
ИН_B	LLKLAGRWPV	<u>K</u> TVHTDNGSN	FT <u>S</u> TTVKAAC	WWAGIKQE <u>E</u> FG	IPYNPQS <u>Q</u> GV
ИН_CRF63_02A1	VESMNKELKK	IIGQVRDQAE	HLKTAVQMAV	FIHNFKRKGG	IGGYSAGERI
ИН_A	VESMNKELKK	IIGQVR <u>E</u> QAE	HLKTAVQMAV	FIHNFKRKGG	IGGYSAGERI
ИН_B	<u>I</u> ESMNKELKK	IIGQVRDQAE	HLKTAVQMAV	FIHNFKRKGG	IGGYSAGERI
ИН_CRF63_02A1	IDIIATDIQT	KELQKQITKI	QNFVYYRDS	RDPIWKGPAK	LLWKGEAVV
ИН_A	IDIIATDIQT	KELQKQ <u>I</u> KI	QNFVYYRDS	RDPIWKGPAK	LLWKGEAVV
ИН_B	<u>V</u> DIIATDIQT	KELQKQITKI	QNFVYYRDS	RDPVWKGPAK	LLWKGEAVV
		259			
ИН_CRF63_02A1	IQDNNDIKVV	PRRKAKIIRD	YGKQ MAGDDC	VASRQDED	
ИН_A	IQDNNDIKVV	PRRKAKIIRD	YGKQ MAGDDC	VASRQDED	
ИН_B	IQDN <u>S</u> DIKVV	PRRKAKIIRD	YGKQ MAGDDC	VASRQDED	

Рис. 1. Аминокислотные последовательности ИН_CRF, ИН_A и ИН_B. Аминокислотные остатки, характерные для ИН_CRF, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты, для других подтипов подчеркнуты; прямоугольниками показаны аминокислоты, мутации которых приводят к появлению устойчивости вируса, красным цветом – аминокислоты каталитического домена

разной структуры [30]. Мы оценивали способность ИН_CRF связывать 21-звенный ДНК-субстрат, представляющий собой концевую последовательность участка U5 LTR вирусной ДНК. Параллельно проводили эксперименты с ИН_A.

Стабильность комплексов определяли методом DRaCALA (Differential Radial Capillary Action of Ligand Assay) [28], ранее успешно использованным для характеристики комплексов ИН_B с ДНК [31]. Значения K_d комплексов ИН/ДНК оказались сравнимыми в случае ИН_CRF и ИН_A (рис. 3А и табл. 1), а также ИН_B [32].

Кинетику связывания ИН с субстратом изучали с помощью метода поляризации флуоресценции. В качестве ДНК-субстрата использовали флуоресцентно меченный дуплекс 5'-F1-U5B/U5A. Скорость связывания ДНК у ИН_CRF оказалась выше, чем у ИН_A, константы скорости связывания (k_{on}) у них различались в 2.8 раза (рис. 3Б и табл. 1). При этом константа скорости связывания k_{on} для ИН_A (0.24 мин^{-1}) близка к значению, полученному ранее для ИН_B (0.18 мин^{-1}) [27].

Последовательности ИН подтипов А и В ВИЧ-1 отличаются 16 аминокислотными остатками, из которых 11 находятся в каталитическом, два – в С-концевом и три – в N-концевом домене, причем последние три замены синонимичные: D3E, R20K, V31I (рис. 1). ИН_CRF отличается от ИН_A

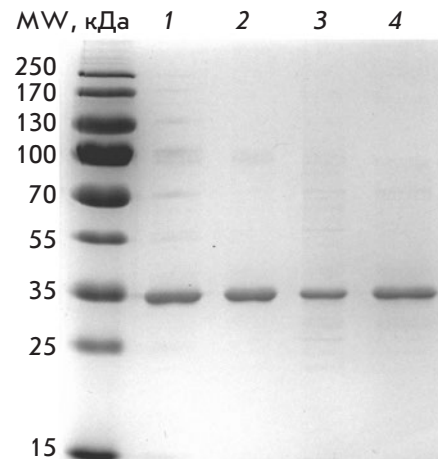


Рис. 2. Разделение препаратов консенсусной ИН_CRF и ее мутантных форм G118R/E138K и Q148K/G140S электрофорезом в ДСН-ПААГ по Лэммли. 1 – ИН_CRF; 2 – ИН_A; 3 – ИН_CRF (G118R/E138K); 4 – ИН_CRF (Q148K/G140S); MW – маркер молекулярных масс

и ИН_B 4 уникальными аминокислотными заменами E11D, K14R, S24N и M50I в N-концевом домене (рис. 1). Учитывая, что скорости связывания ДНК-субстрата с ИН_A и ИН_B сравнимы, а с ИН_CRF существенно различаются, можно предположить,

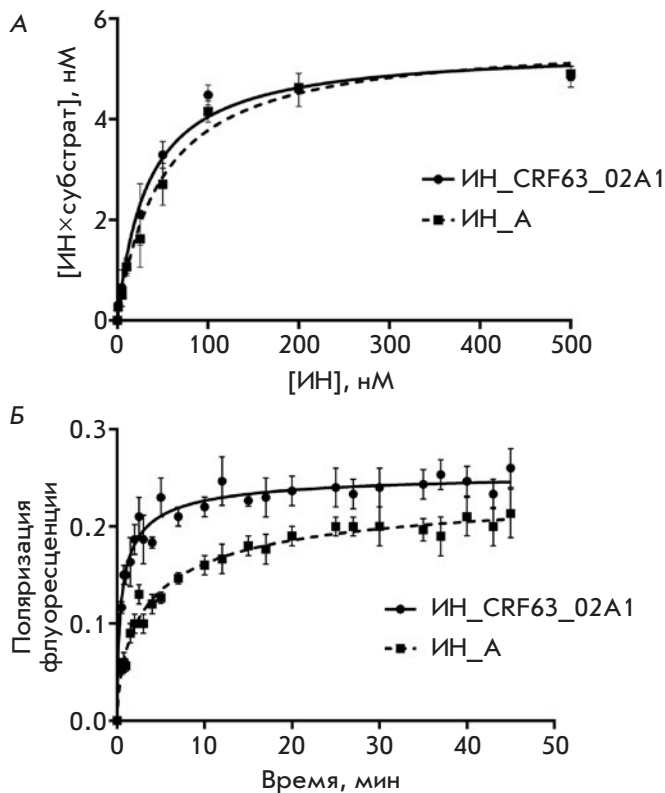


Рис. 3. Сравнение ДНК-связывающих активностей ИH_CRF и ИH_A. Приведены средние значения как минимум трех независимых измерений, при которых стандартное отклонение не превышало 15%. А – зависимость концентрации комплекса ИH/ДНК-субстрат от концентрации ИH. Б – кинетика изменения поляризации флуоресценции ДНК-субстрата при связывании с ИH_CRF и ИH_A

что на эту скорость влияет главным образом структура N-концевого домена ИH. Этот домен определяет мультимерное состояние ИH, важное для ее каталитической активности [33], и участвует в связывании ИH с ДНК-субстратом (вирусной ДНК) [34–36]. В структуре ИH_CRF в первую очередь обращают на себя внимание замены S24N и M50I. Наличие амидной группы в Asn и разветвленной цепи Ile может влиять на межсубъединичные взаимодействия при образовании каталитически активного состояния ИH. Помимо этого, K14 непосредственно контактирует с вирусной ДНК и играет важную роль в процессе мультимеризации ИH [35, 37]. В ИH_CRF в положении 14 вместо Lys находится Arg. Хотя обе эти аминокислоты положительно заряжены, остаток Arg более объемный, менее гидрофобный и обладает более высоким рКа, чем Lys [38, 39]. Для Arg также характерна делокализация положительного заряда

Таблица 1. ДНК-связывающая и каталитическая активности ИH_CRF и ИH_A

Характеристика	ИH_CRF	ИH_A
K_d , нМ	23±6	25±7
k_{on} , мин ⁻¹ *	0.69±0.09	0.24±0.02
Относительная эффективность 3'-процессинга, %**	100	71
V_0 (3'-процессинг), пмоль/мин*	19.3±2.1	9.8±2.3
V_{max} , пМ/мин*	26±1	16±1
K_M , нМ*	2.6±0.3	4.6±0.8
$V_{max}/K_M \times 10^3$, мин ⁻¹ *	10±1	3.5±0.6
Относительная эффективность переноса цепи, %**	100	77
V_0 (перенос цепи), пмоль/мин*	11.4±3.2	6.5±2.8

Примечание. Приведены средние значения как минимум трех независимых измерений со стандартным отклонением.

* $P \leq 0.05$.

**Эффективность реакции через 300 мин относительно эффективности реакции для консенсусной ИH_CRF, принятой за 100%.

по гуанидиновой группировке и возможность образования множественных водородных связей в разных направлениях [40, 41], что может способствовать связыванию ДНК-субстрата.

Таким образом, аминокислотные замены, в силу природного полиморфизма присущие ИH_CRF, не сказываются на стабильности ее комплекса с ДНК-субстратом, но при этом существенно влияют на скорость его образования.

Характеристика каталитической активности ИH_CRF

В процессе репликации вируса ИH осуществляет две последовательные реакции: 3'-концевой процессинг, при котором происходит отщепление динуклеотида GT с 3'-концов вирусной ДНК, и перенос цепи, который заключается во встраивании процессированной вирусной ДНК в клеточную ДНК. Обе эти реакции можно имитировать *in vitro* по стандартным методикам [25]. Для проведения реакции 3'-процессинга в качестве аналога вирусной ДНК использован стандартный дуплекс [5'-³²P]-U5B/U5A, радиоактивно меченный по 5'-концу процессируемой цепи U5B, которая в результате реакции превращалась в продукт, укороченный на два нуклеотида. В реакции переноса цепи в качестве и субстрата, и мишени использовался дуплекс [5'-³²P]-U5B-2/U5A, в котором

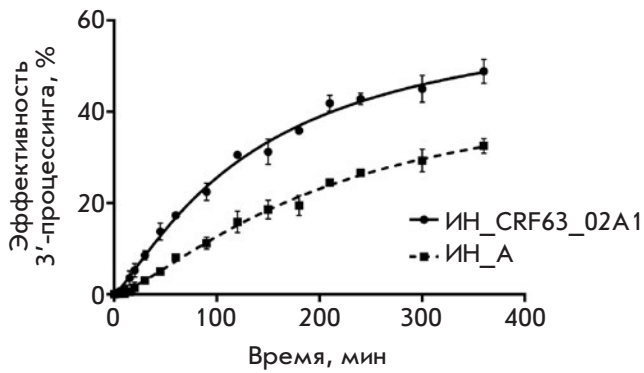


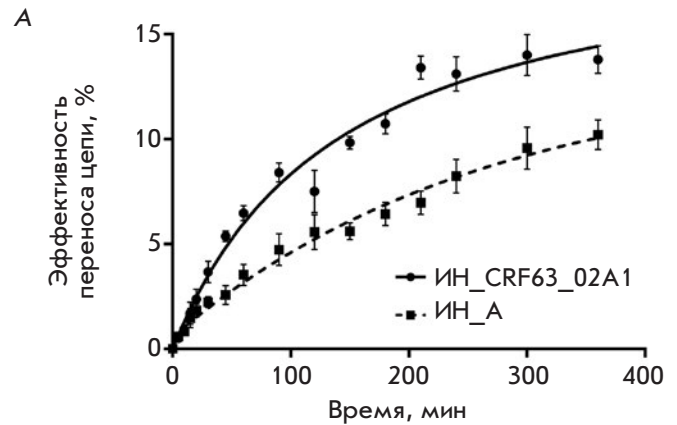
Рис. 4. Зависимость эффективности реакции 3'-процессинга, катализируемой ИИ_CRF и ИИ_A, от времени. Приведены средние значения как минимум трех независимых измерений, при которых стандартное отклонение не превышало 15%

цепь U5B уже была укорочена на два нуклеотида (U5B-2).

Изучение кинетики 3'-процессинга показало, что ИИ_CRF эффективнее и быстрее процессирует свой субстрат, чем ИИ_A (рис. 4, табл. 1). С целью более детального выяснения причин увеличения эффективности реакции были определены кинетические параметры реакции 3'-процессинга: K_M и V_{max} .

Оказалось, что K_M для ИИ_CRF в 1.8 раза ниже, а V_{max} в 1.6 раза выше, чем для ИИ_A (табл. 1). Следовательно, для ИИ_CRF характерна более высокая скорость 3'-процессинга, но достигается она при более низких значениях концентрации субстрата. Соответственно параметр каталитической эффективности (V_{max}/K_M) для ИИ_CRF оказался почти втрое выше, чем для ИИ_A (табл. 1). Мы полагаем, что столь высокая активность ИИ_CRF не может объясняться только более высокой скоростью связывания субстрата (рис. 3), тем более что константы диссоциации комплексов с ДНК у обоих ферментов практически одинаковы. Как уже упоминалось ранее, N-концевой домен ИИ отвечает за ее мультимерное состояние, которое изменяется при связывании ИИ с ДНК-субстратом [42, 43], в результате чего формируется каталитически активный фермент-субстратный комплекс. Возможно, присутствующие в N-концевом домене ИИ_CRF аминокислотные замены способствуют образованию такого комплекса, стимулируя тем самым более эффективное протекание реакции.

При изучении реакции переноса цепи определяли эффективность и скорость реакции, а также характер образуемых продуктов, отражающий место встраивания субстрата в ДНК-мишень.



Б

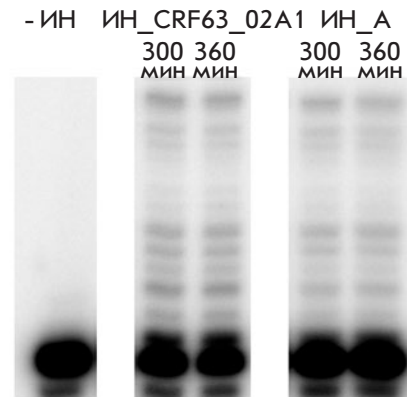


Рис. 5. Характеристика реакции переноса цепи, катализируемой ИИ_CRF и ИИ_A. А – кинетика реакции переноса цепи. Приведены средние значения как минимум трех независимых измерений, при которых стандартное отклонение не превышало 15%. Б – продукты реакции переноса цепи в случае ИИ_CRF и ИИ_A (электрофоретический анализ продуктов реакции через 300 и 360 мин)

Эффективность и скорость переноса цепи вновь оказались выше у ИИ_CRF, а характер продуктов был одинаковым (рис. 5). ИИ_A и ИИ_B различались характером продуктов переноса цепи [25]. Разные профили продуктов этой реакции могут наблюдаться, если по-разному формируется комплекс ИИ с ДНК-мишенью, в которую происходит встраивание субстрата. В связывании ДНК-мишени участвуют каталитический и особенно С-концевой домены ИИ [36], которые у ИИ_A и ИИ_CRF имеют близкую структуру и существенно отличаются от ИИ_B (рис. 1). Таким образом, в комплексе с ИИ_CRF ДНК-мишень располагается аналогичным с ИИ_A образом, но отличается от расположения в комплексе ДНК с ИИ_B.

Таблица 2. ДНК-связывающая и каталитическая активности, а также устойчивость к ралтегравирu ИH_CRF, ИH_A, их мутантных форм Q148K/G140S, G118R/E138K

Характеристика	ИH_CRF			ИH_A		
	консенсус	Q148K/ G140S	G118R/ E138K	Консенсус	Q148K/ G140S*	G118R/ E138K*
K_d , нМ	23±6	28±9	25±5	25±7	н.о.	н.о.
V_0 (3'-процессинг), пмоль/мин	19.3±2.1	2.7±0.4	5.6±1.2	9.8±2.3	2.6±0.1	2.6±0.4
Относительная эффективность 3'-процессинга, %	100	22	31	100	25	24
Относительная эффективность переноса цепи, %	100	27	22	100	20	23
Ралтегравир IC ₅₀ , нМ	7±2	500±50	50±3	5±2	400±150	7±3
FC	1	71	7	1	80	1.4

Примечание. Приведены средние значения как минимум трех независимых измерений со стандартным отклонением. н.о. – значения не определялись.

* По данным [25].

Влияние мутаций лекарственной устойчивости на активность ИH_CRF и ее чувствительность к ралтегравирu

Данные о мутациях, обеспечивающих его лекарственную устойчивость, изучаемого нами генетического варианта вируса отсутствуют, поэтому мы ввели в состав ИH мутации устойчивости к применяемым сегодня ингибиторам интеграции, известным для других подтипов ВИЧ-1. В качестве мутаций устойчивости к ралтегравирu и элвитегравирu были выбраны первичная мутация Q148K и компенсаторная к ней вторичная G140S [44, 45]. В случае долутегравира выбраны мутации G118R и E138K [46, 47]. Получены варианты ИH_CRF, содержащие двойные замены Q148K/G140S и G118R/E138K (рис. 2), и исследована эффективность связывания ДНК-субстрата и зависимость эффективности 3'-концевого процессинга от концентрации ИH и времени. Оказалось, что введенные мутации не влияли на стабильность фермент-субстратного комплекса, но существенно снижали каталитическую активность ферментов (табл. 2). При этом в случае ИH_CRF с заменами Q148K/G140S потеря активности была более существенной, чем у фермента с заменами G118R/E138K. Начальная скорость 3'-процессинга для мутантных ИH снижалась в 7.1 и 3.4 раза соответственно по сравнению с исходным ферментом. Ранее было показано снижение каталитической активности ИH_A в реакции 3'-процессинга при введении мутаций Q148K/G140S и G118R/E138K, однако оно было одинаковым для обеих пар мутаций (в 3.8 раза) [25].

Замены Q148K/G140S и G118R/E138K существенно снижали и эффективность реакции переноса цепи, катализируемой ИH_CRF (табл. 2), как и в случае ИH_A [25]. Снижение было несколько сильнее в слу-

чае пары мутаций G118R/E138K, чем Q148K/G140S: в 4.6 и 3.7 раза соответственно. Интересно, что в случае ИH_B замены G118R/E138K крайне незначительно влияли на эффективность переноса цепи [25]. Сильный отрицательный эффект этих мутаций в случае как ИH_CRF, так и ИH_A, связан, очевидно, с природным полиморфизмом S119P (рис. 1), приводящим к более жесткой конформации активного центра и сниженной способности обеих интеграз адаптироваться к мутации G118R. Возможно, именно жесткая конформация активного центра ограничивает способность ИH_CRF и ИH_A, несущих замены G118R/E138K, связывать ДНК-мишень, что выражается в резком уменьшении количества продуктов переноса цепи для мутантов G118R/E138K (рис. 6 и [25]). Мутации Q148K/G140S не вызывают изменений в характере продуктов этой реакции по сравнению с исходной ИH (рис. 6).

Мы также изучили чувствительность ИH_CRF и ее мутантов Q148K/G140S и G118R/E138K к ингибированию ралтегравиром, который применяется в терапии ВИЧ-инфицированных в Российской Федерации. Обнаружено, что ИH_CRF эффективно ингибируется ралтегравиром (табл. 2), значение IC₅₀ близко к значениям, полученным ранее для ИH_A и ИH_B [25]. Введение мутаций устойчивости Q148K/G140S, обнаруженных у других подтипов вируса, приводило к возникновению устойчивости и ИH_CRF. Мы наблюдали 70-кратное увеличение значения IC₅₀, что согласуется с полученными ранее данными для ИH_A [25]. Мутации G118R/E138K также снижали чувствительность ИH_CRF к ралтегравирu, однако не так значительно (FC=7, табл. 2). Следует отметить, что в случае ИH_A с мутациями G118R/E138K практически не наблюдалось снижения чувствительности к ралтегравирu [25].

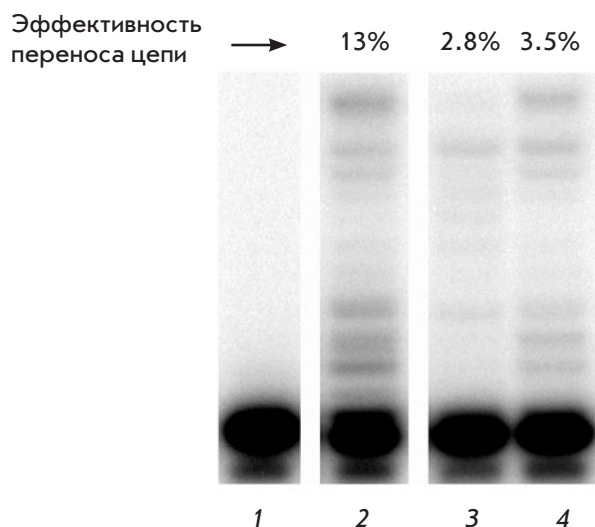


Рис. 6. Электрофоретический анализ продуктов реакции переноса цепи, катализируемой ИИ_СRФ (дорожка 2) и ее мутантами G118R/E138K (дорожка 3) и Q148K/G140S (дорожка 4) (время реакции 300 мин). Дорожка 1 – контроль без добавления ИИ. Над гелем указана эффективность реакции

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые выделена и охарактеризована рекомбинантная ИИ ВИЧ-1 нового генетического варианта CRF63_02A1, стремительно распространяющегося на территории Сибири. Установлено,

что ИИ_СRФ быстрее и эффективнее, чем ИИ подтипа А, катализирует реакции 3'-процессинга и переноса цепи. Очевидно, высокие скорости обеих реакций обеспечиваются как более быстрым связыванием ДНК-субстрата, так и более высокой каталитической эффективностью, характерными для ИИ_СRФ. По-видимому, все эти изменения объясняются аминокислотными заменами E11D, K14R и S24N, M50I, расположенными в N-концевом домене ИИ_СRФ, который играет важную роль в мультимеризации фермента и связывании вирусной ДНК. При этом из-за отсутствия значимых различий в каталитических и С-концевых доменах ИИ_СRФ и ИИ_А набор продуктов переноса цепи, характеризующий способ позиционирования ДНК-мишени в активном центре фермент-субстратного комплекса, у этих ферментов не меняется.

Полученные результаты позволяют предположить, что устойчивость генетического варианта ВИЧ-1 CRF63_02A1 к применяемому ингибитору интеграции ралтегравиру в первую очередь может развиваться по пути возникновения мутаций Q148K/G140S, как это описано для других подтипов [48]. Введение этих мутаций в состав ИИ_СRФ привело к 70-кратному росту устойчивости к действию ингибитора по сравнению с исходным ферментом. Мутации G118R/E138K увеличивали устойчивость ИИ_СRФ к ралтегравиру всего в 7 раз. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 16-15-10238).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Foley B., Leitner T., Apetrei C., Hahn B., Mizrahi I., Mullins J., Rambaut A., Wolinsky S., Korber B. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory, 2013. <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>
- Onafuwa-Nuga A., Telesnitsky A. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2009. V. 73. № 3. P. 451–480.
- Li G., Piampongsant S., Faria N.R., Voet A., Pineda-Peña A.C., Khouri R., Lemey P., Vandamme A.M., Theys K. // *Retrovirology*. 2015. V. 12. P. 18.
- Hemelaar J. // *Trends Mol. Med.* 2012. V. 18. № 3. P. 182–192.
- Diez-Fuertes F., Cabello M., Thompson M.M. // *Infect. Genet. Evol.* 2015. V. 33. P. 197–205.
- Foley B.T., Leitner T., Paraskevis D., Peeters M. // *Infect. Genet. Evol.* 2016. V. 46. P. 150–158.
- Bobkova M. // *AIDS Res.* 2013. V. 15. № 4. P. 204–212.
- Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. // *Russia Arch. Virol.* 2012. V. 157. № 12. P. 2335–2341.
- Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014. V. 30. № 6. P. 592–597.
- Gashnikova N.M., Bogachev V.V., Baryshev P.B., Totmenin A.V., Gashnikova M.P., Kazachinskaya A.G., Ismailova T.N., Stepanova S.A., Chernov A.S., Mikheev V.N. // *Russia AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2015. V. 31. № 4. P. 456–460.
- Gashnikova N.M., Zyryanova D.P., Astakhova E.M., Ivlev V.V., Gashnikova M.P., Moskaleva N.V., Aikin S.S., Bulatova T.N., Pustynnikov S.V., Bocharov E.F., Totmenin A.V. // *Arch. Virol.* 2017. V. 162. № 2. P. 379–390.
- Kazennova E., Laga V., Lapovok I., Glushchenko N., Neshumayev D., Vasilyev A., Bobkova M. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014. V. 30. № 8. P. 742–752.
- Krishnan L., Engelman A. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 49. P. 40858–40866.
- Lennox J.L. // *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2012. V. 7. № 5. P. 409–414.
- Quashie P.K., Mesplède T., Wainberg M.A. // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2013. V. 26. № 1. P. 43–49.
- Anstett K., Brenner B., Mesplède T., Wainberg M.A. // *Retrovirology*. 2017. V. 14. № 1. P. 36.
- Maiga I., Malet I., Soulie C., Derache A., Koita V., Amellal B., Tchertanov L., Delelis O., Morand-Joubert L., Mouscadet J.F., et al. // *Antivir. Ther.* 2009. V. 14. № 1. P. 123–129.
- Brenner B.G., Lowe M., Moisi D., Hardy I., Gagnon S., Charrest H., Baril J.G., Wainberg M.A., Roger M. // *J. Med. Virol.* 2011. V. 83. № 5. P. 751–759.

19. Bar-Magen T., Donahue D.A., McDonough E.I., Kuhl B.D., Faltenbacher V.H., Xu H., Michaud V., Sloan R.D., Wainberg M.A. // *AIDS*. 2010. V. 24. № 14. P. 2171–2179.
20. Quashie P.K., Oliviera M., Veres T., Osman N., Han Y.S., Hassounah S., Lie Y., Huang W., Mesplede T., Wainberg M.A. // *J. Virol.* 2015. V. 89. № 6. P. 3163–3175.
21. Depatureaux A., Mesplede T., Quashie P., Oliveira M., Moisi D., Brenner B., Wainberg M. // *J. Int. AIDS Soc.* 2014. V. 17. № 4. P. 19738.
22. Depatureaux A., Mesplede T., Quashie P., Oliveira M., Moisi D., Plantier J.C., Brenner B., Wainberg M.A. // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2015. V. 70. № 1. P. 9–15.
23. Gashnikova N.M., Astakhova E.M., Gashnikova M.P., Bocharov E.F., Petrova S.V., Pun'ko O.A., Popkov A.V., Totmenin A.V. // *Biomed. Res. Int.* 2016. V. 2016. Article ID 2496280.
24. Leh H., Brodin P., Bischerour J., Deprez E., Tauc P., Brochon J.C., LeCam E., Coulaud D., Auclair C., Mouscadet J.F. // *Biochemistry*. 2000. V. 39. № 31. P. 9285–9294.
25. Шадрина О.А., Зацепин Т.С., Агапкина Ю.Ю., Исагулянц М.Г., Готтих М.Б. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. № 1. P. 43–52.
26. Deprez E., Barbe S., Kolaski M., Leh H., Zouhiri F., Auclair C., Brochon J.C., Le Bret M., Mouscadet J.F. // *Mol. Pharmacol.* 2004. V. 65. № 1. P. 85–98.
27. Smolov M., Gottikh M., Tashlitskii V., Korolev S., Demidyuk I., Brochon J.C., Mouscadet J.F., Deprez E. // *FEBS J.* 2006. V. 273. № 6. P. 1137–1151.
28. Donaldson G.P., Roelofs K.G., Luo Y., Sintim H.O., Lee V.T. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 7. e48.
29. Khan E., Mack J.P., Katz R.A., Kulkosky J., Skalka A.M. // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. № 4. P. 851–860.
30. Agapkina J., Smolov M., Barbe S., Zubin E., Zatselin T., Deprez E., Le Bret M., Mouscadet J.-F., Gottikh M. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 17. P. 11530–11540.
31. Agapkina J., Yanvarev D., Anisenko A., Korolev S., Vepsäläinen J., Kochetkov S., Gottikh M. // *Eur. J. Med. Chem.* 2014. V. 73. P. 73–82.
32. Shadrina O., Krotova O., Agapkina J., Knyazhanskaya E., Korolev S., Starodubova E., Viklund A., Lukashov V., Magnani M., Medstrand P., et al. // *Biochimie*. 2014. V. 102. P. 92–101.
33. Zheng R., Jenkins T.M., Craigie R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. № 24. P. 13659–13664.
34. Lesbats P., Engelman A.N., Cherepanov P. // *Chem. Rev.* 2016. V. 116. № 20. P. 12730–12757.
35. Zhao Z., McKee C.J., Kessl J.J., Santos W.L., Daigle J.E., Engelman A., Verdine G., Kvaratskhelia M. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 29. № 283. № 9. P. 5632–5641.
36. Passos D.O., Li M., Yang R., Rebensburg S.V., Ghirlando R., Jeon Y., Shkriabai N., Kvaratskhelia M., Craigie R., Lyumkis D. // *Science*. 2017. V. 355. № 6320. P. 89–92.
37. McKee C.J., Kessl J.J., Shkriabai N., Dar M.J., Engelman A., Kvaratskhelia M. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 46. P. 31802–31812.
38. Sokalingam S., Raghunathan G., Soundarajan N., Lee S.G. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 7. e40410.
39. Mant C.T., Kovacs J.M., Kim H.M., Pollock D.D., Hodges R.S. // *Biopolymers*. 2009. V. 92. № 6. P. 573–595.
40. Dougherty D.A. // *J. Nutr.* 2007. V. 137. P. 1504S–1508S.
41. Chan D.I., Prenner E.J., Vogel H.J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. V. 1758. P. 1184–1202.
42. Deprez E., Tauc P., Leh H., Mouscadet J.F., Auclair C., Hawkins M.E., Brochon J.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 18. P. 10090–10095.
43. Guiot E., Carayon K., Delelis O., Simon F., Tauc P., Zubin E., Gottikh M., Mouscadet J.F., Brochon J.C., Deprez E. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 32. P. 22707–22719.
44. Malet I., Delelis O., Valantin M.A., Montes B., Soulie C., Wirden M., Tchertanov L., Peytavin G., Reynes J., Mouscadet J.-F., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. V. 52. № 4. P. 1351–1358.
45. Nakahara K., Wakasa-Morimoto C., Kobayashi M., Miki S., Noshi T., Seki T., Kanamori-Koyama M., Kawauchi S., Suyama A., Fujishita T., et al. // *Antiviral Res.* 2009. V. 81. № 2. P. 141–146.
46. Quashie P.K., Mesplède T., Han Y.S., Veres T., Osman N., Hassounah S., Sloan R.D., Xu H.T., Wainberg M.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 12. P. 6223–6235.
47. Wainberg M.A., Han Y.S. // *J. Virus Erad.* 2015. V. 1. № 1. P. 13–16.
48. Malet I., Gimferrer Arriaga L., Artese A., Costa G., Parrotta L., Alcaro S., Delelis O., Tmeizeh A., Katlama C., Valantin M.A. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2014. V. 69. № 8. P. 2118–2122.

УДК 577.152.232, 577.112.083, 577.151.042, 579.234, 579.873.21

Выделение, очистка и характеристика *L,D*-транспептидазы 2 *Mycobacterium tuberculosis*

С. М. Балдин^{1,2}, Т. А. Щербакова¹, В. К. Швядас^{1,2*}¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

*E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 21.11.2016

Принята в печать 13.12.2016

РЕФЕРАТ *L,D*-транспептидаза типа 2 *Mycobacterium tuberculosis* играет ключевую роль в формировании неклассических 3-3-поперечных сшивок пептидогликана в клеточной стенке патогена, обуславливая его устойчивость к широкому спектру антибиотиков пенициллинового ряда. Нами оптимизированы условия экспрессии, выделения и очистки рекомбинантной *L,D*-транспептидазы 2 из *M. tuberculosis*. Важным фактором, вызывающим инактивацию фермента, является окисление SH-групп каталитического остатка цистеина Cys354 как в процессе экспрессии, так и при хранении препарата. Определены биохимические свойства очищенной *L,D*-транспептидазы 2 – как полной, так и без домена А, а также кинетические характеристики катализируемой ферментом реакции превращения нитроцефина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *L,D*-транспептидаза, *Mycobacterium tuberculosis*, очистка фермента, рекомбинантный фермент, реактивация фермента.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Ac – ацетил; Ldt – *L,D*-транспептидаза; LdtMt1 и LdtMt2 – *L,D*-транспептидазы *Mycobacterium tuberculosis* первого и второго типа; m-DAP – мезо-диаминопимелиновая кислота; IG – иммуноглобулин; Amp – ампициллин; IPTG – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид; LEW – Lysis/Equilibration/Wash-буфер; ПААГ-электрофорез – электрофорез в полиакриламидном геле; DTT – дитиотреитол.

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез – опасное инфекционное заболевание, возбудителем которого является *Mycobacterium tuberculosis*. Число случаев туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью ежегодно возрастает [1]. Терапия туберкулеза заключается в комбинированном применении четырех основных препаратов первого эшелона, в который входят: рифампицин – ингибитор ДНК-зависимой РНК-полимеразы; изониазид и пиразинамид – блокаторы синтеза миколовых кислот, необходимых для формирования клеточной стенки *M. tuberculosis*; этамбутол – ингибитор арабинозилтрансферазы, фермента, участвующего в синтезе арабиногалактана. Лечение больных в активной фазе может длиться более 6 месяцев. В некоторых случаях *M. tuberculosis* может сохраняться в легких в так называемой стационарной фазе, когда рост бактерий замедлен, не наблюдается иммунного ответа и проявляется устойчивость к различным антибиотикам [2]. В этой связи

большой интерес представляет поиск лекарственных средств, действующих на ранее не известные молекулярные мишени, связанные с особенностями жизнедеятельности и структурной организацией возбудителя туберкулеза. В последнее время понятными стали особенности формирования клеточной стенки ряда опасных патогенов, в том числе *M. tuberculosis*. В то время как у большинства бактерий главную роль в синтезе поперечных сшивок в пептидогликане играют пенициллинсвязывающие ферменты *D,D*-транспептидазы, которые катализируют перенос 3-го остатка мезо-диаминопимелиновой кислоты (m-DAP) или *L*-Lys на 4-й остаток *D*-Ala (4-3-сшивки), образование большей части поперечных сшивок у *M. tuberculosis* осуществляют *L,D*-транспептидазы, катализирующие перенос 3-го остатка m-DAP на аналогичный остаток другой цепи пептидогликана (3-3-сшивки) [3, 4], содержание которых в возбудителе туберкулеза достигает 80%. Первоначально *L,D*-транспептидазы обнаружили у таких микро-

организмов, как *Escherichia coli* [5], *Bacillus subtilis* [6] и *Enterococcus faecium* [7], а о присутствии этих ферментов и их исключительной роли в формировании клеточной стенки у таких патогенов, как *M. tuberculosis* [8] и *Helicobacter pylori* [9], стало известно сравнительно недавно. Это открытие помогло понять причины низкой эффективности β -лактамовых антибиотиков при туберкулезе и ряде других инфекционных заболеваний: *L,D*-транспептидазы, в отличие от *D,D*-транспептидаз, не чувствительны к широко используемым пенициллинам и цефалоспорином [10, 11]. Важность этих ферментов в функционировании микобактерий делает их одной из наиболее привлекательных мишеней для поиска ингибиторов с целью создания новых антибиотиков, обладающих противотуберкулезной активностью.

L,D-транспептидазы относятся к классу аминоксилтрансфераз [КФ 2.3.2]. Они принадлежат к суперсемейству белков с YkuD-доменами, название которому дала *L,D*-транспептидаза (YkuD-фермент) *B. subtilis* – первый фермент с известной кристаллической структурой [6]. Геном *M. tuberculosis* кодирует пять белков, содержащих домены, обладающий *L,D*-транспептидазной активностью (участки Rv0116c, Rv0192, Rv0483, Rv1433 и Rv2518c) [11]. Наиболее активно экспрессируется *L,D*-транспептидаза второго типа (LdtMt2) [8], с которой связывают высокое содержание «неклассических» 3-3-сшивок в пептидогликане клеточной стенки патогена. Определены аминокислотные последовательности *L,D*-транспептидаз возбудителя туберкулеза, однако структуры установлены лишь у ферментов первого и второго типа (LdtMt1 и LdtMt2). Предшественник LdtMt2 состоит из 408 аминокислотных остатков, образующих сигнальный пептид (Met1–Ala34) и цепь самого фермента (Cys35–Ala408), которую можно разделить на три домена: два некаталитических IG-подобных домена А и В (остатки Ala55–Ser147 и Pro148–Gly250 соответственно), а также каталитический домен С (остатки Asp251–Ala408), обладающий транспептидазной активностью. Ключевыми для катализа остатками LdtMt2 являются Cys354, His336 и Ser337, составляющие цепь переноса протона [8]. Активный центр LdtMt2 не экспонирован непосредственно в раствор, а расположен под так называемой «крышкой» Tyr298–Trp324 [12], формирующей три канала (А, В и С), по двум из которых (В и С) возможна доставка субстрата в активный центр.

Определена структура комплекса LdtMt2 с дипептидным фрагментом (N- γ -D-глутамил-m-DAP) пептидогликана в активном центре фермента, PDB 3TUR [11], получены также структурные данные для ковалентных комплексов LdtMt2 с меропенемом и LdtMt1 с имипенемом [12, 13]. С использова-

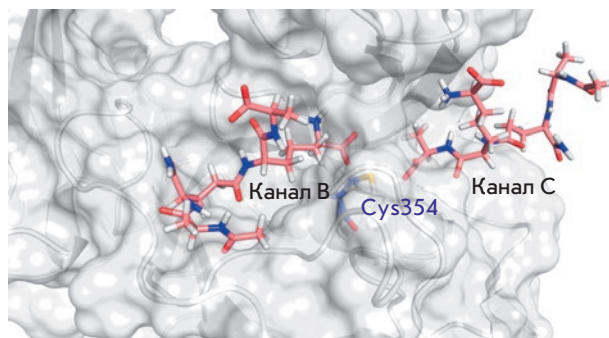


Рис. 1. Объединенные кадры из молекулярно-динамических траекторий, в которых фрагменты пептидогликана связаны с активным центром через разные каналы (В и С) [16]

нием методов предстационарной кинетики изучена инактивация LdtMt1 различными β -лактамовыми соединениями, такими, как меропенем, имипенем, дорипенем и эртапенем [14]. Показано [15], что эффективным ингибитором LdtMt могут быть не только карбапенемы, но и β -лактамовый антибиотик пенициллинового ряда – фаропенем. Проведенное нами исследование взаимодействия фермента с тетрапептидным фрагментом пептидогликана клеточной стенки, а также с известными β -лактамовыми ингибиторами при помощи методов молекулярного моделирования [16] позволило выявить особенности связывания N- и C-концевых фрагментов растущей цепи пептидогликана под действием LdtMt2 при образовании поперечных 3-3-сшивок и построить адекватную полноатомную модель LdtMt2 для скрининга и оптимизации структуры ингибиторов (рис. 1). Особенность действия *L,D*-транспептидаз заключается в том, что эти ферменты связывают в активном центре две молекулы субстрата – одну в качестве ацильного донора, которая в дальнейшем образует промежуточный ацилфермент, другую – в качестве нуклеофила, которая после связывания с ацилферментом и переноса ацильной группы L-центра остатка m-DAP одной цепи пептидогликана на аминогруппу D-центра остатка m-DAP другой цепи формирует поперечную 3-3-сшивку пептидогликана клеточной стенки. Молекулярное моделирование показало, что связывание N-концевого фрагмента растущей цепи пептидогликана (ацильного донора), а также β -лактамовых соединений, способных инактивировать фермент в результате образования стабильного ацилфермента, происходит в канале С, в то время как C-концевой (нуклеофильный) фрагмент растущей цепи связывается в канале В.

Задача данной работы состояла в выделении, очистке и характеристике LdtMt2 из *M. tuberculosis* с целью получения препаратов фермента для экспе-

риментального изучения ингибиторной способности соединений, отобранных в результате компьютерного скрининга.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспрессия LdtMt2 и LdtMt2_cut в *E. coli*, выделение и очистка

Наряду с препаратом «полноразмерной» LdtMt2 при выполнении работы был также получен препарат фермента, не содержащего в своей структуре домена А (мы назвали такой препарат LdtMt2_cut). Сравнительное изучение двух препаратов (LdtMt2 и LdtMt2_cut) могло помочь ответить на вопрос о влиянии домена А на каталитическую активность фермента. Для экспрессии фермента использовали плазмиду pET-19b, несущую либо ген *Rv2518c* (LdtMt2), не содержащий участка, кодирующего сигнальный пептид (остатки Phe54–Ala408), либо ген *Rv2518c_cut* (LdtMt2_cut), в котором отсутствовал не только участок, кодирующий сигнальный пептид, но и домен А (остатки Pro148–Ala408). В обоих случаях на N-концах белка располагался концевой пептид, состоящий из 24 аминокислотных остатков: MGNNNNNNNNHSSGHIDDDDKHM с декагистидиновым концевым фрагментом (His-tag). Колонии *E. coli* BL21(DE3) с трансформированной плазмидой pET-19b выращивали в среде LB в течение ночи. В дальнейшем переносили 100 мкл полученной культуры в колбу с отбойниками со средой LB, содержащей ампициллин (Amp) в концентрации 100 мкг/мл. Среду инкубировали при 37°C и 180 об/мин в течение 6–7 ч до достижения оптической плотности 0.6–0.8 при $\lambda = 600$ нм.

Экспрессию фермента начинали, снижая температуру до 15°C и добавляя водный раствор CaCl₂ до концентрации 2 мМ, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) до концентрации 0.5 мМ и глицерин до 2% (по объему), и продолжали в течение 4, 24 и 48 ч. Все операции по выделению фермента проводили во льду, образцы центрифугировали при 4°C. Выделение проводили по стандартной методике использования колонок Protino Ni-TED 1000 (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co) для очистки белков, содержащих His-tag [17]. Клетки осаждали в центрифуге при 4000 об/мин и 4°C в течение 15 мин, сырую клеточную массу взвешивали, затем ресуспендировали в 3 мл LEW-буфера (50 мМ NaH₂PO₄ pH 8.0, 0.3 М NaCl), добавляли лизоцим до концентрации 1 мг/мл, инкубировали в течение 30 мин и разрушали под действием ультразвука в ледяной воде в течение 10 мин. Полученный лизат центрифугировали при 12000 об/мин в течение 30 мин при 4°C, супернатант фильтровали через 0.2-мкм фильтр и наносили

на колонку Protino Ni-TED 1000, уравновешенную 2 мл LEW-буфера. Клеточные белки смывали двумя порциями (по 2 мл) LEW-буфера, LdtMt2 элюировали тремя порциями (по 1.5 мл) буфера для элюции (50 мМ NaH₂PO₄, 0.3 М NaCl, 0.25 мМ имидазол, pH 8.0). Общую концентрацию белка и выход фермента контролировали на всех этапах очистки с использованием микробуферетического метода [18].

Определение концентрации SH-групп

Свободные SH-группы титровали, используя реактив Эллмана 5,5'-дитиобис-2-нитробензойную кислоту (DTNB) в концентрации 10 мМ (4 мг/мл) в денатурирующем буфере (0.1 М Трис-HCl, содержащем 6 М гуанидинхлорид, pH 8.0). В качестве модельного соединения для построения калибровочной прямой использовали N-ацетилцистеин (N-Ас-L-Cys). Готовили 0.2 мМ раствор N-Ас-L-Cys, в денатурирующий буфер добавляли 7 мкл реактива Эллмана в концентрации 10 мМ (4 мг/мл) и 5–55 мкл раствора N-Ас-L-Cys (2–22 мкМ), чтобы общий объем смеси составлял 500 мкл. Полученную смесь инкубировали в течение 5 мин и определяли поглощение при 412 нм. Концентрацию SH-групп рассчитывали, используя значение коэффициента экстинкции образующейся 2-нитро-5-тиобензойной кислоты при 412 нм и pH 8.0, равное 14150 М⁻¹см⁻¹ [19].

Таким же образом титровали свободные SH-группы в препаратах LdtMt2 и LdtMt2_cut. Образец объемом 62–125 мкл с известной концентрацией фермента добавляли в денатурирующий буфер с 7 мкл реактива Эллмана, чтобы конечный объем смеси составлял 500 мкл, инкубировали в течение 5 мин и определяли поглощение при 412 нм. Концентрацию SH-групп в ферменте рассчитывали аналогично N-Ас-L-Cys.

Определение активности LdtMt2 и LdtMt2_cut с использованием нитроцефина

В настоящее время низкомолекулярные аналоги фрагмента клеточной стенки, которые могли быть удобными субстратами для определения активности фермента, не известны, поэтому активность LdtMt2 и его кинетику принято изучать с использованием хромогенного субстрата нитроцефина (рис. 2) [11].

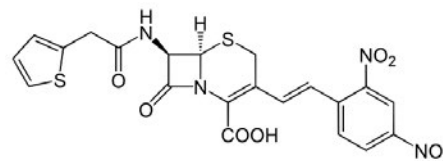


Рис. 2. Структурная формула нитроцефина – субстрата L,D-транспептидазы

Таблица 1. Результаты культивирования, выделения и очистки препаратов LdtMt2 и LdtMt2_cut

Препарат	Время экспрессии, ч	Масса клеток после центрифугирования, г	Концентрация белка в клеточных экстрактах, мг/мл	Масса очищенного фермента, мг
LdtMt2	4	–	–	1.2
	24	0.62	3.7	2.4
	48	0.86	4.1	2.4
LdtMt2_cut	4	–	–	0.8
	24	0.71	3.1	1.9
	48	0.95	3.8	1.9

Активность ферментных препаратов по отношению к нитроцефину определяли по величине абсорбции продукта гидролиза β-лактамного кольца при 486 нм в 0.02 М буфере HEPES pH 7.5 в присутствии 0.1 М KCl. Значение коэффициента экстинкции продукта принимали равным 20500 М⁻¹см⁻¹ [11].

Культивирование в восстанавливающих условиях для предотвращения инактивации фермента

Проведенные нами опыты по выделению и очистке LdtMt2 показали, что для получения активных препаратов фермента необходимо использовать восстанавливающие условия, которые препятствуют окислению каталитического остатка цистеина. С этой целью при культивировании продуцента за 3 ч до окончания экспрессии в среду добавляли дитиотреитол (DTT) до концентрации 6 мМ. Выделение фермента также проводили в присутствии DTT.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе получения препаратов LdtMt2 и LdtMt2_cut для выявления оптимальных условий по выходу целевого фермента проводили экспрессию в течение различных промежутков времени: 4, 24 и 48 ч. В табл. 1 представлены результаты выделения и очистки препаратов LdtMt2 и LdtMt2_cut. Оптимальным для препаративного выделения и очистки препаратов было культивирование в течение 24 ч: при сравнении с культивированием в течение 48 ч имеется не только выигрыш во времени, но и более высокий выход очищенного фермента по белку.

С помощью ПААГ-электрофореза показано, что посторонние белки не связываются на Ni-TED-колонках, а полученные препараты по молекулярной массе соответствуют LdtMt2 40.9 кДа (Ala55–Ala408 + His-tag) и LdtMt2_cut 31.3 кДа (Pro148–Ala408 + His-tag) и обладают высокой степенью чистоты (рис. 3). В то же время активность препарата LdtMt2, выделенного без добавления восстанавливающих агентов, по отношению к нитроцефину была существенно ниже ожидаемой.

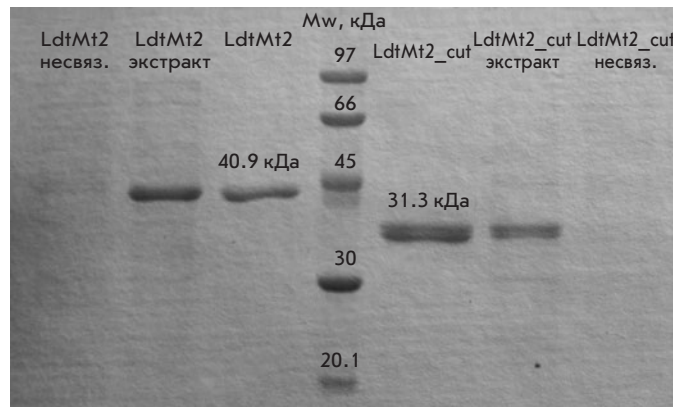


Рис. 3. ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях препаратов LdtMt2 40.9 кДа (Ala55–Ala408 + His-tag) и LdtMt2_cut 31.3 кДа (Pro148–Ala408 + His-tag), очищенных на Protino Ni-TED 1000, а также клеточных экстрактов и фракций, не связавшихся со смолой

Как показано ранее [11], каталитический остаток цистеина Cys354 способен подвергаться окислению, что может приводить к необратимой инактивации LdtMt2. Когда для предотвращения окисления каталитического остатка цистеина культивирование клеток *E. coli*, а также выделение фермента проводили в восстанавливающих условиях с добавлением в среду дитиотреитола (DTT), выход белка существенно не изменился и составил 1.8 ± 0.2 мг с 50 мл культуральной среды, однако каталитическая активность фермента оказалась существенно выше. Степень окисления SH-групп в препаратах LdtMt2 и LdtMt2_cut, полученных при культивировании и выделении фермента в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях, оценивали с использованием титрования SH-групп по методу Элмана. Полученные результаты представлены в табл. 2. Добавление DTT в культуральную среду и выделение фермента в восстанавливающих условиях позволило предотвратить окисление каталитического Cys354 и получить препарат LdtMt2 с почти в 2 раза более высокой удельной активностью.

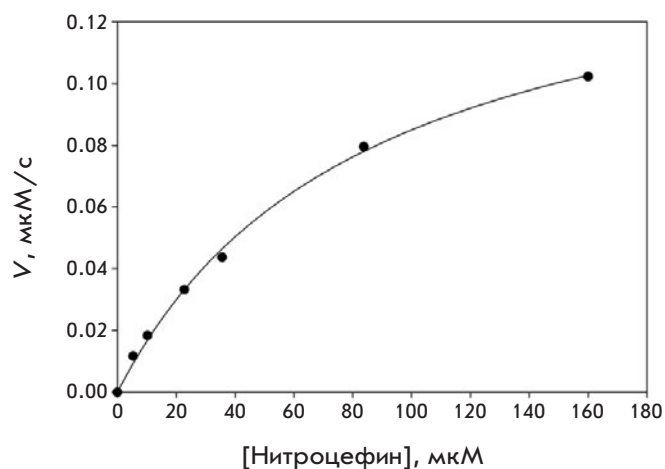


Рис. 4. Зависимость начальных скоростей катализируемой LdtMt2 реакции раскрытия β -лактамного кольца нитроцефина от концентрации нитроцефина. Точками представлены экспериментальные данные. При построении кривой использованы значения кинетических параметров, приведенные в тексте

Стоит также отметить, что очищенные препараты фермента были достаточно стабильными при хранении (4°C, pH 7.5, 20 мМ HEPES, 0.1 М KCl) и практически не теряли активности в течение месяца. Этот факт в значительной степени способствует использованию полученных ферментных препаратов для изучения их каталитических свойств и тестирования потенциальных ингибиторов.

Важной частью работы было получение ответа на вопрос о влиянии домена А на каталитическую активность фермента. Сравнение активностей LdtMt2 и LdtMt2_cut показало, что после удаления домена А удельная активность препарата полноразмерного фермента снижается более чем на порядок (см. табл. 3). Значения K_M и V_{max} реакции гидролиза нитроцефина, катализируемого LdtMt2 и LdtMt2_cut, определяли при анализе зависимости начальных скоростей от концентраций субстрата в интервале 5–160 мкМ (рис. 4). При определении значений каталитических констант ферментативной реакции и расчете концентрации активных центров фермента в препаратах LdtMt2 и LdtMt2_cut учитывали концентрацию свободных SH-групп. Падение активности полноразмерного фермента при удалении домена А в основном обусловлено снижением каталитической константы, которая при переходе от LdtMt2 к LdtMt2_cut в реакции превращения нитроцефина снижается от $0.98 \pm 0.05 \text{ с}^{-1}$ до $0.08 \pm 0.03 \text{ с}^{-1}$, в то время как значение константы Михаэлиса ухудшается незначительно – от 85 ± 7 до $102 \pm 10 \text{ мкМ}$ соответственно.

Таблица 2. Доля свободных SH-групп в препаратах LdtMt2, полученных без добавления и с добавлением 6 мМ DTT в среду во время культивирования

DTT, мМ	Доля свободных SH-групп [SH]/[LdtMt2], %
0	42 ± 2
6	72 ± 7

Таблица 3. Удельная активность препаратов LdtMt2 и LdtMt2_cut в реакции превращения нитроцефина в расчете на содержание белка в ферментном препарате и на содержание активных центров, учитывающее присутствие свободных SH-групп

Препарат	Удельная активность	
	на мг белка, мкмоль/(мин×мг)	на мкмоль SH-групп, мкмоль/(мин×мкмоль)
LdtMt2 (Ala55–Ala408)	0.65	30.6
LdtMt2_cut (Pro148–Ala408)	0.03	2.6

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная оптимизация условий экспрессии и очистки LdtMt2 показала, что наиболее продуктивным путем получения активных ферментных препаратов является культивирование клеток *E. coli* в течение 24 ч в среде LB в присутствии 0.2 мМ IPTG, 2 мМ CaCl₂ и своевременное добавление восстанавливающих агентов (DTT) для предотвращения окисления каталитического Cys354. Получен высокоочищенный препарат LdtMt2 *M. tuberculosis*, не теряющий активности как минимум в течение месяца при хранении в буферном растворе 20 мМ HEPES, pH 7.5 при 4°C, который можно использовать для экспериментального изучения потенциальных ингибиторов фермента, отобранных в результате компьютерного скрининга. Охарактеризованы биохимические и кинетические свойства препаратов полноразмерной LdtMt2 и LdtMt2_cut без домена А. Показано, что при удалении домена А, непосредственно не связанного с каталитическим доменом С, активность полноразмерного фермента существенно снижается (более чем на порядок), в основном из-за снижения каталитической константы превращения нитроцефина. Взаимодействие между доменами и их роль в проявлении функциональных свойств полноразмерного фермента требует дальнейшего изучения. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 15-14-00069).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global tuberculosis report 2016. // World Health Organization. 2016.
2. Betts J.C., Lukey P.T., Robb L.C., McAdam R.A., Duncan K. // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 43. № 3. P. 717–731.
3. Fisher J.F., Meroueh S.O., Mobashery S. // *Chem. Rev.* 2005. V. 105. № 2. P. 395–424.
4. Jankute M., Cox J.A.G., Harrison J., Besra G.S. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2015. V. 69. № 1. P. 405–423.
5. Magnet S., Dubost L., Marie A., Arthur M., Gutmann L. // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. № 13. P. 4782–4785.
6. Bielnicki J., Devedjiev Y., Derewenda U., Dauter Z., Joachimiak A., Derewenda Z.S. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2006. V. 62. № 1. P. 144–151.
7. Biarrotte-Sorin S., Hugonnet J.E., Delfosse V., Mainardi J.L., Gutmann L., Arthur M., Mayer C. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 359. № 3. P. 533–538.
8. Böth D., Steiner E.M., Stadler D., Lindqvist Y., Schnell R., Schneider G. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2013. V. 69. № 3. P. 432–441.
9. Kim H.S., Im H.N., An D.R., Yoon J.Y., Jang J.Y., Mobashery S., Heseck D., Lee M., Yoo J., Cui M., et al. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 41. P. 25103–25117.
10. Gupta R., Lavollay M., Mainardi J.L., Arthur M., Bishai W.R., Lamichhane G. // *Nat. Med.* 2010. V. 16. № 4. P. 466–469.
11. Erdemli S.B., Gupta R., Bishai W.R., Lamichhane G., Amzel L.M., Bianchet M.A. // *Structure.* 2012. V. 20. № 12. P. 2103–2115.
12. Kim H.S., Kim J., Im H.N., Yoon J.Y., An D.R., Yoon H.J., Kim J.Y., Min H.K., Kim S.J., Lee J.Y., et al. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2013. V. 69. № 3. P. 420–431.
13. Correale S., Ruggiero A., Capparelli R., Pedone E., Berisio R. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2013. V. 69. № 9. P. 1697–1706.
14. Dubée V., Triboulet S., Mainardi J.L., Ethève-Quellejeu M., Gutmann L., Marie A., Dubost L., Hugonnet J.E., Arthur M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. V. 56. № 8. P. 4189–4195.
15. Dhar N., Dubée V., Ballell L., Cuinet G., Hugonnet J.E., Signorino-Gelo F., Barros D., Arthur M., McKinney J.D. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. V. 59. № 2. P. 1308–1319.
16. Балдин С.М., Мисюра Н.М., Швядас В.К. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. № 1. P. 47–54.
17. Purification of His-tag proteins. // MACHEREY-NAGEL. 2014. V. Rev.06.
18. Itzhaki R.F., Gill D.M. // *Anal. Biochem.* 1964. V. 9. № 4. P. 401–410.
19. Ellman G.L. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1959. V. 82. № 1. P. 70–77.

УДК 577.15:544.3

Термодинамические параметры взаимодействия эндонуклеазы VIII с поврежденной ДНК

О. А. Кладова¹, Н. А. Кузнецов^{1,2*}, О. С. Федорова^{1,2*}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

²Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

*E-mail: fedorova@niboch.nsc.ru, nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 23.10.2018

Принята к печати 28.01.2019

РЕФЕРАТ Проведен термодинамический анализ взаимодействия эндонуклеазы VIII (Endo VIII) с модельными ДНК, содержащими поврежденные нуклеотиды, такие, как 5,6-дигидроуридин и 2-гидроксиметил-3-гидрокситетрагидрофуран (F-сайт). Методом «остановленного потока» при разных температурах с регистрацией изменений интенсивности флуоресценции остатка 1,3-диаза-2-оксофеноксазина, расположенного в комплементарной цепи напротив специфического сайта, проведен анализ кинетики фермент-субстратного взаимодействия. Рассчитаны изменения стандартной свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии для последовательных стадий ферментативного процесса, а также образования переходного состояния в каталитической стадии. Совокупный анализ кинетических и термодинамических данных о конформационных превращениях фермента Endo VIII и ДНК, протекающих в ходе их взаимодействия, позволил детализировать природу молекулярных процессов, происходящих на стадиях связывания субстрата, узнавания поврежденного основания и его удаления из ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ДНК-гликозилаза, кинетический механизм, предстационарная кинетика, термодинамика.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Endo VIII – эндонуклеаза VIII; AP-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт; F-сайт – остаток (2R,3S)-2-(гидроксиметил)-3-гидрокситетрагидрофурана; DHU – 5,6-дигидроуридин.

ВВЕДЕНИЕ

Эндонуклеаза VIII (Endo VIII, или Nei) – одна из основных ДНК-гликозилаз *Escherichia coli*, удаляющих широкий набор окисленных или восстановленных пиримидиновых оснований [1, 2]. Продуктами окисления/восстановления пиримидиновых оснований ДНК являются тимингликоль, 5,6-дигидротимин, 5,6-дигидроурацил, мочевины, 5-формилурацил, 5-оксиметилурацил, 5-гидроксицитозин, 5-гидроксиурацил, урацилгликоль и др. Endo VIII катализирует гидролиз N-гликозидной связи поврежденного основания (N-гликозилазная активность) и последующие реакции β-элиминирования 3'- и 5'-фосфатных групп апуринового/апиримидинового сайта (AP-лиазная активность), приводящие к образованию одноцепочечного разрыва в ДНК (рис. 1) [3, 4].

Анализ рентгеноструктурных данных свободного фермента и его комплекса с ДНК показал, что взаимодействие Endo VIII с ДНК приводит к конформационным изменениям как в молекуле белка, так и в молекуле субстрата [5, 6]. В фермент-субстратном комплексе происходит изгибание рибозо-

фосфатного остова ДНК примерно на 45°, поврежденное основание выворачивается из ДНК-спирали и располагается в активном центре фермента, а в образовавшуюся полость встраиваются аминокислотные остатки Gln69, Leu70 и Tyr71 (рис. 2). Такие изменения структуры взаимодействующих молекул приводят к образованию специфических контактов, результатом которых является высокоэффективное узнавание и связывание поврежденных участков ДНК.

Ранее методом «остановленного потока» с регистрацией изменения интенсивности флуоресценции



Рис. 1. Стадии процесса катализа Endo VIII. 1 – Гидролиз N-гликозидной связи и удаление поврежденного основания с образованием AP-сайта; 2 – β-элиминирование 3'-фосфатной группы; 3 – β-элиминирование 5'-фосфатной группы

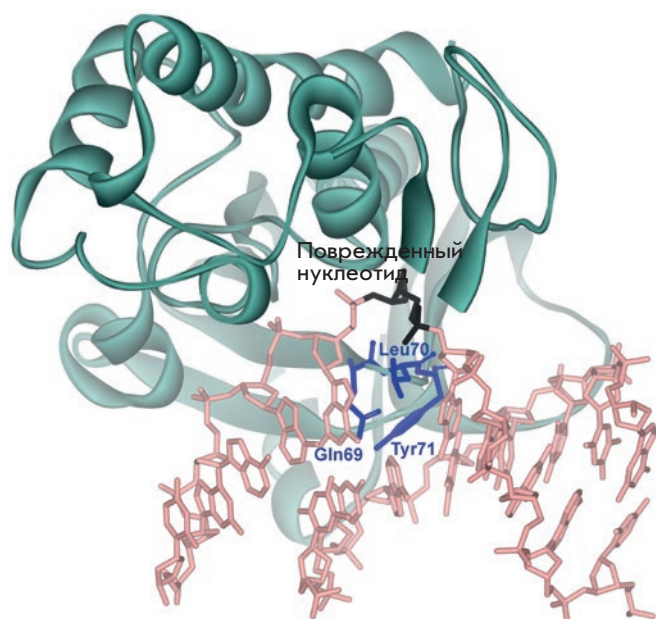
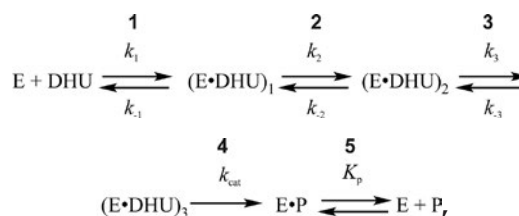


Рис. 2. Структура ковалентного комплекса фермента Endo VIII с дуплексом ДНК, содержащим AP-сайт (PDB ID 1K3W) [6]

остатков триптофана [7], входящих в состав фермента, и ряда флуоресцентных аналогов гетероциклических оснований в ДНК [8], расположенных с 5'-стороны или напротив поврежденного нуклеотида, был проведен кинетический анализ конформационных изменений в Endo VIII и ДНК-субстрате в ходе их взаимодействия. В дальнейшем [9] для уточнения природы последовательных стадий связывания ДНК мы использовали стратегию сайт-направленного мутагенеза. Совокупность кинетических данных, характеризующих конформационные изменения фермента и ДНК-субстратов, а также результатов мутационного анализа позволила предложить молекулярно-кинетический механизм узнавания повреждения ферментом Endo VIII (схема 1). Стадия 1 соответствует быстрому первоначальному связыванию ДНК и образованию неспецифического фермент-субстратного комплекса, в котором N- и C-домены фермента переходят в закрытое положение. На этой стадии остаток Leu70 вклинивается в ДНК-дуплекс, что является ключевым моментом узнавания поврежденного участка ДНК. Стадия 2 включает изгибание двойной спирали в месте поврежденного основания, выворачивание 5,6-дигидроурацила из дуплекса и встраивание остатка Tyr71 в ДНК-спираль, необходимое для стабилизации вывернутой конформации поврежденного основания. На стадии 3 происходит подстройка конформации активного центра для достижения каталитически-компетентного состояния. Остаток Tyr71 также принимает уча-

стие в стадии 3. На этой стадии образуются контакты между Phe121 и рибозо-фосфатным остовом ДНК. Формирование каталитического комплекса приводит к гидролизу N-гликозидной связи и последующей реакции β-элиминирования 3'- и 5'-фосфатных групп (стадия 4). Завершает ферментативный цикл диссоциация комплекса фермент-продукт (стадия 5).

Схема 1. Кинетический механизм взаимодействия Endo VIII с DHU-субстратом



где E – Endo VIII; DHU – DHU-субстрат; $(E \cdot \text{DHU})_n$ – различные фермент-субстратные комплексы, образующиеся в ходе узнавания 5,6-дигидроурацила; E · P – комплекс E с продуктом реакции P; k_j и k_{-j} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.

Для подтверждения кинетического механизма (схема 1) и уточнения природы отдельных стадий мы определили термодинамические параметры быстропротекающих стадий процесса взаимодействия Endo VIII с ДНК и специфического узнавания поврежденного нуклеотида, основываясь на кинетических параметрах, получаемых при разных температурах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигодезоксирибонуклеотиды

Олигонуклеотиды очищали с помощью ВЭЖХ на ионообменной колонке (PRP-X500 Hamilton Company 3.9×300 мм, размер частиц 12–30 мкм) и последующей обращенно-фазовой хроматографии (Nucleoprep 100-20 C₁₈ 10×250 мм, Macherey-Nagel, Германия). Чистоту олигонуклеотидов проверяли с помощью денатурирующего электрофореза в 20% полиакриламидном геле (ПААГ). Концентрацию олигонуклеотидов определяли по оптической плотности растворов на длине волны 260 нм в электронных спектрах поглощения и коэффициентов молярной экстинкции, рассчитанных в приближении метода «ближайших соседей» [10].

В качестве ДНК-субстратов использовали 17-звенные ДНК-дуплексы (табл. 1), содержащие в комплементарной цепи напротив специфического сайта вместо остатка цитозина флуорофор 1,3-диаза-2-оксофеноксазин (tC⁰). Специфическим сайтом служил остаток 5,6-дигидроуридина, выступающий в качестве поврежденного основания, и F-сайт, ко-

Таблица 1. Последовательность олигодезоксирибонуклеотидов в составе ДНК-дуплексов

Название	Последовательность
DHU-DNA , X = DHU	5'-TCTCTCTCXCTTCCTT-3' 3'-AGAGAGAG(tC ^o)GGAAGGAA-5'
F-DNA , X = F-сайт	
G-DNA , X = G	

торый является аналогом промежуточного продукта ферментативной реакции – апуринового/апиридинового сайта (AP-сайта). В качестве неповрежденной ДНК использовали дуплекс, не содержащий модифицированных нуклеотидов.

Эндонуклеаза VIII

Endo VIII выделена из линии клеток *E. coli* Rosetta II (DE3), трансформированных плазмидой pET-24b, несущей ген фермента. Культуру клеток *E. coli* Rosetta II (DE3) наращивали в среде LB (1 л), содержащей 50 мкг/мл ампициллина, при температуре 37°C до оптической плотности 0.6–0.7 при длине волны 600 нм. После этого температуру понижали до 30°C, транскрипцию индуцировали добавлением изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом до 0.2 мМ. После индукции культуру клеток инкубировали в течение 8 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием (10 мин, 12000 об/мин), и готовили суспензию клеток в 30 мл буферного раствора (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8, 40 мМ NaCl). Клетки лизировали при помощи френч-пресса (French Press Cell, Thermo Fisher Scientific, США). Все последующие процедуры проводили при 4°C. Лизат клеток центрифугировали (40 мин при 30 000 об/мин), супернатант наносили на колонку I (Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Швеция) и промывали буферным раствором (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8, 40 мМ NaCl). Фракции, содержащие белок, собирали и наносили на колонку II (HiTrap-Heparin™, Amersham Biosciences, Швеция). Хроматографию проводили в линейном градиенте 40 → 1500 мМ NaCl, оптическую плотность раствора регистрировали при длине волны 280 нм. Степень чистоты белка определяли с помощью гелеэлектрофореза. Фракции, содержащие белок Endo VIII, диализовали в буфере 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.5, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 250 мМ NaCl, 50% глицерин и хранили при –20°C. Концентрацию фермента рассчитывали из значения оптической плотности белка на длине волны 280 нм и коэффициента молярной экстинкции 32680 M⁻¹×см⁻¹ [11].

Кинетические исследования методом «остановленного потока»

Кинетические кривые регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции tC^o на спектрометре

остановленной струи SX.20 (Applied Photophysics, Великобритания). Длина волны возбуждения флуоресценции tC^o составляла 360 нм. Регистрацию флуоресценции проводили на длинах волн более 395 нм (Schott filter GG 395). Мертвое время прибора составляло 1.4 мс, максимальное время регистрации сигнала – 500 с. Все эксперименты выполнены в буферном растворе 50 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 50 мМ КСl, 1 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA, 7% глицерин при температурах от 5 до 25°C. Каждую кинетическую кривую усредняли, как минимум, по трем экспериментальным кривым.

Анализ кинетических кривых

Для расчета констант скорости конформационных переходов получали набор кинетических кривых для разных концентраций фермента при разных температурах. Интенсивность флуоресценции tC^o регистрировали в условиях, близких к «одному обороту фермента», т.е. при концентрациях фермента и субстрата одного порядка. Для определения минимальной кинетической схемы, описывающей взаимодействие фермента с субстратом, и расчета констант скорости всех элементарных реакций, соответствующих данной схеме, использовали программу DynaFit (BioKin, США) [12]. Количественную обработку результатов проводили путем оптимизации значений параметров, входящих в кинетические схемы, как описано ранее [13–16].

Используя полученные значения констант скорости прямых и обратных реакций для отдельных обратимых стадий, рассчитывали константы равновесия K_i этих стадий (K_i = k_i/k_{-i}, где i – номер стадии) для разных температур. Стандартные термодинамические параметры i-й равновесной стадии определяли с помощью уравнения Вант-Гоффа (1) [17, 18] как описано ранее [19–23].

$$\ln(K_i) = -\Delta G_i^{\circ}/RT = -\Delta H_i^{\circ}/RT + \Delta S_i^{\circ}/R. \quad (1)$$

Анализ температурной зависимости константы скорости химической реакции k_{cat} по уравнению Эйринга (2) позволил рассчитать стандартную энтропию активации (ΔH^{o,‡}) и стандартную энтропию активации (ΔS^{o,‡}), соответствующих образованию переходного состояния [17].

$$\ln(k_{cat}/T) = \ln(k_B/h) + (\Delta S^{\circ,\ddagger}/R) - (\Delta H^{\circ,\ddagger}/RT), \quad (2)$$

где k_B и h – постоянные Больцмана и Планка соответственно, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура в градусах Кельвина, k_{cat} – константа скорости необратимой каталитической стадии.

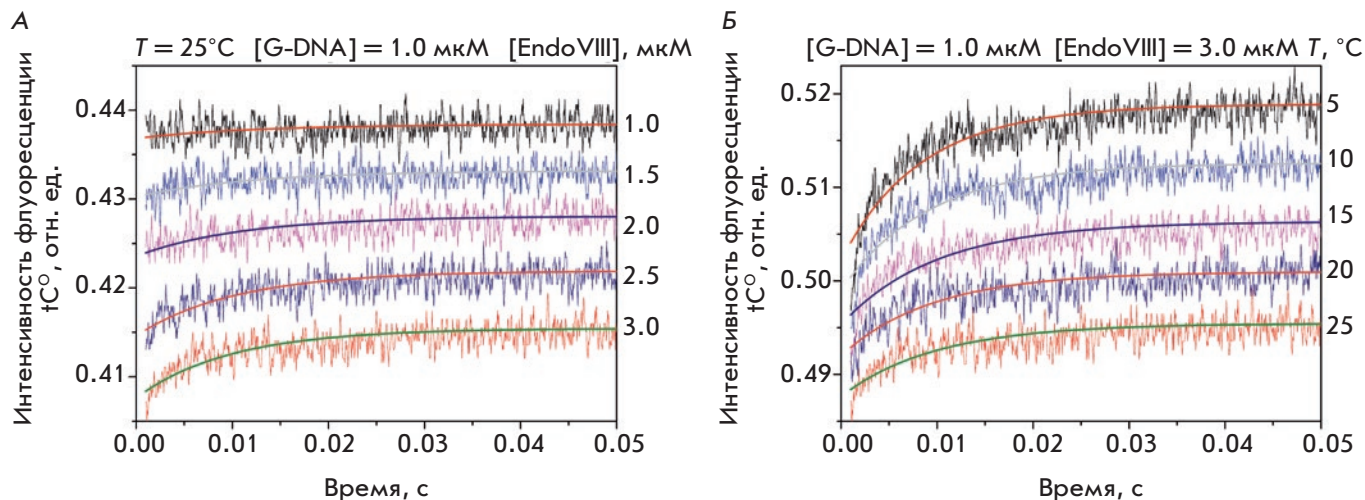


Рис. 3. Взаимодействие Endo VIII с неповрежденным дуплексом G-DNA. А – экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции tC° и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме 2. $[G-DNA] = 1.0 \text{ мкМ}$, концентрация Endo VIII изменяется от 1.0 до 3.0 мкМ. Б – сравнение кинетических кривых, полученных при взаимодействии 1.0 мкМ G-DNA и 3.0 мкМ Endo VIII при разных температурах

Таблица 2. Константа равновесия и константы скорости, характеризующие взаимодействие Endo VIII с неповрежденным дуплексом G-DNA

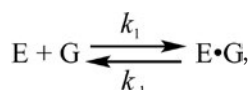
Константы	Температура, °С				
	5	10	15	20	25
$k_1, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$(16 \pm 7) \times 10^6$	$(16 \pm 8) \times 10^6$	$(15 \pm 9) \times 10^6$	$(14 \pm 6) \times 10^6$	$(9 \pm 2) \times 10^6$
k_{-1}, s^{-1}	50 ± 30	60 ± 40	50 ± 20	60 ± 40	40 ± 10
K_1, M^{-1}	$(0.31 \pm 0.21) \times 10^6$	$(0.26 \pm 0.21) \times 10^6$	$(0.29 \pm 0.20) \times 10^6$	$(0.25 \pm 0.18) \times 10^6$	$(0.19 \pm 0.08) \times 10^6$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие Endo VIII с неповрежденным ДНК-дуплексом G-DNA

На рис. 3А представлены кинетические кривые для процесса взаимодействия Endo VIII с ДНК-дуплексом G-DNA, содержащим остаток гуанина напротив флуорофорной группы tC° , полученные путем регистрации изменений интенсивности флуоресценции tC° в ходе реакции. На кинетических кривых можно выделить одну фазу роста интенсивности флуоресценции, которая выходит на плато. При увеличении температуры выход на плато данного изменения сдвигается с ~ 30 мс при 5 до ~ 20 мс при 25°C (рис. 3Б). Полученные кинетические кривые удовлетворительно описываются одностадийной равновесной кинетической схемой 2. Константы скорости, характеризующие эту стадию, представлены в табл. 2.

Схема 2. Кинетический механизм взаимодействия Endo VIII с неповрежденным ДНК-дуплексом



где E – фермент Endo VIII, G – ДНК-дуплекс, содержащий остаток гуанина напротив флуорофорной группы tC° , E · G – комплекс Endo VIII с ДНК-дуплексом, k_1 и k_{-1} – константы скорости прямой и обратной реакций.

Взаимодействие Endo VIII с аналогом AP-сайта F-DNA

Взаимодействие Endo VIII с AP-сайтом в ДНК изучено с использованием ДНК-дуплекса, содержащего нерасщепляемый аналог AP-сайта (производное тетрагидрофурана F) и флуорофорную группу tC° напротив повреждения в комплементарной цепи (рис. 4). На кинетических кривых, представленных на рис. 4, можно выделить две фазы роста интенсивности флуоресценции tC° . Первая фаза роста происходит в том же временном диапазоне (до ~ 20 мс), как и в случае взаимодействия с неповрежденным G-DNA. По-видимому, в начальный момент времени в структуре ДНК-дуплексов, содержащих и G-, и F-сайт, происходит одно и то же конформационное превращение, вызванное связыванием с Endo VIII. Однако в случае F-лиганда имеется вторая стадия роста интенсивности флуоресценции tC° , которая завершается к 1-й секунде при всех температурах (рис. 4). Кроме того,

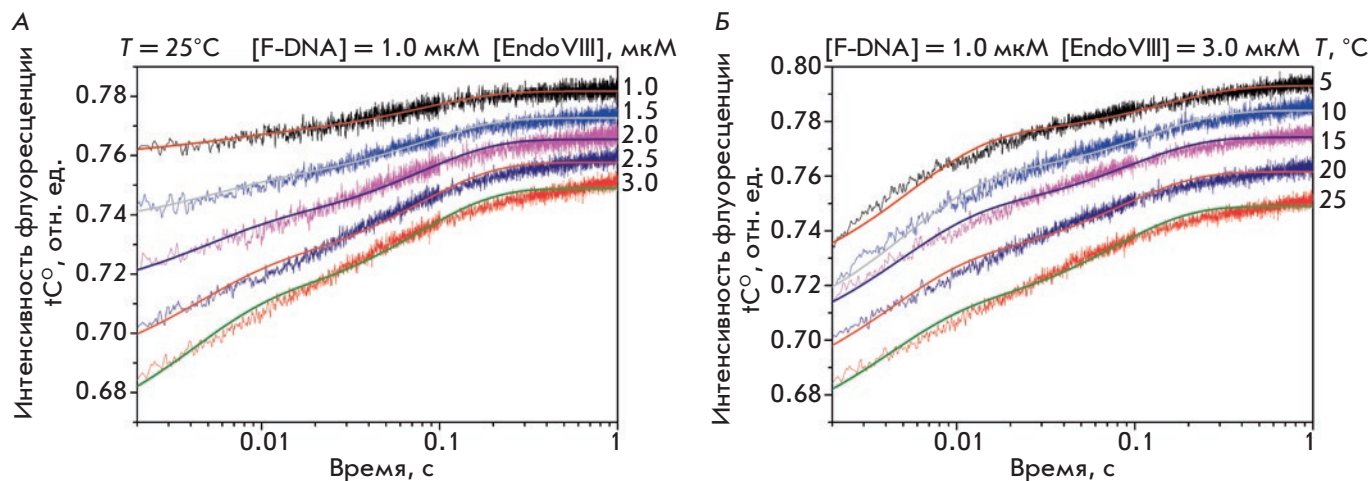


Рис. 4. Взаимодействие Endo VIII с F-DNA. А – экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции tC° и расчетные кривые, полученные в ходе обработки данных согласно схеме 3; $[F-DNA] = 1.0 \text{ мкМ}$, концентрация Endo VIII изменяется от 1.0 до 3.0 мкМ. Б – сравнение кинетических кривых, полученных при взаимодействии 1.0 мкМ F-DNA и 3.0 мкМ Endo VIII при разных температурах

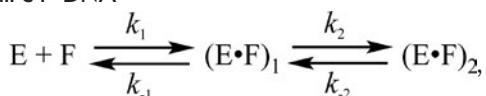
Таблица 3. Константы равновесия и константы скорости, характеризующие взаимодействие фермента Endo VIII и F-DNA

Константы	Температура, °С				
	5	10	15	20	25
$k_1, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$(35 \pm 9) \times 10^6$	$(35 \pm 5) \times 10^6$	$(37 \pm 5) \times 10^6$	$(39 \pm 5) \times 10^6$	$(40 \pm 8) \times 10^6$
k_{-1}, c^{-1}	89 ± 22	99 ± 18	109 ± 28	129 ± 43	144 ± 46
K_1, M^{-1}	$(0.4 \pm 0.1) \times 10^6$	$(0.35 \pm 0.08) \times 10^6$	$(0.3 \pm 0.1) \times 10^6$	$(0.3 \pm 0.1) \times 10^6$	$(0.3 \pm 0.1) \times 10^6$
k_2, c^{-1}	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.3	1.4 ± 0.2	3 ± 1	3 ± 1
k_{-2}, c^{-1}	7 ± 2	8 ± 1	10 ± 1	11 ± 1	12 ± 1
K_2	0.04 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.24 ± 0.09	0.26 ± 0.08

изменения на кинетических кривых взаимодействия F-содержащего ДНК-дуплекса с Endo VIII имеют большую амплитуду, чем в случае G-DNA, что может говорить как о большей эффективности образования комплекса между ферментом и ДНК, так и о более значительных конформационных перестройках в структуре ДНК-дуплекса, содержащего F-сайт.

В результате обработки полученных данных определена минимальная кинетическая схема реакции, включающая две обратимые стадии образования фермент-субстратного комплекса (схема 3). Рассчитанные константы скорости реакций и константы равновесия приведены в табл. 3.

Схема 3. Кинетический механизм взаимодействия Endo VIII с F-DNA



где E – фермент Endo VIII, F – ДНК-дуплекс, содержащий F-сайт напротив флуорофорной группы tC° , $(E \cdot F)_i$ – комплексы Endo VIII с F-DNA, k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакции каждой стадии.

Взаимодействие Endo VIII с DHU-DNA

На рис. 5А представлены кинетические кривые, полученные при взаимодействии Endo VIII с ДНК-субстратом, содержащим 5,6-дигидроуридин (DHU-DNA). Они имеют более сложный вид, чем в случае G-DNA и F-DNA. Во всех концентрационных сериях, полученных при разных температурах (5–25°C), можно выделить сходные изменения интенсивности флуоресценции tC° (рис. 5Б).

Анализ кинетических кривых, полученных при 5–15°C, показал, что на начальном участке (до 10 мс) происходит быстрый рост интенсивности флуоресценции tC° (фаза 1). При увеличении температуры это изменение интенсивности флуоресценции практически пропадает. Вслед за 1-й фазой роста можно выделить дальнейшее увеличение флуоресцентного сигнала при всех температурах. Длительность 2-й фазы роста снижалась с ростом температуры от ~300 мс при 5°C до ~80 мс при 25°C.

Известно, что при связывании Endo VIII с ДНК происходит нарушение структуры двойной спирали ДНК, выворачивание поврежденного нуклеотида и встраивание нескольких аминокислотных остатков

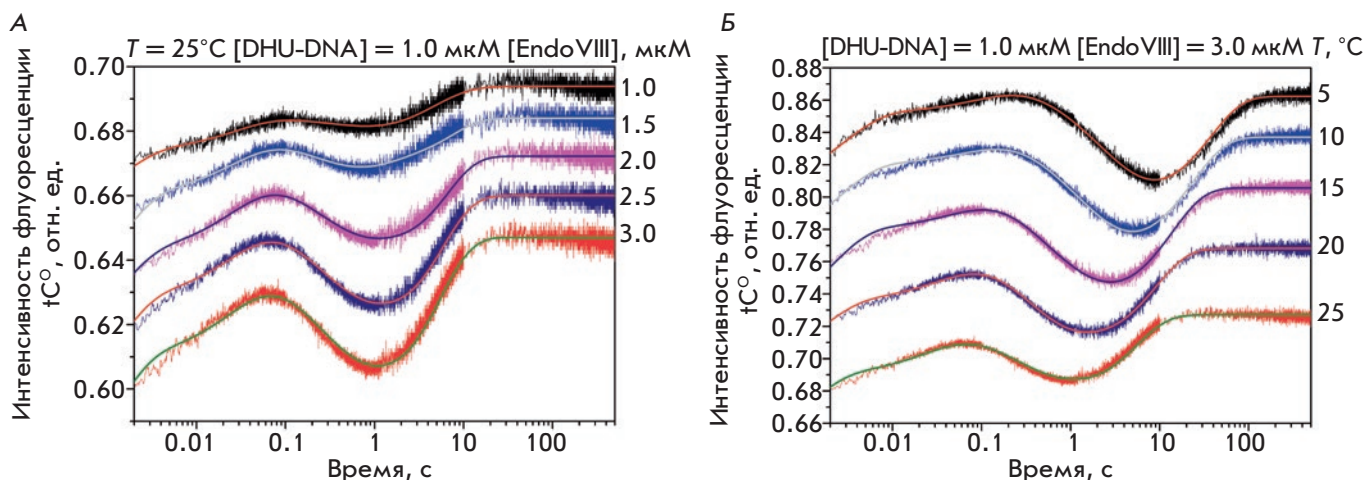


Рис. 5. Взаимодействие Endo VIII с DHU-DNA. А – экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции tC° и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме 1; [DHU-DNA] = 1.0 мкМ, концентрация Endo VIII изменяется от 1.0 до 3.0 мкМ. Б – сравнение кинетических кривых, полученных при взаимодействии 1.0 мкМ DHU-DNA и 3.0 мкМ Endo VIII при разных температурах

фермента в двойную цепь ДНК [6]. Endo VIII формирует обширную сеть контактов с ДНК, но при узнавании поврежденного нуклеотида наиболее значимы контакты, образуемые аминокислотными остатками триады Gln69–Leu70–Tyr71.

На всех полученных кривых можно выделить фазу падения интенсивности флуоресценции tC° (фаза 3). Эта фаза имеет выраженную зависимость от температуры. Так, при 5°C фаза падения интенсивности флуоресценции tC° длится до 10 с, а при 25°C лишь до 1 с. Такое изменение соответствует еще одной стадии, протекающей при образовании фермент-субстратного комплекса. Поскольку снижение интенсивности флуоресценции tC° указывает на изменение микроокружения данной флуорофорной группы, можно предположить, что в этот момент времени происходит подстройка конформаций фермента и ДНК для образования каталитически компетентного фермент-субстратного комплекса.

Вслед за падением интенсивности флуоресценции tC° наблюдается увеличение флуоресцентного сигнала (фаза 4), сопровождающееся выходом на плато (фаза 5). Скорее всего, 4-я фаза изменения интенсивности флуоресценции отражает каталитические стадии ферментативного процесса, а 5-я – диссоциацию комплекса фермента с продуктом реакции.

Таким образом, в кинетических кривых взаимодействия эндонуклеазы VIII с ДНК-субстратом, содержащим остаток 5,6-дигидроуридина, выявлены пять фаз изменения интенсивности флуоресценции tC° . Минимальная кинетическая схема, описывающая кинетические кривые, включает три обратимые стадии, ведущие к образованию фермент-субстрат-

ного комплекса, одну необратимую стадию, которую можно соотнести со стадией каталитической реакции, и одну обратимую стадию диссоциации комплекса фермент-продукт (схема 1). Рассчитанные значения констант скорости отдельных стадий и констант равновесия приведены в табл. 4.

Термодинамические параметры взаимодействия Endo VIII с ДНК-субстратами

Константы скорости отдельных стадий взаимодействия Endo VIII со всеми ДНК-субстратами при разных температурах использовали для расчета констант равновесия этих стадий (K_i). Константы равновесия отдельных стадий использовали для получения зависимости $\ln(K_i)$ от $1/T$ (уравнение Вант-Гоффа (1)) (рис. 6). Также получена зависимость $\ln(k_{cat}/T)$ от $1/T$ (уравнение Эйринга (2)), характеризующая необратимую каталитическую стадию в случае DHU-субстрата. Все зависимости имели линейный вид и позволили рассчитать изменения энтальпии и энтропии для обратимых стадий (ΔH_i° и ΔS_i°) и образования переходного состояния каталитической стадии (ΔH^{\ddagger} и ΔS^{\ddagger}) (табл. 5).

При анализе термодинамических параметров взаимодействия Endo VIII с ДНК-субстратами удалось выделить некоторые общие особенности. Так, первичное связывание всех использованных ДНК-субстратов с ферментом сопровождается небольшим уменьшением энтальпии и повышением энтропии. Это приводит к отрицательному значению изменения энергии Гиббса ΔG_1° для первой стадии образования фермент-субстратного комплекса. При этом величина $\Delta G_{1,298}^\circ$ имеет близкое значение (от -7.0 до -7.4 ккал/моль) как для поврежденной, так и неповреж-

Таблица 4. Константы равновесия и константы скорости, характеризующие взаимодействие фермента Endo VIII и DHU-DNA

Константы	Температура, °C				
	5	10	15	20	25
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	35±7	40±6	45±7	61±4	80±13
k_{-1}, c^{-1}	230±30	270±40	320±10	440±70	580±50
K_1, M^{-1}	$(0.149±0.038)×10^6$	$(0.147±0.032)×10^6$	$(0.140±0.023)×10^6$	$(0.140±0.025)×10^6$	$(0.138±0.027)×10^6$
k_2, c^{-1}	1.0±0.2	1.7±0.1	2.6±0.4	3.6±0.6	4±1
k_{-2}, c^{-1}	0.34±0.08	0.62±0.03	0.9±0.7	1.2±1	1.3±0.3
K_2	2.72±0.94	2.76±0.24	2.83±2	3.0±2.7	3.0±1
k_3, c^{-1}	6.5±1.4	8.1±0.6	12±2	18±4	29±3
k_{-3}, c^{-1}	1.6±0.3	1.9±0.6	2.5±0.6	3±1	4.4±1.6
K_3	4±1	4.3±1.4	4.6±1.3	5.3±1.9	6.6±2.5
k_{cat}, c^{-1}	0.06±0.02	0.09±0.05	0.15±0.05	0.22±0.08	0.34±0.02
$K_5, M^{-1} c^{-1}$	$(0.06±0.03)×10^6$	$(0.047±0.019)×10^6$	$(0.042±0.016)×10^6$	$(0.038±0.010)×10^6$	$(0.034±0.18)×10^6$

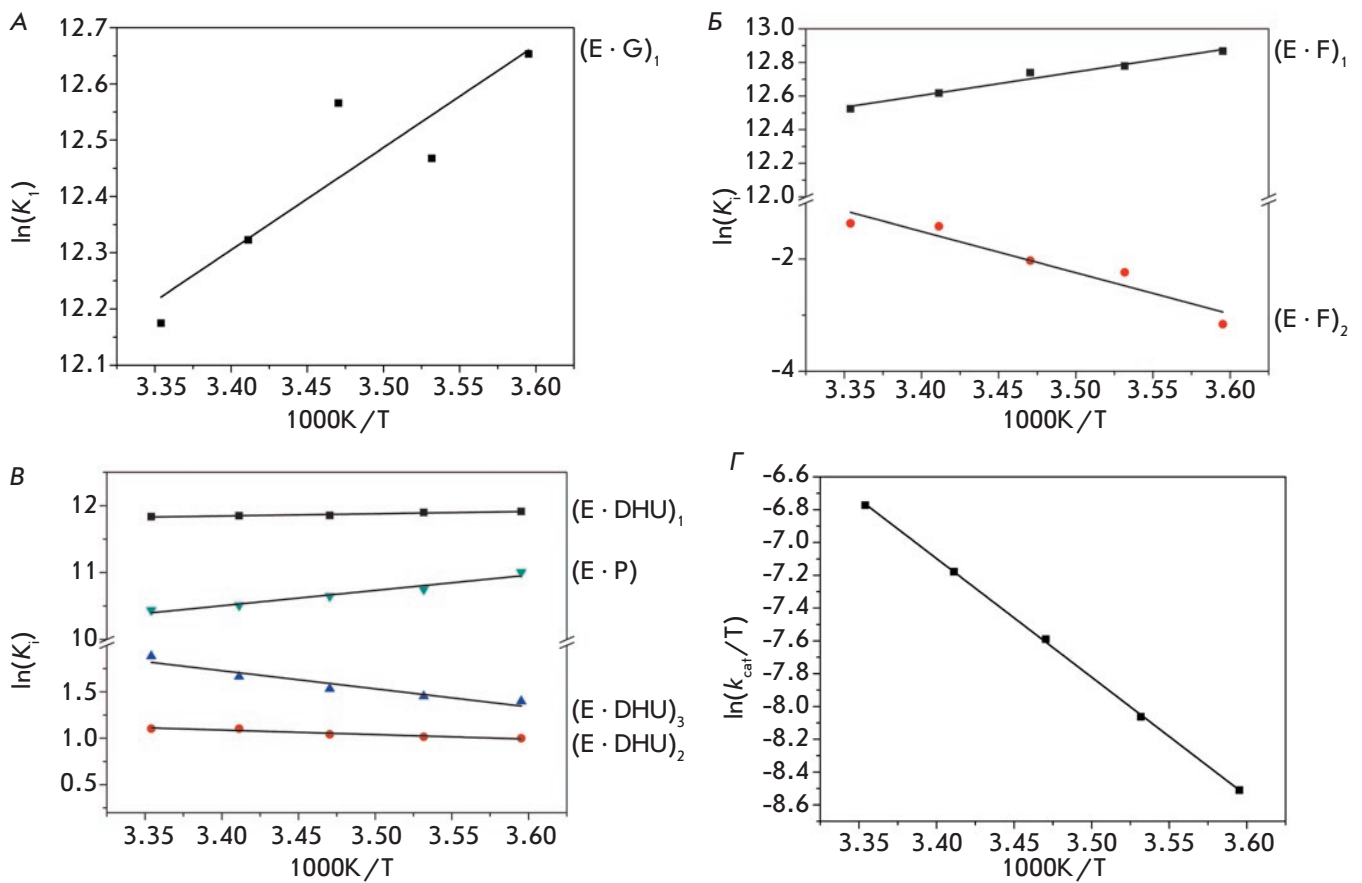


Рис. 6. Зависимость $\ln(K_i)$ от $1/T$, характеризующая различные стадии взаимодействия Endo VIII с неповрежденной G-DNA (А), F-DNA (Б) и DHU-DNA (В). Зависимость $\ln(k_{cat}/T)$ от $1/T$, характеризующая образование переходного состояния каталитической стадии при взаимодействии Endo VIII с DHU-субстратом (Г)

денной ДНК, что указывает на выгодное в энергетическом плане взаимодействие фермента с ДНК.

Величины термодинамических параметров первой стадии, полученные для G-DNA, F-DNA и DHU-DNA, свидетельствуют о том, что начальная стадия взаимодействия (до 10 мс) Endo VIII со всеми

ДНК-дуплексами представляет собой один и тот же процесс. На стадии первичного связывания не образуются специфические контакты с поврежденным нуклеотидом. Узнавание поврежденного нуклеотида происходит позднее – при его выворачивании из спирали ДНК и внедрении в спираль аминокис-

Таблица 5. Термодинамические параметры взаимодействия Endo VIII с ДНК-субстратами

ДНК-субстрат	Номер стадии	ΔH_1° , ккал/моль	ΔS_1° , кал/(моль×К)	$\Delta G_{i,298}^\circ$, ккал/моль	Описание стадии ^a
G/tC ^o	1	-3.6 ± 0.9	12 ± 3	-7.2	Первичное связывание, попытка вклинивания остатка Leu70, увеличение полярности окружения tC ^o
F/tC ^o	1	-2.8 ± 0.3	16 ± 1	-7.4	Первичное связывание, вклинивание остатка Leu70, увеличение полярности окружения tC ^o
	2	15 ± 3	47 ± 9	0.8	Изгибание двойной спирали, увеличение полярности окружения tC ^o
	$\sum_{i=1}^{i=2}$	12.2±3.3	60 ± 10	-6.6	
DHU/tC ^o	1	-0.7 ± 0.1	21.3 ± 0.4	-7.0	Первичное связывание, увеличение полярности окружения tC ^o
	2	1.0 ± 0.2	5.5 ± 0.6	-0.65	Изгибание двойной спирали, увеличение полярности окружения tC ^o
	3	3.9 ± 0.7	17 ± 2	-1.1	Образование каталитического комплекса, уменьшение полярности окружения tC ^o
	$\sum_{i=1}^{i=3}$	4.2	43.8	-8.75	
	4 ^b	14.4 ± 0.1	-12.4 ± 0.5	18	Катализ, увеличение полярности окружения tC ^o
	5	-4.5 ± 0.6	5 ± 2	-6.2	Образование комплекса с продуктом реакции, увеличение полярности окружения tC ^o

^aНа основании данных [7–9].

^bПараметры, рассчитанные по уравнению Эйринга (2).

лотных остатков «триады» Gln69–Leu70–Tyr71. Тем не менее, установлено [9], что Endo VIII использует Leu70 в качестве «сенса» повреждений, и его интеркаляция в структуру дуплекса происходит на ранних этапах специфического фермент-субстратного взаимодействия. Поэтому можно предположить, что рост интенсивности флуоресценции tC^o на начальном участке всех кинетических кривых отражает локальные конформационные изменения ДНК-дуплекса при вклинивании остатка Leu70 в двойную спираль.

Термодинамический анализ второй стадии связывания Endo VIII с ДНК-дуплексами, зарегистрированной в случае F- и DHU-содержащих дуплексов, выявил различие в протекании этой стадии. Положительное значение $\Delta G_{2,298}^\circ$ в случае F-DNA говорит о невыгодности этого процесса, который, по видимому, не протекает при низких температурах. В случае DHU-содержащего субстрата вторая стадия образования фермент-субстратного комплекса является энергетически нейтральной, значение $\Delta G_{2,298}^\circ$ составляет -0.65 ккал/моль. У обоих ДНК-дуплексов эта стадия сопровождается увеличением ΔH° и ΔS° . Согласно полученным ранее данным, на этой стадии происходит изгибание дуплекса, которое должно сопровождаться выворачиванием поврежденного нуклеотида в активный центр фер-

мента и полным встраиванием всех остатков триады Gln69–Leu70–Tyr71 в двойную спираль ДНК [8].

На третьей стадии взаимодействия Endo VIII с DHU-субстратом, которая предшествует каталитической реакции, происходит окончательная подстройка структуры активного центра для осуществления каталитической стадии. Значительный рост энтропии на этой стадии, скорее всего, связан с десольватацией полярных групп в области контакта фермент–ДНК, а также вытеснением молекул воды из бороздок ДНК-субстрата. Положительная величина изменения энтальпии ΔH° свидетельствует о затратах энергии для создания каталитически активной конформации. Затем следует необратимая каталитическая стадия (стадия 4), в ходе которой гидролизуется N-гликозидная связь с поврежденным основанием и в сахарофосфатном остове ДНК с 3'- и 5'-стороны от поврежденного нуклеотида образуется разрыв. Каталитическая стадия протекает с большими затратами энергии, на что указывают положительные значения $\Delta G_{298}^{\circ,\ddagger} = 18.0$ ккал/моль и $\Delta H^{\circ,\ddagger} = 14.4$ ккал/моль. Последняя стадия взаимодействия Endo VIII с DHU-содержащим субстратом – диссоциация комплекса фермента с продуктом. Необходимо отметить, что ΔG_{298}° (-6.2 ккал/моль) этой стадии имеет близкое значение с ΔG_{298}° первичного связывания ДНК (от -7.0 до -7.4 ккал/моль).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для всех использованных в работе ДНК-субстратов ДНК-гликозилазы Endo VIII зарегистрированы изменения интенсивности флуоресценции 1,3-диаза-2-оксофеноксазина tC° в составе пары $X:tC^{\circ}$ ($X = G, F, DHU$). Показано, что первая фаза роста интенсивности флуоресценции tC° присутствует на кинетических кривых, полученных со всеми использованными субстратами. Согласно полученным термодинамическим параметрам, эта стадия отражает одну и ту же стадию первичного связывания Endo VIII с ДНК. По данным [7–9], эта стадия представляет собой закрытие доменов фермента и попытку встраивания Leu70 в двойную спираль ДНК. Вторая фаза роста интенсивности флуоресценции зарегистрирована только в случае ДНК-дуплексов, несущих поврежденный нуклеотид F или DHU. Это изменение соответствует стадии образования второго фермент-субстратного комплекса. Вероятно, на этой стадии происходит выворачивание поврежденного нуклеотида в активный центр Endo VIII и встраивание аминокислотных остатков фермента Endo VIII в двойную спираль ДНК. У DHU-DNA эта стадия продолжается вплоть до 1 с. Интересно отметить, что при этом происходит рост и энтальпии, и энтропии, однако изменение энергии Гиббса $\Delta G_{i,298}^{\circ}$ на этой стадии близко к нулю (0.8 и -0.65 ккал/моль для F-DNA и DHU-DNA соответственно). Следовательно, энергетические затраты на изменение структуры молекул фермента и ДНК-субстрата компенсируются за счет роста энтропии системы. На кинетических кривых (рис. 5), полученных для DHU-

содержащего дуплекса, видно, что за двумя фазами роста интенсивности флуоресценции tC° следует фаза падения, отражающая образование третьего фермент-субстратного комплекса. На этой стадии осуществляется окончательная проверка строения поврежденного нуклеотида и формирование каталитически активного комплекса. Интенсивность флуоресценции tC° при этом становится минимальной, что говорит о формировании наиболее гидрофобного окружения флуорофорной группы. Кроме того, эта стадия сопровождается ростом энтропии, свидетельствующим, вероятно, о вытеснении молекул воды из области контакта фермент-субстрат и, следовательно, компактизации фермент-субстратного комплекса. Значения термодинамических параметров быстропротекающих стадий процесса взаимодействия Endo VIII с ДНК согласуются с ранее полученными данными о механизме узнавания и превращения специфического сайта ферментом [7–9]. Относительные изменения термодинамических параметров отдельных быстропротекающих стадий ферментативного процесса, катализируемого ДНК-гликозилазой Endo VIII, согласуются с величинами, полученными нами ранее для других ДНК-гликозилаз Fpg [19], hOGG1 [20] и Nth [22]. ●

Работа выполнена при поддержке бюджетного финансирования (№ VI.57.1.2, 0309-2016-0001).

За счет средств гранта РНФ № 18-14-00135 выполнен предстационарный кинетический анализ взаимодействия фермента с ДНК-субстратами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jiang D., Hatahet Z., Melamed R.J., Kow Y.W., Wallace S.S. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. № 51. P. 32230–32239.
- Melamed R.J., Hatahet Z., Kow Y.W., Ide H., Wallace S.S. // Biochemistry. 1994. V. 33. № 5. P. 1255–1264.
- Burgess S., Jaruga P., Dodson M.L., Dizdaroglu M., Lloyd R.S. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 25. P. 2938–2944.
- Kropachev K.Y., Zharkov D.O., Grollman A.P. // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 12039–12049.
- Golan G., Zharkov D.O., Feinberg H., Fernandes A.S., Zaika E.I., Kycia J.H., Grollman A.P., Shoham G. // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. № 15. P. 5006–5016.
- Zharkov D.O., Golan G., Gilboa R., Fernandes A.S., Gerchman S.E., Kycia J.H., Rieger R.A., Grollman A.P., Shoham G. // EMBO J. 2002. V. 21. № 4. P. 789–800.
- Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Fedorova O.S. // DNA Repair. 2012. V. 11. № 11. P. 884–891.
- Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Vorobjev Y.N., Barthes N.P.F., Michel B.Y., Burger A., Fedorova O.S. // PLoS One. 2014. V. 9. № 6. P. e100007.
- Kladova O.A., Kuznetsova A.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. // Genes (Basel). 2017. V. 8. № 5. P. 1–13.
- Fasman G.D. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 3rd Ed. // Cleveland: CRC Press, 1975.
- Gill S.C., von Hippel P.H. // Anal. Biochem. 1989. V. 182. P. 319–326.
- Kuzmic P. // Anal. Biochem. 1996. V. 237. P. 260–273.
- Yakovlev D.A., Kuznetsova A.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. // Acta Naturae. 2017. V. 9. № 1. P. 88–98.
- Kuznetsova A.A., Iakovlev D.A., Misovets I.V., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. // Mol. Biosyst. 2017. V. 13. № 12. P. 2638–2649.
- Kuznetsov N.A., Kiryutin A.S., Kuznetsova A.A., Panov M.S., Barsukova M.O., Yurkovskaya A.V., Fedorova O.S. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2017. V. 35. № 5. P. 950–967.
- Miroshnikova A.D., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. // Mol. BioSyst. 2016. V. 12. № 5. P. 1527–1539.
- Atkins P., Paula J. Atkins' Physical Chemistry. 8th Ed. // Oxford university press, 2006.
- Ragone R., Colonna G., Ambrosone L. // J. Phys. Chem. 1995. V. 99. № 34. P. 13050.
- Kuznetsov N.A., Vorobjev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. № 15. P. 7384–7392.
- Kuznetsov N.A., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. // PLoS One. 2014. V. 9. № 6. P. e98495.
- Miroshnikova A.D., Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. // Acta Naturae. 2016. V. 8. № 1. P. 103–110.
- Kladova O.A., Krasnoperov L.N., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. // Genes (Basel). 2018. V. 9. № 4. P. E190.
- Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. // Biochem. 2016. V. 81. № 10. P. 1136–1152.

УДК 615.371

Иммуногенность различных форм гликопротеина S коронавируса ближневосточного респираторного синдрома

Т. А. Ожаровская¹, О. В. Зубкова¹, И. В. Должикова¹, А. С. Громова¹, Д. М. Гроусова¹, А. И. Тухватулин¹, О. Попова¹, Д. В. Щепляков¹, Д. Н. Щербинин¹, А. Ш. Джаруллаева¹, А. С. Ерохова¹, М. М. Шмаров¹, С. Я. Логинова², С. В. Борисевич², Б. С. Народицкий¹, Д. Ю. Логунов¹, А. Л. Гинцбург¹

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

²«48 центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, Сергиев Посад, ул. Октябрьская, 11

*E-mail: logunov@gamaleya.org

Поступила в редакцию 30.11.2018

Принята к печати 30.01.2019

РЕФЕРАТ Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-КоВ) был идентифицирован в 2012 году во время первых вспышек ближневосточного респираторного синдрома (БВРС). БВРС-КоВ вызывает острую инфекцию нижних дыхательных путей у человека, летальность при которой составляет ~35%. Зарегистрированные средства профилактической и терапевтической защиты против БВРС в настоящее время отсутствуют. Гликопротеин S БВРС-КоВ играет важнейшую роль в интернализации вируса. Белок S является иммунодоминантным антигеном и основной мишенью для нейтрализующих антител. Нами проведено сравнение иммуногенности пяти различных форм гликопротеина S БВРС-КоВ: полноразмерного гликопротеина S, полноразмерного гликопротеина S с трансмембранным доменом гликопротеина G вируса VSV (S-G), рецепторсвязывающего домена RBD гликопротеина S, мембраносвязанного RBD (слитого с трансмембранным доменом гликопротеина G вируса VSV, RBD-G) и RBD, слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека (RBD-Fc). Для доставки использовали рекомбинантные векторы на основе аденовируса человека серотипа 5 (rAd5). Вакцинация мышей всеми разработанными векторами rAd5 позволила сформировать сбалансированный Th1/Th2-ответ. Наиболее мощный антительный ответ развивался при иммунизации животных мембраносвязанным RBD (rAd5-RBD-G). Формирование нейтрализующих антител у всех вакцинированных животных наблюдалось только при иммунизации мембранными формами гликопротеина (rAd5-S, rAd5-S-G и rAd5-RBD-G). Наиболее выраженный клеточный ответ развивался при иммунизации животных полноразмерным S (rAd5-S). Проведенные исследования позволяют предположить, что среди всех изученных форм гликопротеина S наиболее перспективными для включения в вакцину против БВРС являются полноразмерный S и мембранная форма RBD (RBD-G).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ближневосточный респираторный синдром, БВРС, БВРС-КоВ, гликопротеин, аденовирусный вектор, иммунитет.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 95% ДИ – 95% доверительный интервал; APC – аллофикоцианин; DPP4 – дипептидилпептидаза 4; Fc – кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина; rAd5 – рекомбинантный вектор на основе аденовируса человека серотипа 5; RBD – рецепторсвязывающий домен гликопротеина S БВРС-КоВ; RBD-Fc – рецепторсвязывающий домен гликопротеина S БВРС-КоВ, слитый с Fc IgG1 человека; RBD-G – рецепторсвязывающий домен гликопротеина S БВРС-КоВ, слитый с трансмембранным доменом гликопротеина G вируса везикулярного стоматита; S – гликопротеин БВРС-КоВ; S1, S2 – субъединицы гликопротеина S БВРС-КоВ; S-G – гликопротеин БВРС-КоВ с трансмембранным доменом гликопротеина G вируса везикулярного стоматита; Th – Т-хелперные клетки; VSV – вирус везикулярного стоматита; БВРС – ближневосточный респираторный синдром; БВРС-КоВ (MERS-CoV) – коронавирус ближневосточного респираторного синдрома;

БОЕ – бляшкообразующие единицы; **в.ч.** – вирусные частицы; **ГСТ** – геометрическое среднее титра антител; **ИФН-гамма** – интерферон-гамма; **ТМ** – трансмембранный домен/форма; **ТОРС** – тяжелый острый респираторный синдром; **ТОРС-КоВ** – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома; **ФСБ** – фосфатно-солевой буфер; **ФСБ-Т** – фосфатно-солевой буфер с 0.1% Твин 20; **ЭПР** – эндоплазматический ретикулум.

ВВЕДЕНИЕ

Ближневосточный респираторный синдром (БВРС) – острое воспалительное заболевание органов дыхания, впервые был диагностирован в июне 2012 года в Саудовской Аравии. В 2013 году вирус, вызывающий БВРС, официально назвали коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома – БВРС-КоВ [1, 2]. БВРС-КоВ представляет собой одноцепочечный РНК-вирус, принадлежащий к семейству Coronaviridae, род *Betacoronavirus*. БВРС-КоВ, природным резервуаром которого являются одногорбые верблюды, попадают в организм человека при употреблении непастеризованного молока верблюдов, возможна также передача вируса аэрозольным путем [3–5].

На сегодняшний день зарегистрировано 2260 лабораторно подтвержденных случаев инфекции БВРС-КоВ, из них 803 с летальным исходом [6, 7]. В связи с высокой смертностью (около 35%) [6], широким распространением резервуара инфекции, а также с отсутствием эффективных профилактических и терапевтических препаратов против БВРС, специалисты ВОЗ относят БВРС-КоВ к вирусам, потенциально способным вызывать пандемии [8], для предотвращения которых необходима разработка вакцинного препарата.

Гликопротеин S – основной протективный антиген БВРС-КоВ, формирует тримеры на поверхности оболочки вируса и играет важную роль в интернализации вируса в клетку [9]. Гликопротеин S состоит из двух субъединиц: S1, содержащей рецепторсвязывающий домен (RBD), и S2, опосредующей слияние мембран вируса и клетки [10–13]. Эти особенности делают белок S перспективной мишенью при разработке вакцин против БВРС [14–17]. Рецепторсвязывающий домен (RBD) гликопротеина S является ключевой мишенью при разработке профилактических и терапевтических препаратов против БВРС [18–20], так как он опосредует взаимодействие между вирусной частицей БВРС-КоВ и рецептором DPP4 на поверхности клетки.

Для разработки эффективной вакцины против БВРС важно понимать, какую форму гликопротеина необходимо использовать в составе вакцины, чтобы обеспечить защиту от БВРС. Опубликованы данные об иммуногенности различных форм гликопротеина БВРС-КоВ [21–25], но вопрос о том, что предпочтительнее выбрать для вакцины, остается открытым, поскольку панель антигенов не исследовали в одина-

ковых условиях. Чтобы устранить этот пробел, нами сконструированы пять рекомбинантных векторов на основе аденовируса человека серотипа 5 (rAd5), экспрессирующих различные варианты гликопротеина S БВРС-КоВ:

- полноразмерный гликопротеин S, который локализуется в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР);
- два секретлируемых варианта рецепторсвязывающего домена гликопротеина S, содержащих лидерный пептид щелочной фосфатазы (RBD и RBD, слитый с Fc IgG1 человека, для повышения стабильности и иммуногенности [18, 19]),
- две трансмембранные (ТМ) формы, локализованные в плазматической мембране клетки – полноразмерный S и RBD с ТМ-доменом гликопротеина G вируса везикулярного стоматита (VSV). Поскольку полноразмерный гликопротеин S локализуется в ЭПР [26], мы сконструировали вариант S-G с делетированным сигналом локализации в ЭПР.

Для доставки гликопротеина S выбрана платформа на основе рекомбинантных вирусных векторов rAd5, поскольку такие векторы способны осуществлять эффективную доставку трансгена во многие типы клеток [27, 28]; их геном полностью охарактеризован, они способны к росту до высоких титров [29], а также способны индуцировать мощный гуморальный и клеточный иммунный ответ [30, 31].

В настоящей работе представлены результаты сравнения гуморального и клеточного иммунного ответа, индуцированного вакцинацией мышей rAd5, несущих различные формы гликопротеина S БВРС-КоВ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии

Клетки HEK293 и A549 получены из Российской коллекции клеточных линий позвоночных (Россия), клетки HEK293T и Vero E6 получены из ATCC (США). Все клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, при 37°C в 5% CO₂.

Получение рекомбинантных аденовирусных частиц, экспрессирующих различные варианты гликопротеина S вируса БВРС-КоВ

Аминокислотные последовательности гликопротеина S БВРС-КоВ изолятов 2015–2017 годов получены из базы данных NCBI [32]. С использованием про-

граммы Geneious® 10.2.3 на основе аминокислотных последовательностей построена консенсусная последовательность гликопротеина S. Нуклеотидные последовательности, кодирующие различные формы гликопротеинов, были оптимизированы для экспрессии в клеточных линиях млекопитающих и синтезированы компанией «Евроген» (Россия). Получены пять рекомбинантных плазмид pAd5-S, pAd5-S-G, pAd5-RBD, pAd5-RBD-G и pAd5-RBD-Fc. rAd5 получали по методике, описанной ранее [33].

Получение лентивирусных частиц, псевдотипированных гликопротеином S БВРС-КоВ (псевдовирусов)

Для получения псевдовирусов клетки HEK293T высевали в 15-см культуральные чашки и котрансфицировали тремя плазмидами (pCMVΔR8,2; pLV-CMV-EGFP; pCMV-MERS-CoV-S). Спустя 72 ч супернатанты собирали, фильтровали, разливали в пробирки и замораживали при -80°C . Для титрования псевдовируса использовали клетки Vero E6. Титр псевдовируса выражали в единицах формирования фокусов флуоресценции (FFU, fluorescent forming units).

Определение экспрессии различных форм гликопротеина S вируса БВРС-КоВ методом вестерн-блоттинга

Клетки HEK293 высевали в 35-мм чашки Петри и инкубировали в течение ночи до 70% монослоя, после чего клетки обрабатывали rAd5 в количестве 100 БОЕ/клетку. rAd5-null использовали как контрольный вирус. Экспрессию различных форм гликопротеина вируса БВРС-КоВ определяли через 24 ч методом вестерн-блоттинга с использованием антител, специфичных к гликопротеину S (40069-RP02, Sino Biological, Китай), и антител, специфичных к IgG кролика (NA934V, GE, Великобритания). Экспрессию мембраносвязанных вариантов гликопротеина (S, S-G, RBD-G) детектировали в лизатах клеток, приготовленных с помощью буфера Cell Culture Lysis Reagent (Promega, США). Экспрессию секретируемых вариантов гликопротеина (RBD, RBD-Fc) детектировали в среде от клеток. На лунку наносили по 10 мкл образцов лизатов (10 мкг общего белка), образцы среды наносили в количестве 10 мкл на лунку.

Лабораторные животные

Все эксперименты на животных проводили в строгом соответствии с рекомендациями Национального стандарта Российской Федерации (ГОСТ 33044-2014, «Принципы надлежащей лабораторной практики»). Шестинедельные самки мышей C57/BL6 (18–20 г) были получены из питомника Пушино (Россия).

Мыши имели свободный доступ к воде и пище, размещались в системе содержания животных ISOcage (Tecniplast, Италия).

Иммунизация и сбор образцов сывороток

Мышей случайным образом распределяли по группам ($n = 5$ при анализе гуморального ответа, $n = 9$ при анализе клеточного ответа) и вакцинировали рекомбинантными аденовирусными частицами внутримышечно в дозе 10^8 в.ч./мышь в общем объеме 0.1 мл. Сыворотки собирали через 21 день после вакцинации для исследования титров S-специфических IgG.

Определение титра антител в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА)

Титр гликопротеин-специфических антител в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа. Использовали рекомбинантные белки: гликопротеин S (40069-V08B; Sino Biological) и RBD (40071-V08B1; Sino Biological). Блокирование мест неспецифического связывания проводили раствором ФСБ в 0.1% Твин 20 (ФСБ-Т), содержащем 5% обезжиренного молока (A0830; AppliChem, Испания). Сыворотки титровали двукратным шагом в растворе ФСБ-Т с 3% обезжиренным молоком. Для детекции использовали вторичные антитела, специфичные к IgG мыши и конъюгированные с пероксидазой хрена (для определения общего титра IgG – NXA931 (GE Healthcare, США); для IgG1 – ab97240 (Abcam, Великобритания); для IgG2a – ab97245 (Abcam); для IgG2b – ab97250 (Abcam); для IgG3 – ab97260 (Abcam)). Проявляли с использованием раствора тетраметилбензидина (НИИОПик, Россия). Реакцию останавливали добавлением 1 М H_2SO_4 , оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм (OD_{450}) на планшетном спектрофотометре Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific). Титр IgG определяли как максимальное разведение сыворотки, в котором значение OD_{450} сыворотки иммунизированного животного превосходит значение контрольной сыворотки более чем в 2 раза.

Реакция нейтрализации псевдовирионов (PsVNA)

Реакцию нейтрализации псевдовирионов (PsVNA) проводили по методике, описанной ранее [34]. Готовили разведения сывороток, инактивированных нагреванием: 1 : 10, 1 : 40, 1 : 160 и 1 : 640. Затем эти образцы смешивали с равным объемом среды DMEM, содержащим 10^5 FFU/мл псевдовирионов. Эту смесь инкубировали в течение 1 ч при 37°C , инокулировали на монослой клеток Vero E6 и инкубировали при 37°C в течение 42 ч. Затем подсчитывали количество фокусов флуоресцентных клеток EGFP. Титр нейтрализации псевдовирионов в сыворотке иммунизированного животного определяли как максимальное

разведение, при котором наблюдали 50% снижение количества фокусов флуоресцентных клеток EGFP по сравнению с сыворотками интактных (не вакцинированных) животных.

Анализ Т-клеточного ответа (лимфопролиферативный анализ)

Животных забивали на 8 день после иммунизации и отбирали селезенки, которые гомогенизировали через сито с диаметром пор 100 мкм в стерильном ФСБ. Спленоциты выделяли с помощью центрифугирования (800 g, 30 мин) на подушке раствора фиколла (1.09 г/мл, «ПанЭко», Россия). Для анализа пролиферации Т-клеток спленоциты окрашивали карбоксифлуоресцеином с использованием набора Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) tracer kit (Invitrogen, США) по описанной ранее методике [35]. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве 200000 клеток на лунку в среде RPMI1640, рестимулировали рекомбинантным S БВРС-КоВ (40071-V08B1; Sino Biological) в количестве 1 мкг/лунку. Через 3 дня клетки собирали, промывали ФСБ и окрашивали антителами, специфичными к CD3, CD4 и CD8: аллофикоцианин (APC)-меченные антитела к CD3, APC-Cy7-меченные антитела к CD8 и фикоэритрин-меченные антитела к CD4 (BD Biosciences, США), и фиксировали в растворе 1% параформальдегида. Пролиферирующие CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты определяли в клеточной смеси с использованием проточного цитофлуориметра BD FACS Aria III (BD Biosciences). Результирующий процент пролиферирующих клеток (X) рассчитывали по формуле $X = \%st - \%$, где $\%st$ – процент пролиферирующих клеток после рестимуляции спленоцитов рекомбинантным гликопротеином S вируса БВРС-КоВ, а $\%$ – процент пролиферирующих клеток без рестимуляции (интактных клеток).

Анализ продукции интерферона гамма (ИФН-гамма)

Спленоциты выделяли на 15 день после вакцинации по методике, описанной выше. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве 200000 клеток на лунку в среде RPMI1640, далее их рестимулировали рекомбинантным S БВРС-КоВ (40071-V08B1; Sino Biological) в количестве 1 мкг/лунку. Через 48 ч собирали надосадочную среду. Концентрацию ИФН-гамма в среде измеряли методом ИФА с помощью коммерческого набора (mouse IFN- γ ELISA kit; Invitrogen) по протоколу фирмы-производителя. Прирост концентрации ИФН-гамма определяли по формуле $X = Cst / Cint$, где X – прирост концентрации ИФН-гамма (разы), Cst – концентрация ИФН-гамма в среде от стимулированных клеток (пг/мл), Cint – концентрация ИФН-гамма в среде от нестимулированных (интактных) клеток (пг/мл).

Статистический анализ

Статистический анализ выполнен с использованием программного обеспечения GraphPad 7.0 (GraphPad Software, США). При анализе данных несвязанных выборок использовали критерий Стьюдента для независимых образцов или критерий Манна–Уитни в зависимости от нормальности распределения данных. Нормальность распределения определяли с помощью обобщенного теста Д’Агостино–Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение rAd5

Для определения и сравнения иммуногенности различных форм гликопротеина S вируса БВРС-КоВ нами получено пять rAd5: rAd5-S, rAd5-S-G, rAd5-RBD, rAd5-RBD-G и rAd5-RBD-Fc. Схемы целевых трансгенов в геномах rAd5 показаны на рис. 1А.

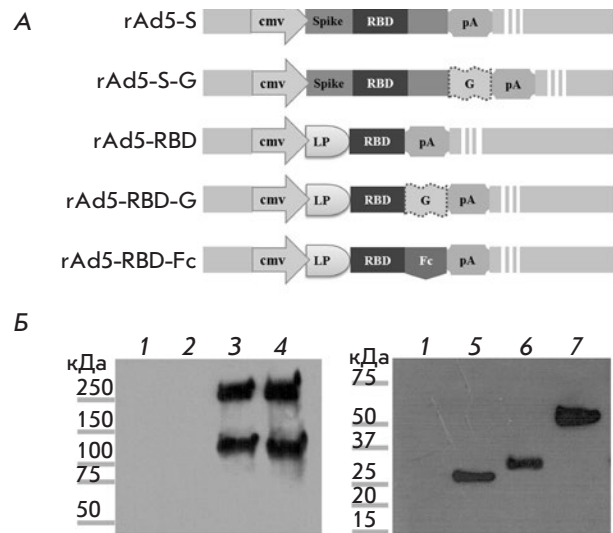


Рис. 1. А – схемы целевых трансгенов в геномах rAd5-S, rAd5-S-G, rAd5-RBD, rAd5-RBD-G и rAd5-RBD-Fc. cmv – промотор E1-области цитомегаловируса человека; G – ген гликопротеина G вируса везикулярного стоматита; LP – лидерная последовательность, опосредующая секрецию белка; pA – сигнал полиаденилирования; RBD – рецепторсвязывающий домен гликопротеина S БВРС-КоВ; Spike – гликопротеин S БВРС-КоВ. Б – Вестерн-блот-анализ вариантов гликопротеина S БВРС-КоВ, экспрессируемых каждым rAd5. Линия 1 – лизат клеток, обработанных контрольным rAd5-null; линия 2 – интактные клетки; линия 3 – лизат клеток, обработанных rAd5-S; линия 4 – лизат клеток, обработанных rAd5-S-G; линия 5 – среда от клеток, обработанных rAd5-RBD; линия 6 – лизат клеток, обработанных rAd5-RBD-G; линия 7 – среда от клеток, обработанных rAd5-RBD-Fc

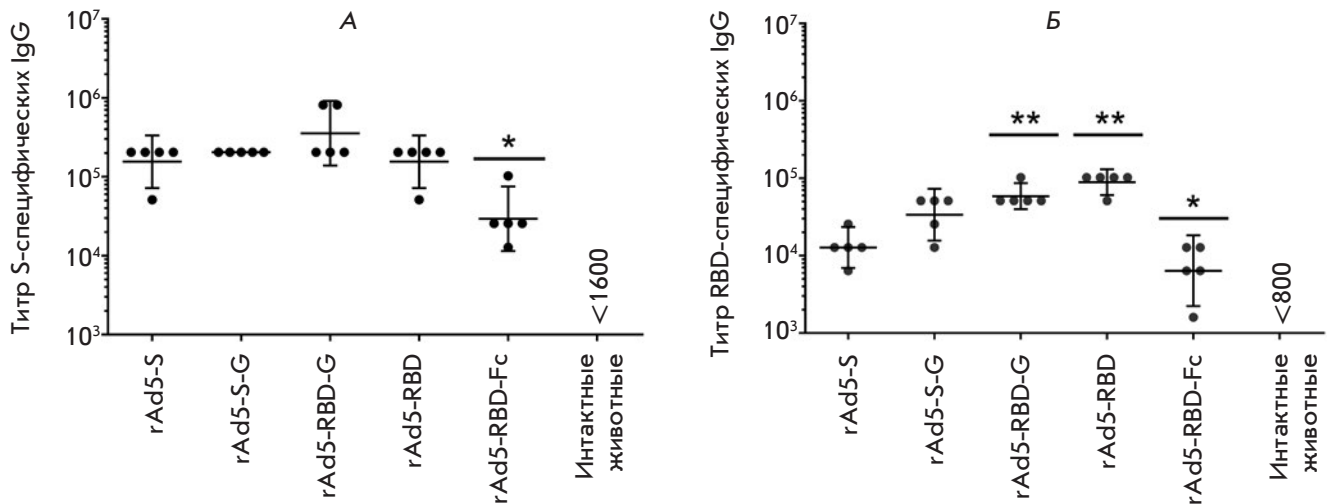


Рис. 2. Титры гликопротеин-специфических IgG в сыворотках крови иммунизированных животных. Представлены титры IgG, специфичных к гликопротеину S БВРС-КоВ (А) и к RBD (Б). Отмечено геометрическое среднее титра (ГСТ) и 95% доверительный интервал ГСТ для каждой группы ($n = 5$). Звездочки указывают на статистически значимые различия в титрах IgG между группами. * $p < 0.05$, сравнение rAd5-RBD-Fc с другими группами; ** $p < 0.05$, сравнение rAd5-RBD и rAd5-RBD-G с другими группами, за исключением rAd5-RBD и rAd5-RBD-G (тест Манна–Уитни)

Экспрессию различных форм гликопротеина S БВРС-КоВ анализировали методом вестерн-блоттинга (рис. 1Б). В образцах полноразмерного гликопротеина (rAd5-S и rAd5-S-G) белок S выявляли в виде двух полипептидов (рис. 1Б), причем верхняя полоса представляла собой гликозилированную форму белка S (~230–250 кДа), а нижняя (~100 кДа) – субъединицу S1, которая образуется в результате расщепления полноразмерного S протеазами клетки. Молекулярные массы полос превышали рассчитанные по нуклеотидной последовательности, что свидетельствует о предполагаемом гликозилировании белка [14, 16, 36–38]. В образцах RBD (RBD, RBD-G и RBD-Fc) выявлен единственный полипептид (рис. 1Б) с массой ~25, ~30 и ~55 кДа соответственно. Масса полипептидов на основе RBD соответствовала расчетным.

rAd5, экспрессирующие различные формы гликопротеина S вируса БВРС-КоВ, индуцируют формирование гуморального иммунного ответа

Мышей иммунизировали препаратами rAd5-S, rAd5-S-G, rAd5-RBD, rAd5-RBD-G и rAd5-RBD-Fc внутримышечно однократно в дозе 10⁸ в.ч. Через 3 недели после иммунизации собирали сыворотки крови мышей и анализировали титры антител, специфичных к гликопротеину S и к RBD (рис. 2). В сыворотке крови мышей контрольных групп (неиммунизированные и иммунизированные rAd5-null) гликопротеин-специфические IgG не обнаружены. Наибольший титр IgG, специфичных к гликопро-

теину S, наблюдали в группе животных, иммунизированных rAd5-RBD-G [геометрическое среднее титра (ГСТ): 356055; 95% доверительный интервал (ДИ): 139042–911772], наименьший – у животных, иммунизированных rAd5-RBD-Fc (ГСТ: 29407, 95% ДИ: 11455–75492) (рис. 2А). Анализ IgG, специфичных к RBD, показал, что наиболее иммуногенными были конструкции rAd5-RBD-G (ГСТ: 89144, 95% ДИ: 60665–130994) и rAd5-RBD (ГСТ: 58831, 95% ДИ: 40024–86424), а наименее иммуногенной – rAd5-RBD-Fc (ГСТ: 6400, 95% ДИ: 2230–18364). Статистически значимых различий в титрах IgG, специфичных к RBD, между группами rAd5-RBD и rAd5-RBD-G не обнаружено (рис. 2Б).

У мышей известно четыре изоформа IgG, которые отвечают за идентификацию и клиренс многих антигенов: IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 [39]. Определение титров изоформ IgG через 3 недели после иммунизации показало, что у всех иммунизированных животных представлены все четыре изоформа IgG (рис. 3). Значения титров IgG1, IgG2a и IgG2b для каждой группы иммунизированных животных составляли: rAd5-S (ГСТ: 409600, 409600 и 89144 соответственно), rAd5-S-G (ГСТ: 540470, 470506 и 155209 соответственно), rAd5-RBD (ГСТ: 540470, 713155 и 135118 соответственно) и rAd5-RBD-G (ГСТ: 356578, 713155 и 204800 соответственно). При этом не обнаружено статистически значимых различий в титрах изоформ IgG. После вакцинации rAd5-RBD-Fc значения титров IgG1, IgG2a и IgG2b были существенно ниже, чем в других группах (ГСТ: 102400, 89144 и 12800 со-

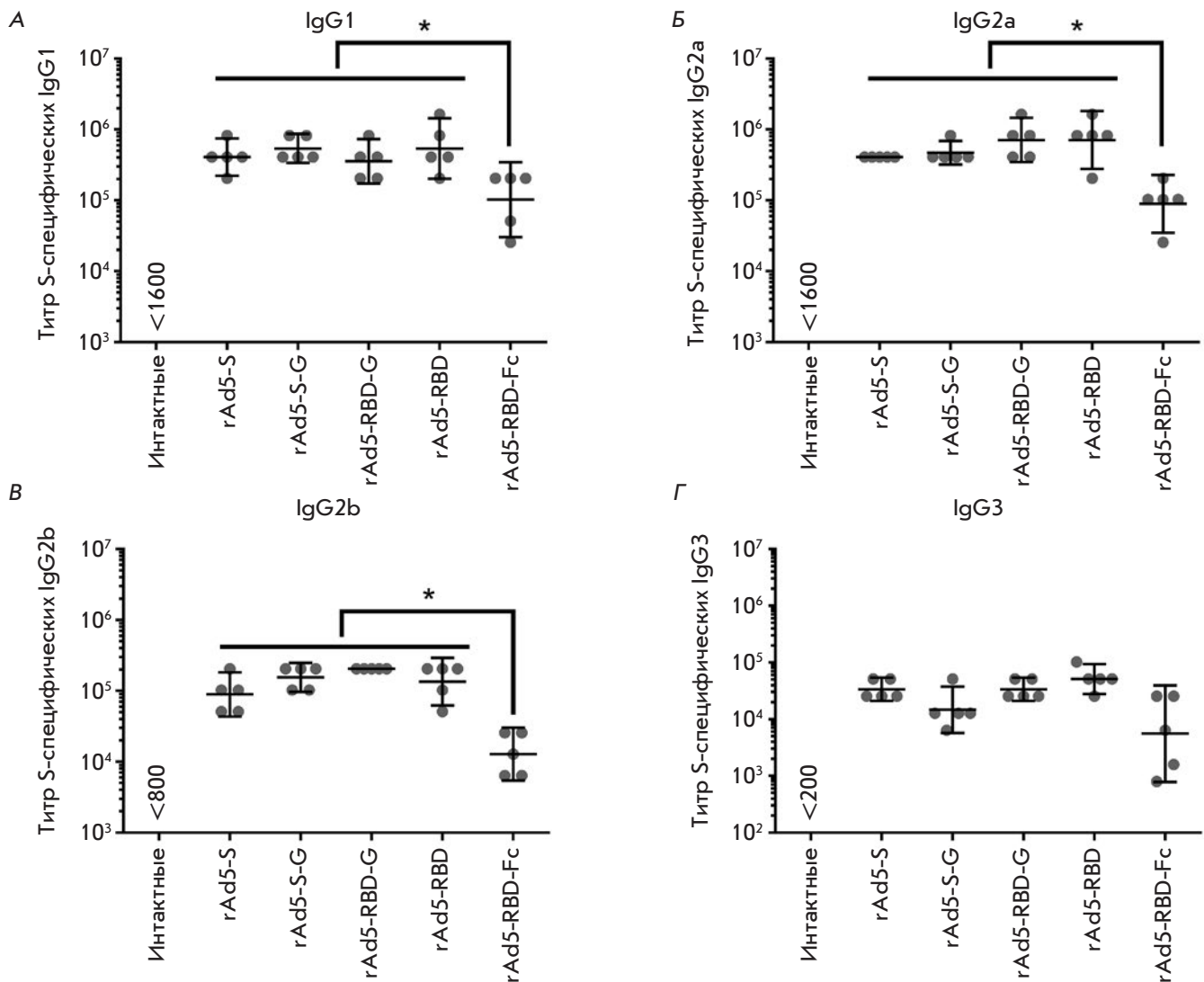


Рис. 3. Анализ изотипов IgG-антител у мышей после иммунизации rAd5, экспрессирующими различные формы гликопротеина S БВРС-КоВ. Представлены титры IgG1 (А), IgG2a (Б), IgG2b (В) и IgG3 (Г), специфичных к гликопротеину S БВРС-КоВ, в сыворотке иммунизированных животных. Отмечено геометрическое среднее титра (ГСТ) и 95% доверительный интервал ГСТ для каждой группы ($n = 5$). Звездочки указывают на статистически значимые различия в титрах IgG между группами. * $p < 0.05$, тест Манна–Уитни

ответственно). Титр IgG3 не различался существенно в группах (rAd5-S, rAd5-S-G, rAd5-RBD, rAd5-RBD-G и rAd5-RBD-Fc; ГСТ: 33779, 14703, 51200, 33779 и 5572 соответственно). Таким образом, согласно полученным данным, наибольший вклад в общий титр гликопротеин-специфических IgG вносят изотипы IgG1 и IgG2a.

rAd5, экспрессирующие мембранные формы гликопротеина БВРС-КоВ, вызывают выработку нейтрализующих антител у мышей

Определение титра нейтрализующих антител (в реакции нейтрализации псевдовироионов) показало,

что сыворотки крови всех мышей, иммунизированных rAd5-S, rAd5-S-G и rAd5-RBD-G, содержат нейтрализующие антитела (рис. 4) с ГСТ 1 : 121, 1 : 160 и 1 : 70 соответственно, без статистически значимой разницы в титрах ($p > 0.05$). В группе rAd5-RBD только у трех мышей из пяти обнаружены нейтрализующие антитела, тогда как в группах rAd5-RBD-Fc и у интактных животных нейтрализующие антитела не обнаружены. Таким образом, результаты проведенного эксперимента показали, что только иммунизация rAd5, экспрессирующими мембранные формы гликопротеина (S, S-G, RBD-G), позволяет индуцировать выработку нейтрализующих антител.

rAd5, экспрессирующие варианты S-белка БВРС-КоВ, индуцируют формирование клеточного иммунного ответа

Поствакцинальный клеточный иммунный ответ оценивали двумя методами – по количеству пролифе-

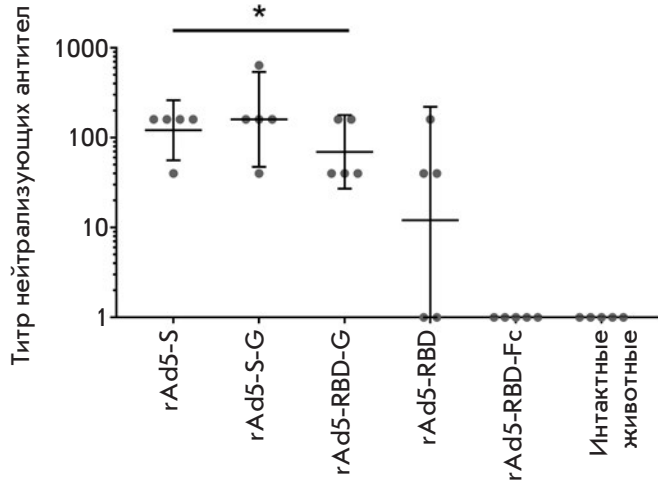


Рис. 4. Титры нейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных животных. Реакцию нейтрализации проводили с использованием лентивирусных частиц, псевдотипированных гликопротеином S БВРС-КоВ. Отмечено геометрическое среднее титра (ГСТ) и 95% доверительный интервал ГСТ для каждой группы ($n = 5$). Звездочки указывают на отсутствие значимых различий в титрах нейтрализующих антител между группами. * $p > 0.05$, тест Манна–Уитни

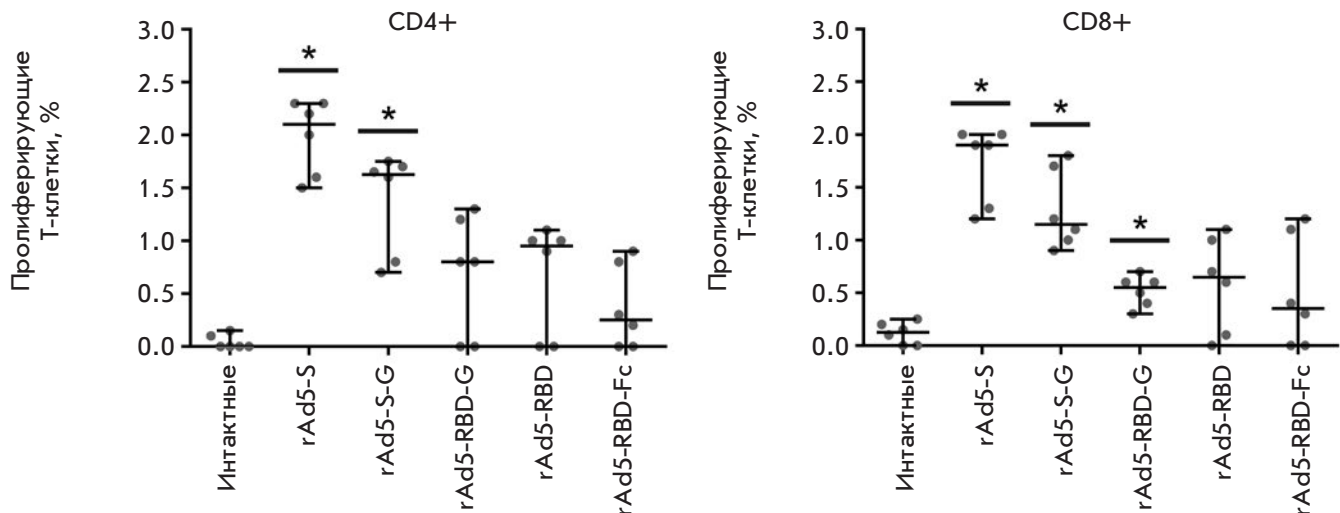


Рис. 5. Исследование лимфопролиферативной активности спленоцитов у иммунизированных мышей. По осям ординат отмечены уровни (%) пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ T-клеток, рестимулированных белком S БВРС-КоВ на 8-й день после вакцинации. Отмечены медианы пролиферирующих клеток (%) после рестимуляции и 95% ДИ медианы для каждой группы ($n = 6$). Звездочки указывают на статистически значимые различия в % пролиферирующих клеток между вакцинированными и интактными животными. * $p < 0.05$, тест Манна–Уитни

рирующих T-клеток и по продукции ИФН-гамма T-клетками в ответ на рестимуляцию гликопротеином. Повторную стимуляцию проводили с использованием полноразмерного S, так как он содержит наибольшее количество эпитопов и присутствует в вирусных частицах БВРС-КоВ.

Анализ пролиферации CD4⁺ клеток на 8-й день после вакцинации (рис. 5, слева) выявил наибольшую лимфопролиферативную активность в группе rAd5-S (2.10%) и наименьшую – в группе rAd5-RBD-Fc (0.25%). Статистически значимые различия в лимфопролиферативном ответе CD4⁺ клеток между группами иммунизированных и интактных животных наблюдали в группах rAd5-S (2.10%) и rAd5-S-G (1.63%). Анализ пролиферации CD8⁺ клеток (рис. 5, справа) выявил наибольшую лимфопролиферативную активность в группе rAd5-S (1.90%), наименьшую – в группе rAd5-RBD-Fc (0.35%). Статистически значимые различия в лимфопролиферативном ответе CD8⁺ клеток между группами иммунизированных и интактных животных наблюдали в группах rAd5-S (1.90%), rAd5-S-G (1.15%) и rAd5-RBD-G (0.55%). Исследование продукции ИФН-гамма спленоцитами после рестимуляции гликопротеином S БВРС-КоВ также показало, что наиболее выраженный клеточный иммунный ответ развивался у животных, иммунизированных rAd5-S и rAd5-S-G (рис. 6): прирост концентрации ИФН-гамма составил 15.12 ± 0.43 и 10.14 ± 0.97 раза относительно интактных клеток соответственно.

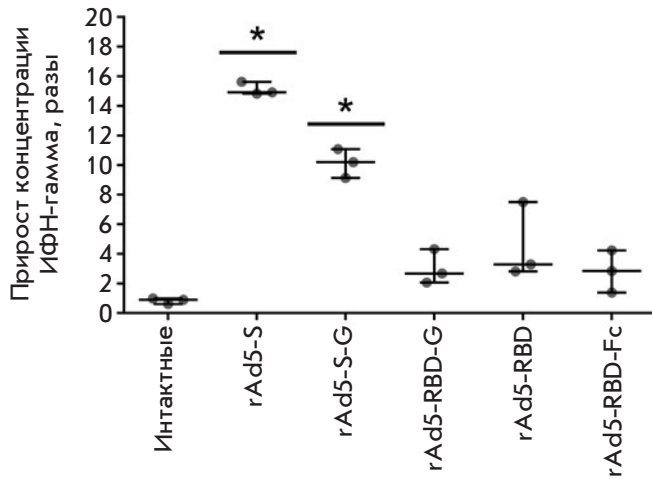


Рис. 6. Прирост концентрации ИФН-гамма в среде спленоцитов иммунизированных мышей после рестимуляции рекомбинантным полноразмерным белком S вируса БВРС-КоВ. Отмечены медианы прироста концентрации ИФН-гамма после рестимуляции и 95% ДИ медианы для каждой группы ($n = 3$). Звездочки указывают на статистически значимые различия в приросте концентрации ИФН-гамма между клетками от вакцинированных и интактных животных. * $p < 0.05$, тест Стьюдента для независимых выборок

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время не существует специфических профилактических и терапевтических средств против ближневосточного респираторного синдрома. Интенсивные исследования, направленные на разработку вакцин против этого заболевания, ведутся в США, Германии, Корее и других странах [40, 41]. Известно несколько кандидатных вакцин на основе гликопротеина БВРС-КоВ: вирусные векторы на основе рекомбинантных вирусов осповакцины, аденовируса, вируса кори и др., ДНК-вакцины, комбинированные кандидатные вакцины на основе ДНК и рекомбинантного белка, кандидатные вакцины на основе вирусоподобных частиц и рекомбинантных белков [22, 38, 41–46].

Ключевым моментом в разработке вакцины является выбор антигена. Большинство вакцин против БВРС основаны на использовании различных форм гликопротеина БВРС-КоВ (полноразмерный S, субъединица S1, RBD) [14–16, 18, 22, 24, 47–55] – основной мишени нейтрализующих антител. Однако вопрос о том, какую форму выбрать для получения эффективной вакцины, остается открытым. Известно, что использование полноразмерного S обеспечивает защиту 100% животных от летальной инфекции, вызванной БВРС-КоВ [44]. Однако некоторые авторы высказывают опасения по по-

ду использования полноразмерного S БВРС-КоВ в составе вакцины. Так сообщалось, что вакцина на основе полноразмерного гликопротеина коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС), который, как и БВРС-КоВ, относится к роду *Betacoronavirus*, приводит к развитию иммунопатологии в легких, обусловленной мощным антительным ответом на гликопротеин ТОРС-КоВ и слабым клеточным (Th2-поляризованный иммунный ответ) [56, 57].

Модификации гликопротеина в основном были направлены на то, чтобы в антиген входил рецепторсвязывающий домен гликопротеина. Показана иммуногенность S1-субъединицы, RBD или RBD, слитого с Fc-фрагментом IgG человека [15, 18, 19, 49, 58]. Исследования протективности препаратов на основе RBD (субъединичные вакцины) показали, что вакцинация RBD защищала ~80% животных от БВРС-КоВ, несмотря на высокие титры нейтрализующих антител, способных блокировать взаимодействия между вирусом и рецептором DPP4 на поверхности клетки [42, 59]. Отсутствие 100% защиты связано, по всей видимости, с необходимостью развития клеточного иммунного ответа, а также блокирования слияния мембран вируса и клетки, опосредованного S2-субъединицей. Кроме того, использование субъединичных, а также инактивированных вакцин не позволяет сформировать сбалансированный Th1/Th2-ответ и часто приводит к формированию Th2-поляризованного иммунного ответа [22, 42], развитие которого в случае БВРС может привести к иммунопатологии легких [48]. Поэтому при разработке вакцины против БВРС важно учитывать, что иммунитет, индуцированный вакциной, должен быть Th1/Th2-сбалансированным.

Исследовано множество антигенов на основе гликопротеина S БВРС-КоВ; однако не проводилось прямого сравнения этих антигенов в одинаковых условиях (с использованием одинаковых платформ для доставки антигенов). В настоящей работе проведено прямое сравнение иммуногенности пяти различных форм гликопротеина S БВРС-КоВ в одинаковых условиях, для доставки использовали rAd5. У животных, вакцинированных rAd5, экспрессирующими различные формы гликопротеина S БВРС-КоВ, развивался мощный антительный (преимущественно IgG1 и IgG2a) и T-клеточный ответ, причем каждый из вариантов rAd5 позволял сформировать сбалансированный Th1/Th2-ответ, что является одним из ключевых моментов в разработке вакцины против БВРС. Исследование напряженности гуморального иммунного ответа показало, что мембранная форма RBD (rAd5-RBD-G) вызывает более мощный IgG-ответ, чем другие исследуемые формы. Показано

также, что только мембранные формы гликопротеина БВРС-КоВ (rAd5-S, rAd5-S-G и rAd5-RBD-G) стимулировали выработку нейтрализующих антител. Исследование напряженности клеточного иммунного ответа показало, что наибольшей иммуногенностью обладают формы полноразмерного гликопротеина БВРС-КоВ (rAd5-S и rAd5-S-G).

Таким образом, результаты нашей работы позволяют предположить, что из всех изученных форм гликопротеина S БВРС-КоВ наибольший интерес для включения в вакцину представляют полноразмерный гликопротеин S и мембранная форма RBD (RBD-G).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе изучена иммуногенность пяти вариантов гликопротеина S вируса БВРС-КоВ у мышей. Для доставки антигенов использовали платформу на основе рекомбинантных аденовирусных векторов rAd5. Нами показано, что:

– наиболее мощный антителый ответ развивался при иммунизации животных мембраносвязанным RBD (rAd5-RBD-G);

– только мембранные формы гликопротеина БВРС-КоВ (rAd5-S, rAd5-S-G и rAd5-RBD-G) индуцировали выработку нейтрализующих антител у всех вакцинированных мышей;

– наиболее выраженный клеточный иммунный ответ развивался при иммунизации животных полноразмерным гликопротеином (rAd5-S);

– вакцинация мышей всеми разработанными векторами rAd5 позволила сформировать сбалансированный Th1/Th2-ответ. ●

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (номер государственного задания 056-00108-18-00).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанного с публикацией этой статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drosten C., Enjuanes L., Fouchier R.A.M., Galiano M., Gorbalenya A.E., Memish Z.A., et al. // J. Virol. 2013. V. 87. № 14. P. 7790–7792.
- Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. // N. Engl. J. Med. 2012. V. 367. № 19. P. 1814–1820.
- Memish Z.A., Cotten M., Meyer B., Watson S.J., Alshafiq A.J., Al Rabeeah A.A., Corman V.M., Sieberg A., Makhdoom H.Q., Assiri A., et al. // Emerg. Infect. Dis. 2014. V. 20. № 6. P. 1012–1015.
- Reusken C.B., Farag E.A., Jonges M., Godeke G.J., El-Sayed A.M., Pas S.D., Raj V.S., Mohran K.A., Moussa H.A., Ghobashy H., et al. // Euro. Surveill. 2014. V. 19. № 23. P. 1–5.
- Azhar E.I., Hashem A.M., El-Kafrawy S.A., Sohra S.S., Aburizaiza A.S., Farraja S.A., Hassan A.M., Al-Saeeda M.S., Jamjoom G.A., Madani T.A. // MBio. 2014. V. 5. № 4. P. 1–4.
- World Health Organisation | Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). <http://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>.
- Aly M., Elrobb M., Alzayer M., Aljuhani S., Balkhy H. // PLoS One. 2017. V. 12. № 10. P. 1–11.
- World Health Organisation | WHO Research and Development Blueprint: 2017 Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint. <http://www.who.int/blueprint/what/research-development/2017-Prioritization-Long-Report.pdf>.
- Qian Z., Dominguez S.R., Holmes K.V. // PLoS. One. 2013. V. 8. № 10. P. e76469.
- Millet J.K., Whittaker G.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 42. P. 15214–15219.
- Lu G., Wang Q., Gao G.F. // Trends Microbiol. 2015. V. 23. № 8. P. 468–478.
- Lu L., Liu Q., Zhu Y., Chan K.-H., Qin L., Li Y., Wang Q., Chan J.F.-W., Du L., Yu F., et al. // Nat. Commun. 2014. V. 5. № 3067. P. 1–12.
- Raj V.S., Mou H., Smits S.L., Dekkers D.H., Müller M.A., Dijkman R., Muth D., Demmers J.A., Zaki A., Fouchier R.A., et al. // Nature. 2013. V. 495. № 7440. P. 251–254.
- Song F., Fux R., Provacia L.B., Volz A., Eickmann M., Becker S., Osterhaus A.D., Haagmans B.L., Sutter G. // J. Virol. 2013. V. 87. № 21. P. 11950–11954.
- Kim E., Okada K., Kenniston T., Raj V.S., AlHajri M.M., Farag E.A.B.A., AlHajri F., Osterhaus A.D.M.E., Haagmans B.L., Gambotto A. // Vaccine. 2014. V. 32. № 45. P. 5975–5982.
- Guo X., Deng Y., Chen H., Lan J., Wang W., Zou X., Hung T., Lu Z., Tan W. // Immunology. 2015. V. 145. № 4. P. 476–484.
- Liu R., Wang J., Shao Y., Wang X., Zhang H., Shuai L., Ge J., Wen Z., Bu Z. // Antiviral Res. 2018. V. 150. P. 30–38.
- Du L., Kou Z., Ma C., Tao X., Wang L., Zhao G., Chen Y., Yu F., Tseng C.T.K., Zhou Y., Jiang S. // PLoS One. 2013. V. 8. № 12. P. 2–10.
- Du L., Zhao G., Kou Z., Ma C., Sun S., Poon V.K.M., Lu L., Wang L., Debnath A.K., Zheng B.-J., et al. // J. Virol. 2013. V. 87. № 17. P. 9939–9942.
- Ma C., Li Y., Wang L., Zhao G., Tao X., Tseng C.T.K., Zhou Y., Du L., Jiang S. // Vaccine. 2014. V. 32. № 18. P. 2100–2108.
- Al-Amri S.S., Abbas A.T., Siddiq L.A., Alghamdi A., Sanki M.A., Al-Muhanna M.K., Alhabbab R.Y., Azhar E.I., Li X., Hashem A.M. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 44875. P. 1–8.
- Ma C., Wang L., Tao X., Zhang N., Yang Y., Tseng C.T.K., Li F., Zhou Y., Jiang S., Du L. // Vaccine. 2014. V. 32. № 46. P. 6170–6176.
- Pallesen J., Wang N., Corbett K.S., Wrapp D., Kirchdoerfer R.N., Turner H.L., Cottrell C.A., Becker M.M., Wang L., Shi W., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. № 35. P. E7348–E7353.
- Wang L., Shi W., Joyce M.G., Modjarrad K., Zhang Y., Leung K., Lees C.R., Zhou T., Yassine H.M., Kanekiyo M., et al. // Nat. Commun. 2015. V. 6. P. 7712.
- Zhang N., Channappanavar R., Ma C., Wang L., Tang J., Garron T., Tao X., Tasneem S., Lu L., Tseng C.T., Zhou Y., Perlman S., Jiang S., Du L. // Cell. Mol. Immunol. 2016. V. 13. № 2. P. 180–190.
- Du L., Yang Y., Zhou Y., Lu L., Li F., Jiang S. // Expert Opin. Ther. Targets. 2017. V. 21. № 2. P. 131–143.
- Appaiahgari M.B., Vrati S. // Expert Opin. Biol. Ther. 2015. V. 15. № 3. P. 337–351.

28. Benihoud K., Yeh P., Perricaudet M. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999. V. 10. № 5. P. 440–447.
29. Kamen A., Henry O. // *J. Gene Med.* V. 6. P. 184–192.
30. Muruve D.A. // *Hum. Gene Ther.* 2004. V. 15. № 12. P. 1157–1166.
31. Dolzhikova I.V., Tokarskaya E.A., Dzharullaeva A.S., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Voronina O.L., Syromyatnikova S.I., Borisevich S.V., Pantyukhov V.B., Babira V.F., et al. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. № 3. P. 4–11.
32. Hatcher E.L., Zhdanov S.A., Bao Y., Blinkova O., Nawrocki E.P., Ostapchuck Y., Schäffer A.A., Brister J.R. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № D1. P. D482–D490.
33. Gribova I.Y., Tillib S.V., Tutykhina I.L., Shmarov C.E., Logunov D.Y., Verkhovskaya L.V., Naroditskii B.S., Gintsburg A.L. // *Acta Naturae.* 2011. V. 3. № 3. P. 64–70.
34. Grehan K., Ferrara F., Temperton N. // *Methods X.* 2015. V. 2. P. 379–384.
35. Quah B.J., Warren H.S., Parish C.R. // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. № 9. P. 2049–2056.
36. Chi H., Zheng X., Wang X., Wang C., Wang H., Gai W., Perlman S., Yang S., Zhao J., Xia X. // *Vaccine.* 2017. V. 35. № 16. P. 2069–2075.
37. Deng Y., Lan J., Bao L., Huang B., Ye F., Chen Y., Yao Y., Wang W., Qin C., Tan W. // *Emerg. Microbes Infect.* 2018. V. 7. № 60. P. 1–10.
38. Nyon M.P., Du L., Tseng C.K., Seid C.A., Pollet J., Naceaneno K.S., Agrawal A., Algaissi A., Peng B.H., Tai W., et al. // *Vaccine.* 2018. V. 36. № 14. P. 1853–1862.
39. Snapper C.M., Mond J.J. // *Immunol. Today.* 1993. V. 14. № 1. P. 15–17.
40. Perlman S., Vijay R. // *Int. J. Infect. Dis.* 2016. V. 47. P. 23–28.
41. Okba N.M., Raj V.S., Haagmans B.L. // *Curr. Opin. Virol.* 2017. V. 23. P. 49–58.
42. Tai W., Zhao G., Sun S., Guo Y., Wang Y., Tao X., Tseng C.K., Li F., Jiang S., Du L., Zhou Y. // *Virology.* 2016. V. 499. P. 375–382.
43. Alharbi N.K., Padron-Regalado E., Thompson C.P., Kupke A., Wells D., Sloan M.A., Grehan K., Temperton N., Lambe T., Warimwe G., et al. // *Vaccine.* 2017. V. 35. № 30. P. 3780–3788.
44. Munster V.J., Wells D., Lambe T., Wright D., Fischer R.J., Bushmaker T., Saturday G., van Doremalen N., Gilbert S.C., De Wit E., et al. // *NPJ. Vaccines.* 2017. V. 2. P. 28.
45. Malczyk A.H., Kupke A., Prüfer S., Scheuplein V.A., Hutzler S., Kreuz D., Beissert T., Bauer S., Hubich-Rau S., Tondera C., et al. // *J. Virol.* 2015. V. 89. № 22. P. 11654–11667.
46. Lan J., Deng Y., Song J., Huang B., Wang W., Tan W. // *Virol. Sin.* 2018. V. 33. № 5. P. 453–455.
47. Modjarrad K. // *Vaccine.* 2016. V. 34. № 26. P. 2982–2987.
48. Agrawal A.S., Tao X., Algaissi A., Garron T., Narayanan K., Peng B.H., Couch R.B., Tseng C.T.K. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016. V. 12. № 9. P. 2351–2356.
49. Coleman C.M., Liu Y.V., Mu H., Taylor J.K., Massare M., Flyer D.C., Glenn G.M., Smith G.E., Frieman M.B. // *Vaccine.* 2014. V. 32. № 26. P. 3169–3174.
50. Haagmans B.L., van den Brand J.M.A., Raj V.S., Volz A., Wohlsein P., Smits S.L., Schipper D., Bestebroer T.M., Okba N., Fux R., et al. // *Science.* 2016. V. 351. № 6268. P. 77–81.
51. Lan J., Deng Y., Chen H., Lu G., Wang W., Guo X., Lu Z., Gao G.F., Tan W. // *PLoS. One.* 2014. V. 9. № 11. P. 1–9.
52. Mou H., Raj V.S., van Kuppeveld F.J.M., Rottier P.J.M., Haagmans B.L., Bosch B.J. // *J. Virol.* V. 87. № 16. P. 9379–9383.
53. Muthumani K., Falzarano D., Reuschel E.L., Tingey C., Flin-gai S., Villarreal D.O., Wise M., Patel A., Izmirly A., Aljuaid A., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2015. V. 7. № 301. P. 1–29.
54. Yang Y., Deng Y., Wen B., Wang H., Meng X., Lan J., Gao G.F., Tan W. // *Viral Immunol.* 2014. V. 27. № 10. P. 543–550.
55. Zhao J., Li K., Wohlford-Lenane C., Agnihothram S.S., Fett C., Zhao J., Gale Jr. M.J., Baric R.S., Enjuanes L., Gallagher T., McCray Jr. P.B., Perlmana S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 13. P. 4970–4975.
56. Iwata-Yoshikawa N., Uda A., Suzuki T., Tsunetsugu-Yokota Y., Sato Y., Morikawa S., Tashiro M., Sata T., Hasegawa H., Nagata N. // *J. Virol.* 2014. V. 88. № 15. P. 8597–8614.
57. Tseng C.T., Sbrana E., Iwata-Yoshikawa N., Newman P.C., Garron T., Atmar R.L., Peters C.J., Couch R.B. // *PLoS. One.* 2012. V. 7. № 4. P. e35421.
58. Tang J., Zhang N., Tao X., Zhao G., Guo Y., Tseng C.T., Jiang S., Du L., Zhou Y. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015. V. 11. № 5. P. 1244–1250.
59. Lan J., Yao Y., Deng Y., Chen H., Lu G., Wang W., Bao L., Deng W., Wei Q., Gao G.F., et al. // *EBioMedicine.* 2015. V. 2. № 10. P. 1438–1446.

УДК 616-018:616.43:577.1:615.252

Оригинальный дипептидный миметик NGF, селективно активирующий путь PI3K/Akt, повышает выживаемость панкреатических β -клеток на модели диабета

Р. У. Островская*, С. В. Иванов, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин

НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

*E-mail: rita.ostrovskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 04.10.2018

Принята к печати 22.01.2019

РЕФЕРАТ Изучено цитопротективное действие миметика NGF – соединения ГК-2 (гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина)) – на β -клетки поджелудочной железы. Нейропротективное действие ГК-2 и его связь с активацией пути PI3K/Akt были выявлены ранее. На крысах с индуцированным стрептозотоцином диабетом типа 2 (стрептозотоциновая модель диабета (СТЗ)) иммуногистохимическим методом показано, что СТЗ вызывает снижение числа β -клеток и нарушение их морфологической структуры. Введение животным с СТЗ в течение 28 дней ГК-2 в дозе 0.5 мг/кг внутривентриально или 5 мг/кг перорально, а также препарата сравнения метформина в дозе 300 мг/кг перорально уменьшало повреждающее действие СТЗ. Эффекты ГК-2 и метформина на такие функциональные проявления СТЗ, как гипергликемия, потеря массы тела, полифагия, полидипсия, оказались сопоставимыми, а по цитопротективной активности ГК-2 несколько превосходил метформин. Выявлена выраженная корреляция между морфометрическими показателями и уровнем глюкозы в крови. Предполагается, что цитопротективное действие ГК-2 на β -клетки осуществляется через путь PI3K/Akt.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА диабет, ГК-2, метформин, NGF, нейротрофины, путь PI3K/Akt.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СД2 – сахарный диабет типа 2; БА – болезнь Альцгеймера; СТЗ – стрептозотцин; NGF – фактор роста нервов; TrkA – высокоаффинный рецептор тропомиозин-киназного (Trk) семейства.

ВВЕДЕНИЕ

В поиске новых способов лечения диабета внимание исследователей привлекает сходство нейробиологических механизмов регуляции функций нейронов и β -клеток поджелудочной железы. К признакам этого сходства относятся общие рецепторы, в частности рецепторы ГАМК [1], серотонина [2], глутамата [3], одинаковые ферменты, например, киназа 3 гликогенсинтазы (GSK-3) [4] и факторы транскрипции, в частности HIF [5, 6]. Дополнительным аргументом в пользу сходства нейронов и β -клеток может служить тот факт, что в процессе развития у β -клеток образуются нейроноподобные отростки [7], а нейроны в развивающемся мозге содержат инсулин – гормон β -клеток поджелудочной железы, глюкагон – гормон α -клеток поджелудочной железы и грелин – гормон, выделяемый клетками желудочно-кишечного тракта [8].

На сходство механизмов регуляции функций нейронов и β -клеток указывает участие нейротро-

фических факторов – NGF [7] и BDNF [9] в их росте и дифференцировке. Наряду с нарушением фолдинга белков (β -амилоида в нейронах, амилоидного полипептида в островках поджелудочной железы), развитием окислительного стресса и инсулинорезистентностью [10] общими для болезни Альцгеймера (БА) и сахарного диабета типа 2 (СД2) являются нарушения функции нейротрофинов [11].

Установлено, что β -клетки поджелудочной железы секретируют биологически активный NGF, причем его секреция усиливается под влиянием глюкозы. Даже в условиях кратковременного воздействия NGF резко возрастает стимулируемая глюкозой секреция инсулина. В присутствии моноклональных антител к NGF секреция инсулина снижается [12]. Наряду с этим усиление секреции инсулина блокирует соединение K252a – специфический ингибитор TrkA [13]. Важно подчеркнуть, что рецепторы TrkA выявлены только в β -клетках, но не в α -клетках поджелудочной железы [14].

Используя первичную культуру панкреатических островков человека, Piegucci и соавт. [15] не только подтвердили, что в них, как и в β -клетках крысы, экспрессируется NGF, но также показали, что нейтрализация эффекта этого нейротрофина моноклональными антителами к NGF усиливает апоптоз β -клеток. Установлено, что усиление апоптоза β -клеток в условиях дефицита NGF связано со снижением активности PI3K/Akt – одного из основных сигнальных путей TrkA [15].

Попытки создания лекарственных средств, эффективных, в частности, при нейродегенеративных заболеваниях, не прекращаются с момента обнаружения NGF [16]. Однако фармакокинетические ограничения, обусловленные свойствами полноразмерной молекулы NGF, такими, как низкая биологическая устойчивость, неспособность при системном введении проникать через биологические барьеры и наличие побочных эффектов, сделали невозможным использование NGF с целью заместительной терапии. Несколько фирм и лабораторий ведут поиск миметиков нейротрофинов [17], однако сообщений о найденных NGF-миметиках с удовлетворительными фармакокинетическими свойствами до настоящего времени не поступало.

В отделе химии лекарственных средств НИИ фармакологии имени В.В. Закусова сформулирована рабочая гипотеза, согласно которой отдельные структуры нейротрофинов при взаимодействии с одним и тем же рецептором могут активировать разные сигнальные пути, вызывая различные эффекты нейротрофинов [18]. Эта гипотеза легла в основу нового направления фармакологических исследований по созданию эффективных низкомолекулярных миметиков нейротрофинов, свободных от их побочных действий. В рамках предложенной гипотезы на основе структуры Asp⁹³-Glu⁹⁴-Lys⁹⁵-Gln⁹⁶ β -изгиба 4-й петли NGF, который наиболее экспонирован наружу и за счет этого может играть основную роль во взаимодействии NGF с рецептором, сконструирован дипептидный миметик, получивший рабочий шифр «ГК-2» (Патент РФ № 2410392, 2010; Патент US 9,683,014 B2, 2017; Патент CN 102365294 B, 2016) [19]. В соединении сохранен центральный дипептидный фрагмент Glu⁹⁴-Lys⁹⁵, который, согласно стереохимическим принципам, может наиболее глубоко проникать в зону связывания рецептора и наиболее полно распознаваться им. Периферийный Asp⁹³ заменен его биоизоостером, остатком янтарной кислоты, а аминокислотный остаток Gln⁹⁶ замещен амидной группой. Целью указанных замен была стабилизация конформации β -изгиба и увеличение устойчивости соединения к действию пептидаз. NGF представляет собой гомодимер, поэтому с помощью

связывания двух миметиков β -изгиба гексаметилендиаминовым спейсером был получен димерный дипептид гексаметилендиамид бис(моносукцинил-глутамил-лизина).

Известно, что NGF реализует свои основные эффекты, взаимодействуя с рецепторной тирозинкиназой TrkA, при этом проведение сигнала при активации TrkA осуществляется в основном с участием фосфатидилинозит-3-киназного (PI3K/Akt) и митоген-активируемого протеинкиназного (MAPK/Erk) сигнальных путей, с первым из которых связана регуляция выживаемости [20], а со вторым – преимущественно морфологическая дифференцировка.

Нейропротективная активность ГК-2 *in vitro* изучена как на иммортализованных, так и на первичных клеточных культурах. Показано, что ГК-2 в микрономольных концентрациях повышает выживаемость клеток, нарушенную воздействием пероксида водорода, глутаминовой кислоты, 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МФТП) [21]. С использованием вестерн-блот-анализа с антителами к фосфорилированным и нефосфорилированным формам киназ Akt и Erk на клетках линии НТ-22 показано, что активация Akt после внесения ГК-2 происходит в те же самые временные промежутки, что и полноразмерного NGF (через 15, 30, 60 и 180 мин). При этом в аналогичных условиях ГК-2, в отличие от NGF, не вызывал увеличения фосфорилирования киназ Erk. Для уточнения роли различных сигнальных путей в нейропротективной активности ГК-2 изучено влияние селективных ингибиторов фосфатидилинозит-3-киназы и MAPK-киназы, LY294002 и PD98059 соответственно. Инкубация клеток линии НТ-22 с LY294002 (100 мкМ) или PD98059 (50 мкМ) показала, что нейропротективные эффекты как NGF, так и ГК-2 полностью блокируются соединением LY294002, но не PD98059. Эти данные свидетельствуют о том, что реализация нейропротективных эффектов ГК-2 связана с активацией PI3K/Akt-пути при отсутствии влияния на сигнальный путь MAPK/Erk [22].

Убедительные доказательства нейропротективных эффектов ГК-2 получены в опытах *in vivo*. Показана эффективность ГК-2 на различных моделях болезни Альцгеймера (септо-гиппокампальной перерезки, холинергического дефицита, вызванного длительным введением скополамина, и на модели, индуцированной введением стрептозотоцина (СТЗ) в желудочки мозга [23]), а также фокальной и глобальной церебральной ишемии [24] и геморрагического инсульта [25].

Исходя из разрабатываемой нами в течение последних лет концепции целесообразности изучения возможного антидиабетического эффекта веществ

с нейропротекторными свойствами [26, 27], соединение ГК-2 изучено на стрептозотоциновой модели СД2. Показано, что в условиях системного введения ГК-2 устраняет гипергликемический эффект диabetогенного токсина (Патент РФ 2613314, 2017) и ослабляет сопутствующие диабету нарушения поведения у мышей [28].

Данная работа проведена с целью установить, будет ли миметик NGF – ГК-2, проявляющий выраженную нейропротективную активность, защищать также β -клетки. Представлялось целесообразным сравнить ГК-2 по выраженности цитопротективного эффекта с метформинем не только потому, что метформин является антидиабетическим препаратом первого выбора [29], но и потому, что он, как и ГК-2, активирует сигнальный путь PI3K/Akt [30]. В задачи исследования входило также сравнение влияния ГК-2 и метформина на такие проявления СД2, как гипергликемия, потеря веса, полидипсия, полифагия. Представлялось важным установить, в какой степени цитопротективный и антигипергликемический эффекты этих веществ коррелируют между собой.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные

Эксперименты выполнены на взрослых крысах-самцах линии Wistar с исходной массой тела 250–270 г, полученных из питомника «Столбовая». Животные имели свободный доступ к корму (за исключением 16 ч, предшествующих введению СТЗ) и к питьевой воде. Животных содержали в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 от 29 августа 2014 г. № 51. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике НИИ фармакологии имени В.В. Закусова.

Вещества

В качестве диabetогенного токсина применяли СТЗ (Sigma, США). Использовали миметик NGF ГК-2 и метформин (Сиофор, Berlin-Chemie Menarini, Германия), растворенные в физиологическом растворе (ФР).

Дизайн эксперимента

СД2 моделировали путем однократного в/б введения свежеприготовленного раствора СТЗ в дозе 45 мг/кг, растворенного в холодном цитратном буфере (pH 4.5). Выбор этой дозы в качестве моделирующей СД2 связан с выявленным ранее снижением уровня инсулина в крови на 48% и сохранением 30% жизнеспособных β -клеток в поджелудочной железе [27]. Содержание глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены, определяли с помощью прибора One Touch Ultra (США).

Первое определение проводили через 72 ч после введения СТЗ. В дальнейший эксперимент включали только животных, у которых уровень глюкозы в крови составлял не менее 15 ммоль/л. Эксперимент включал две серии. В первой серии крыс ($n = 48$) случайным образом делили на четыре группы: 1) крысам группы пассивного контроля ($n = 12$) в 1-й день эксперимента вводили цитратный буфер однократно в/б, в последующие 28 дней – ФР в объеме 2 мл/кг; 2) крысам группы активного контроля ($n = 12$) в 1-й день эксперимента вводили СТЗ 45 мг/кг, в последующие 28 дней – ФР; 3) крысам первой опытной группы ($n = 12$) однократно вводили СТЗ 45 мг/кг, в последующие 28 дней – ГК-2 в/б в дозе 0.5 мг/кг; 4) крысам второй опытной группы ($n = 12$) после СТЗ вводили ГК-2 перорально в дозе 5 мг/кг в течение 28 дней (десятикратное увеличение дозы при переходе от в/б к пероральному введению используется для большинства дипептидных препаратов) [31, 32]. Во второй серии эксперимента ($n = 36$) крыс делили на три группы: группа пассивного контроля ($n = 12$), группа активного контроля ($n = 12$) (дизайн, аналогичный первой серии) и опытная группа ($n = 12$), которой однократно вводили СТЗ 45 мг/кг, в последующие 28 дней – метформин, перорально в дозе 300 мг/кг, наиболее часто применяемой в эксперименте. Уровень глюкозы во всех группах обеих серий определяли в 1, 7, 14, 21, 28 дни введения препаратов. Потребление корма и воды измеряли ежедневно, взвешивание – каждые 3 дня. Животных умерщвляли декапитацией, после чего проводили иммуногистохимический анализ островкового аппарата поджелудочных желез.

Подготовка препаратов

Извлеченные поджелудочные железы крыс экспериментальных групп фиксировали в 10% нейтральном формалине (pH 7.4) (Sigma, США). Образцы обезжизивали в восходящем ряду спиртов и ксилоле, после чего заливали в парафиновые блоки. Срезы толщиной 5 мкм получали с использованием микротомы (Micritome Jung RM2035, Германия). Микропрепараты (по 4–5 срезов на стекло) сушили на сухой бане при температуре 40°C в течение 60 мин. Перед нанесением антител микропрепараты дважды депарафинировали в ксилоле и гидратировали в нисходящем ряду спиртов, после чего промывали в фосфатном буфере (PBS, Sigma, США) в течение 10 мин. С целью нейтрализации эндогенных пероксидаз микропрепараты в течение 10 мин обрабатывали 3% раствором пероксида водорода.

Иммуногистохимическая реакция

Для предотвращения неспецифического фонового окрашивания за счет связывания первичных антител

с компонентами ткани микропрепараты инкубировали с 10% раствором нормальной козьей сыворотки (Abscam, Великобритания) в течение 1 ч при комнатной температуре. Срезы обрабатывали первичными моноклональными антителами к инсулину (anti-insulin GP 1:500, Abscam, Великобритания) с разведением в фосфатном буфере. Обработанные микропрепараты оставляли на 24 ч во влажной камере при температуре 2–4°C.

Для визуализации результатов иммуногистохимической реакции микропрепараты инкубировали со вторичными моноклональными антителами, меченными пероксидазой (anti-GP Rabbit 1:500, Abscam, Великобритания), в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим использованием набора реагентов (DAV Vector Peroxidase, США). Готовые микропрепараты вновь обезвоживали в восходящем ряду спиртов и ксилоле и заключали в среду Eukitt (Panreac, Испания). Достоверность результатов исследования достигалась использованием негативных контролей антигенов и антител.

Микроскопический анализ

Морфометрическое исследование проводили с использованием микроскопа Aristoplan (Leitz, Германия) с цифровой камерой DCM-800 («Микромед», Россия), персонального компьютера и программного обеспечения ScopePhoto при увеличении $\times 620$ (для расчета общей площади микропрепаратов) и $\times 1600$ (для расчета площади островков и β -клеток). Рассчитывали долю β -клеток в общей площади среза, количество панкреатических островков и средний размер островка.

Исходя из опубликованных данных о неоднородности реакции панкреатических островков различного размера на повреждающее воздействие СТЗ [33], был проведен дифференцированный анализ островков по площади с определением процентного содержания доли островков каждого диапазона размеров (менее 500 мкм², 501–2500 мкм², 2501–10000 мкм², более 10001 мкм²) от их общего числа.

Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Biostat. Характер распределения данных определяли по критерию Шапиро–Уилка. В связи с нормальным распределением данных статистическую значимость различий между группами оценивали тестом ANOVA. Рассчитывали среднее арифметическое значение M и стандартную ошибку среднего арифметического SEM. Различия средних показателей считали статистически значимым при $p < 0.05$.

Для сравнительной характеристики динамики и выраженности эффекта препаратов рассчитывали

относительный показатель антигипергликемической активности (A_r) по формуле:

$$A_r = [\text{глк (акт. контр.)} - \text{глк (в-во)}] \times 100 \% / [\text{глк (акт. контр.)} - \text{глк (пасс. контр.)}],$$

где глк (акт. контр.) – уровень глюкозы в плазме крови в группе СТЗ и ФР, глк (в-во) – уровень глюкозы в группах СТЗ и ГК-2 или СТЗ и метформин, глк (пасс. контр.) – уровень глюкозы у животных, которым вводили ФР.

С целью сопоставления выраженности цитопроактивной активности ГК-2 и метформина рассчитывали относительный показатель (Цп_a) по формуле:

$$\text{Цп}_a = [\text{Цп (акт. контр.)} - \text{Цп (в-во)}] \times 100 \% / [\text{Цп (акт. контр.)} - \text{Цп (пасс. контр.)}],$$

где Цп (акт. контр.) – % β -клеток в поперечном срезе поджелудочной железы крыс группы СТЗ и ФР, Цп (в-во) – % β -клеток в поперечном срезе поджелудочной железы крыс группы СТЗ и ГК-2 или СТЗ и метформин, Цп (пасс. контр.) – % β -клеток в поперечном срезе поджелудочной железы крыс, которым вводили ФР.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как следует из данных, представленных в *табл. 1*, если в крови животных группы пассивного контроля уровень глюкозы в течение всего периода наблюдения составлял 5–6 ммоль/л, то у крыс с СД на 7-й день эксперимента он возрастал более чем в 3 раза. В дальнейшем (14, 21, 28 дней) уровень сахара у животных активного контроля оставался стабильно высоким – более 20 ммоль/л. О выраженной декомпенсации СД в группе активного контроля свидетельствуют также отрицательная динамика массы тела, полифагия и полидипсия. Выявлена выраженная антидиабетическая активность ГК-2. Уже к концу первой недели его введения отмечено значимое снижение уровня гликемии. Обращает на себя внимание сохранение активности ГК-2 при пероральном введении. Метформин также снижал уровень гликемии (*табл. 2*). Из расчета относительного показателя A_r (*табл. 3*) следует, что его эффект развивался позднее, чем у ГК-2, однако на 3-й и 4-й неделе показатели A_r для метформина были несколько выше, чем у ГК-2.

На благоприятный эффект обоих препаратов указывают и показатели динамики массы тела. В то время как здоровые крысы за период эксперимента прибавили в массе (+16.2% от исходного показателя), под действием СТЗ отмечено ее значительное снижение (-10.3%). Терапия ГК-2 и метформинном ослабляла

Таблица 1. Влияние ГК-2 на базальный уровень глюкозы у крыс серии 1

№	Группа	Базальный уровень глюкозы (ммоль/л; M ± m) по дням				
		1	7	14	21	28
1	Пассивный контроль	6.0±0.3	5.9±0.2	6.4±0.2	6.2±0.2	6.4±0.2
2	Активный контроль	21.0±1.5**	30.0±1.2**	23.6±1.9**	23.4±2.1**	24.5±1.9**
3	ГК-2 внутривенно	23.1±1.5	19.1±2.9*	14.3±2.1*	12.5±1.4*	10.8±0.9*
4	ГК-2 перорально	21.9±2.4	25.2±2.4*#	13.5±1.5*	13.2±2.1*	12.2±1.4*

* – Статистическая значимость различий между опытной группой и активным контролем, $p < 0.05$.

** – Статистическая значимость между пассивным контролем и активным контролем, $p < 0.05$.

– Статистическая значимость между опытными группами, $p < 0.05$.

Таблица 2. Влияние метформина на базальный уровень глюкозы у крыс серии 2

№	Группа	Базальный уровень глюкозы (ммоль/л; M ± m) по дням				
		1	7	14	21	28
1	Пассивный контроль	5.4±0.3	5.6±0.2	5.8±0.4	5.8±0.2	5.9±0.3
2	Активный контроль	17.6±0.9**	20.5±1.8**	22.2±1.2**	25.6±2.0**	29.3±1.7**
3	Метформин, 300 мг/кг	18.1±0.7	21.3±2.8	15.6±2.2*	8.8±1.0*	11.0±1.6*

* – Статистическая значимость различий между опытной группой и активным контролем, $p < 0.05$.

** – Статистическая значимость различий между пассивным контролем и активным контролем, $p < 0.05$.

Таблица 3. Относительные показатели антигипергликемической активности (A_r) ГК-2 и метформина

№	Соединение	A_r соединения, % по дням эксперимента				
		1	7	14	21	28
1	ГК-2 в/б	-13.5	45.2	54	63.3	75.4
2	ГК-2 перорально	-6	19.9	59.1	59.2	68.2
3	Метформин	-4.2	-5.7	40.3	84.8	78.2

вызванную СТЗ потерю массы (разница между исходной и конечной величинами – 1.6 и -0.7% при в/б и пероральном введении соответственно и -1.3% для метформина) (отличия от показателей в активном контроле статистически значимы, $p < 0.01$).

Антидиабетическая активность ГК-2 подтверждается снижением полидипсии – важнейшего индикатора СД. В то время как у животных активного контроля отмечена выраженная жажда (суточное потребление воды у нелеченных диабетических крыс на 450% больше, чем у здоровых), диабетические животные, получавшие терапию ГК-2, при в/б введении потребляли воды на 62% меньше, при пероральном введении – на 27%, метформином – на 33% меньше, чем животные группы активного контроля (отличия от показателей активного контроля значимы, $p < 0.01$) (рис. 1).

ГК-2 и метформин влияли и на полифагию. Если животные группы активного контроля к концу эксперимента потребляли на 18.3% больше корма, чем здоровые, то в группе ГК-2 эта разница составляет 2 и 8.5% (в/б и пероральное введение соответственно)

(отличия от показателей активного контроля статистически значимы, $p < 0.01$). Для метформина эта разница менее выражена и составляет 15.0%.

Цитопротективную активность обоих соединений оценивали с помощью иммуногистохимического анализа, высоко специфичного в отношении β -клеток островков Лангерганса. Результаты морфометрического анализа срезов поджелудочной железы приведены в табл. 4, 5.

Полученные данные свидетельствуют об уменьшении числа островков, а также абсолютного и относительного количества β -клеток в группе нелеченных диабетических животных. Для островков крыс этой группы характерно изменение формы и появление дистрофических элементов (рис. 2B). Введение диабетическим крысам в течение 28 дней ГК-2 и метформина приводит к заметному восстановлению доли β -клеток и их морфологических характеристик (рис. 2B, Г, Д). Вычисление показателя относительной цитопротективной активности свидетельствует о несколько более выраженной цитопротективной активности ГК-2 по сравнению с метформином:

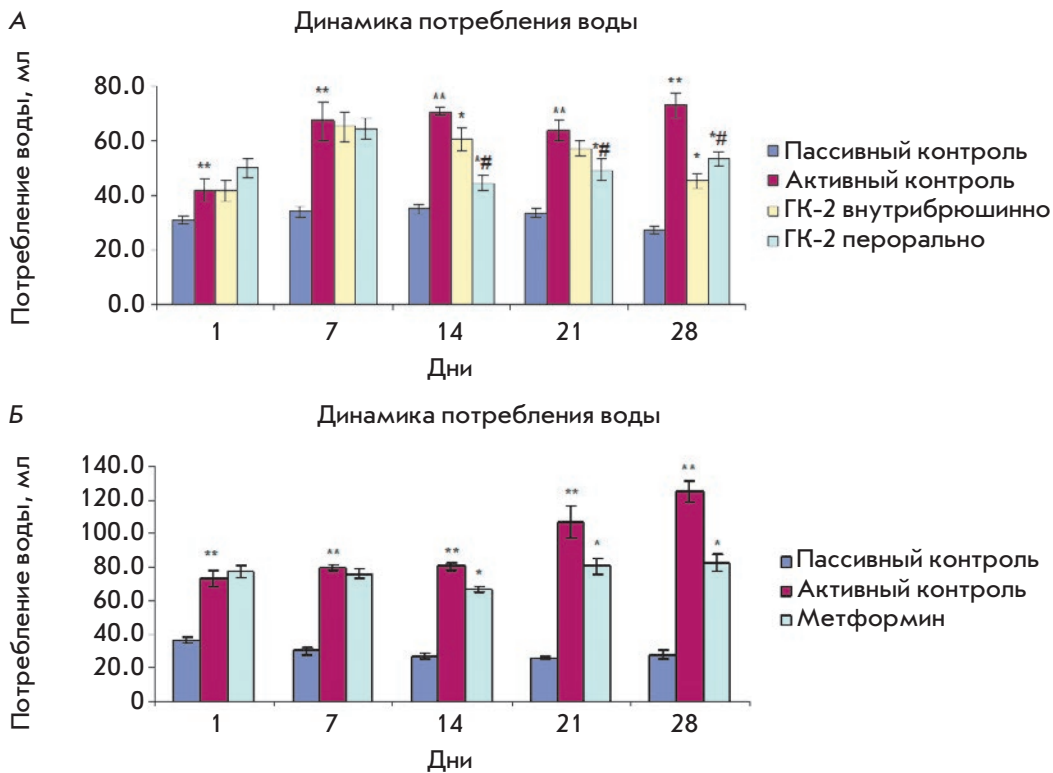


Рис. 1. Динамика потребления воды на 1 крысу. А – ГК-2, Б – метформин. * – Статистическая значимость различий между опытной группой и активным контролем, $p < 0.05$. ** – Статистическая значимость различий между пассивным контролем и активным контролем, $p < 0.05$. # – Статистическая значимость различий между опытными группами, $p < 0.05$

Таблица 4. Влияние ГК-2 на морфометрические показатели островков поджелудочной железы крыс

№	Группа	Суммарная площадь β -клеток		Средняя площадь островка, $\mu\text{м}^2$	Количество островков
		абсолютная, $\mu\text{м}^2$	% от площади островка		
1	Пассивный контроль	259925±46353	19.9±2.3	20088±3920	13±2
2	Активный контроль	79131±21266**	8.3±2.1**	5983±1805**	14±3
3	ГК-2 внутрибрюшинно	180076±36026*	13.3±1.7*	15567±3820*	12±3
4	ГК-2 перорально	175907±31357	14.0±2.0*	15167±1895*	12±2

* – Статистическая значимость различий между опытной группой и активным контролем, $p < 0.05$.
 ** – Статистическая значимость различий между пассивным и активным контролем, $p < 0.05$.

Таблица 5. Влияние метформина на морфометрические показатели островков поджелудочной железы крыс

№	Группа	Суммарная площадь β -клеток		Средняя площадь островка, $\mu\text{м}^2$	Количество островков
		абсолютная, $\mu\text{м}^2$	% от площади островка		
1	Пассивный контроль	225270±17005	20.0±1.3	18477±2142	12±1
2	Активный контроль	70181±20313**	5.8±2.1**	7646±1654**	9±2
3	Метформин	115353±23845	10.1±0.8*	9749±1714	12±2

* – Статистическая значимость различий между опытной группой и активным контролем, $p < 0.05$.
 ** – Статистическая значимость различий между пассивным и активным контролем, $p < 0.05$.

Π_n для ГК-2 составил 49.5 при в/б введении и 43.4 при пероральном, а для метформина – 30.3.

Представляют интерес результаты дифференциальной оценки площади островков β -клеток (рис. 3).

Если в группе здоровых животных преобладали островки крупных размеров (2501–10000 $\mu\text{м}^2$ и более 10001 $\mu\text{м}^2$), то у нелеченных диабетических животных число крупных островков резко умень-

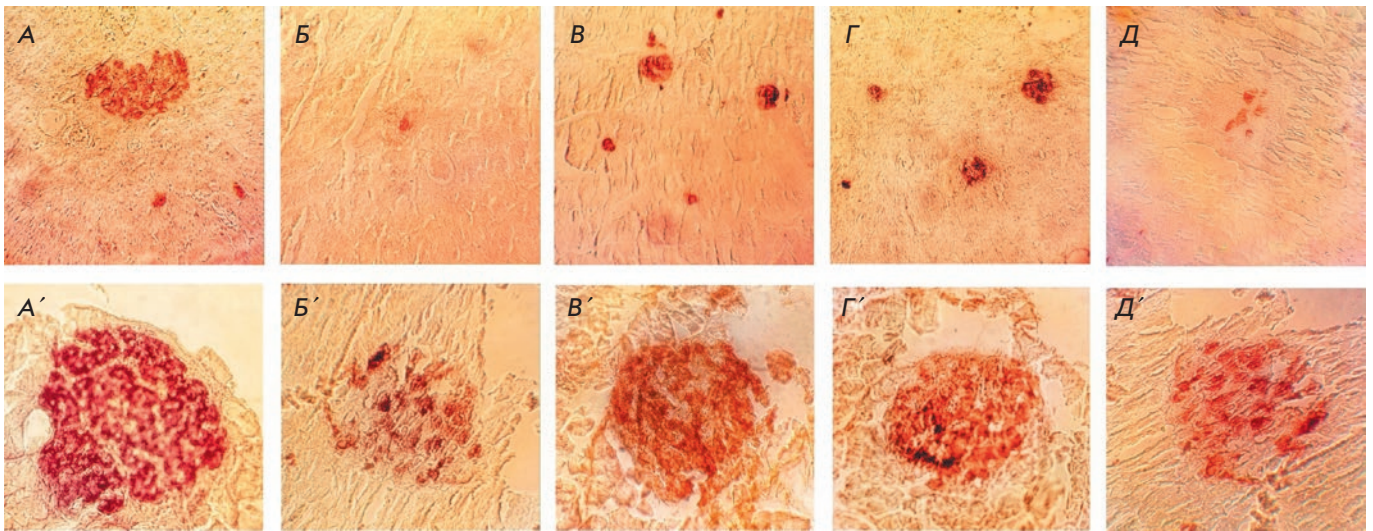


Рис. 2. Панкреатические островки животных разных групп. Увеличение $\times 620$ (верхний ряд) и $\times 1600$ (нижний ряд). А, А' – пассивный контроль; Б, Б' – активный контроль; В, В' – диабетические крысы, получавшие ГК-2 внутривнутрибрюшинно; Г, Г' – диабетические крысы, получавшие ГК-2 перорально; Д, Д' – диабетические крысы, получавшие метформин

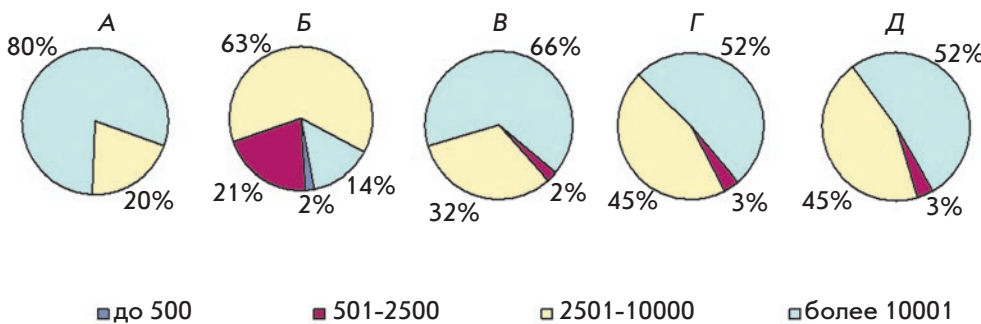


Рис. 3. Доля (%) островков β -клеток различных площадей (μm^2). А – пассивный контроль; Б – активный контроль; В – диабетические крысы, получавшие ГК-2 внутривнутрибрюшинно; Г – диабетические крысы, получавшие ГК-2 перорально; Д – диабетические крысы, получавшие метформин перорально

шалось, а мелких увеличивалось (501–2500 μm^2 и 2501–10000 μm^2). Применение соединения ГК-2 и метформина привело к увеличению доли крупных островков.

Площадь β -клеток (% от общей площади панкреатических островков), характеризующая степень повреждения поджелудочной железы при лечении ГК-2 и метформинном, коррелирует с уровнем глюкозы в крови (коэффициент корреляции 0.7256 и 0.6629 соответственно) (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Важной тенденцией современной диабетологии является поиск путей защиты β -клеток от повреждающего действия характерных для СД2 метаболических сдвигов: липоглюкозотоксичность, окислительный стресс, алкилирование ДНК, дефицит АТФ и снижение уровня зрелых нейротрофинов [34, 35]. В своем обзоре «Regulating the beta cell mass as a strategy

for type-2 diabetes treatment» L. Song и соавт. [36] пишут о том, что современная антидиабетическая терапия, направленная в основном на повышение секреции инсулина и его эффективности, а также на поглощение глюкозы, является симптоматической. Подчеркивается, что этиотропная (disease-modifying) терапия должна базироваться на применении веществ, которые предотвращают потерю β -клеток, увеличивая их выживаемость и не оказывая токсических эффектов в отношении других органов.

Определенное место среди них могла бы занять широкая группа соединений-антиоксидантов, которые нейтрализуют свободные радикалы, защищая тем самым β -клетки поджелудочной железы от гибели. Однако ряд исследователей предупреждают о завышенной оценке эффективности антиоксидантов при СД, которые способны лишь поглощать имеющиеся радикалы, но не могут препятствовать образованию новых [37]. Возможно использование соединений

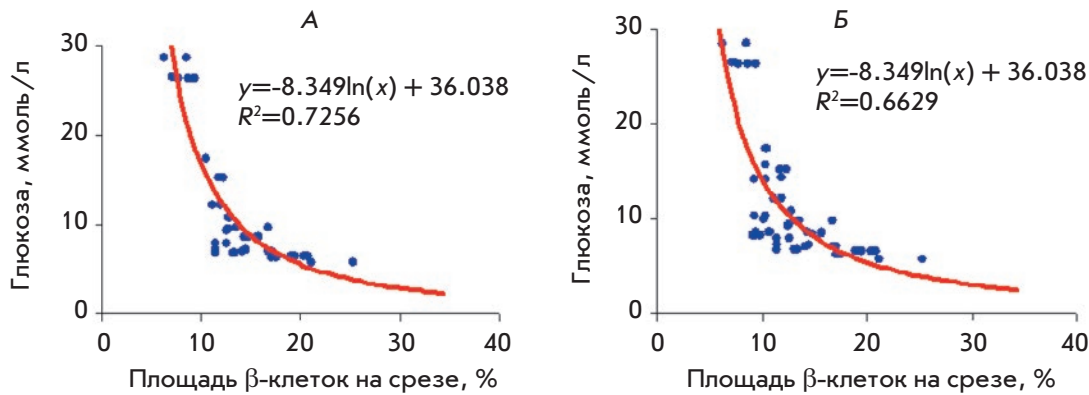


Рис. 4. Корреляция между уровнем глюкозы и относительной площадью β -клеток на срезах поджелудочной железы. А – ГК-2, Б – метформин

других классов, таких, как ингибиторы гистондеацетилазы, блокаторы GSK-3 β . Однако данные молекулы участвуют в регуляции множества процессов, поэтому существует вероятность возникновения нежелательных реакций, в том числе проонкогенного эффекта. Наиболее убедительные доказательства такого эффекта получены для ингибиторов дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4) [38].

Нейротрофины, известные своей способностью повышать выживаемость за счет ослабления апоптоза не только в нейрональных, но и в ненейрональных системах, могли бы оказаться перспективными средствами при СД2, если бы не их неблагоприятные фармакокинетические свойства. Разработанный в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова оригинальный подход к созданию системно-активных низкомолекулярных миметиков NGF и BDNF, лишенных недостатков полноразмерной молекулы, привел к созданию целой серии соединений (Патент РФ № 2410392, 2010; Патент US 9,683,014 B2, 2017; Патент CN 102365294 B, 2016). Одно из них – соединение ГК-2 – миметик четвертой петли NGF, широкий спектр нейропротективных эффектов которого выявлен *in vivo* и *in vitro*.

С помощью высокочувствительного, селективно-иммуногистохимического анализа нами впервые выявлен цитопротективный эффект соединения ГК-2 в отношении β -клеток поджелудочной железы. Если СТЗ в диабетогенной дозе уменьшает число островков Лангерганса, снижает абсолютное и относительное количество β -клеток, изменяет их форму и вызывает появление дистрофических элементов, то введение на фоне развитого диабета (гликемия выше 20 ммоль/л) оригинального димерного дипептидного миметика NGF, соединения ГК-2, приводит к достоверному ослаблению выраженности указанных морфологических изменений. С помощью дифференцированного анализа размеров островков показано, что у здоровых животных преобладают большие островки (площадью 2501–10000 $\mu\text{м}^2$ и бо-

лее 10001 $\mu\text{м}^2$), на фоне СТЗ преобладают островки малых размеров (до 500 $\mu\text{м}^2$), а применение соединения ГК-2 способствует увеличению числа островков больших размеров у диабетических крыс. Этот факт интересно сопоставить с представлениями [33], согласно которым такое увеличение свидетельствует об ослаблении процессов апоптоза. Степень морфологических изменений, оцениваемая по относительной площади β -клеток к общей площади панкреатических островков, четко коррелирует с выраженностью антигипергликемического эффекта ГК-2.

Неоднократно описано, что с помощью глюкозного транспортера GLUT2 СТЗ избирательно накапливается в β -клетках и вызывает их апоптоз [39, 40]. Апоптоз, возникающий под влиянием СТЗ, обусловлен развитием окислительного стресса, а также сдвигом в соотношении предшественника NGF и его зрелой формы в сторону преобладания первого с характерным проапоптотическим эффектом [41]. Ранее было показано, что ГК-2, подобно полноразмерной молекуле NGF, увеличивает выживаемость нейрональных клеток, подвергнутых действию пероксида водорода, глутаминовой кислоты, МФТП [21]. Наряду с этим было изучено влияние миметиков нейротрофинов, действующих на разные трансляционные пути, на проявления СТЗ-диабета. Оказалось, что антигипергликемический эффект вызывают только миметики, активирующие путь PI3K/Akt (миметик четвертой петли NGF ГК-2 и миметик первой петли BDNF ГСБ-214), тогда как миметик второй петли BDNF, активирующий путь MAPK/Erk (ГТС-201), лишен антигипергликемической активности [42].

Известно, что нарушение функций β -клеток при СД2 обусловлено снижением активности именно пути PI3K/Akt [43], роль которого как фактора, определяющего сохранение объема и функции β -клеток, показана *in vivo* и *in vitro* [44]. У генетически модифицированных мышей с дефицитом пути PI3K/Akt развивается тяжелый диабет на фоне усиленного апоптоза β -клеток [45, 46]. Дефицит пути PI3K/Akt,

характерный для диабета, воспроизводится на его СТЗ-модели [47].

Важно подчеркнуть, что у трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих конститутивно активную форму этого пути, увеличены размер и число панкреатических β -клеток, а также повышена толерантность к глюкозной нагрузке [48].

Совокупность данных о роли дефицита пути PI3K/Akt в развитии апоптоза β -клеток при диабете в сочетании с данными об участии именно этого пути в реализации антигипергликемического эффекта ГК-2 [42] позволяет предположить, что защитное действие ГК-2 также обусловлено способностью этого миметика NGF активировать указанный путь. Тот факт, что ГК-2 оказывает цитопротективное действие не только в отношении нейронов, как показано ранее [49], но и в отношении β -клеток, является важным аргументом в пользу представлений о сходстве механизмов защиты нейронов и β -клеток. Именно в этом состоит фундаментальный аспект нашей работы. Способность этого системно-активного миметика NGF защищать панкреатические β -клетки имеет научно-практическое значение, поскольку это соединение в настоящее время разрабатывается в качестве средства для лечения инсультов, а «сосуществование» инсульта и диабета хорошо установлено [50]. В случае применения ГК-2 при комбинированной сосудистой и диабетической патологии речь может идти о длительном приеме препарата, поэтому важно, что и нейропротективная, и цитопротективная активности ГК-2 в отношении панкреатических β -клеток сохраняются в условиях длительного перорального введения.

Метформин – препарат первой линии при СД2, успешно применяется более 50 лет миллионами людей во всем мире [51]. Известно, что механизм антидиабетического действия метформина является многокомпонентным [52]. Важнейший фрагмент этого механизма – это, несомненно, активация 5'-AMP-активируемой протеинкиназы (АМРК) [53], которая приводит к подавлению экспрессии ключевых ферментов глюконеогенеза в печени. Под действием метформина увеличивается утилизация глюкозы мышцами и усиливается анаэробный гликолиз в тонком кишечнике. Наряду с этим на культуре шванновских клеток показано, что метформин усиливает экспрессию NGF и BDNF [54]. Установлено, что эффект метформина блокируется избирательным ингибитором трансляционного пути PI3K/Akt [30]. Сходство одно-

го из механизмов действия метформина и ГК-2, эффекты которого также зависят от PI3K/Akt, послужило основанием для сравнительного изучения их эффектов на СТЗ-модели СД2. Показано, что по выраженности цитопротективного эффекта в отношении β -клеток ГК-2 не только не уступает метформину, а даже несколько превосходит его. Высокая активность ГК-2, сопоставимая с активностью метформина, определяет научно-практический аспект данного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе в опытах на крысах не только воспроизведен выявленный ранее на мышах антидиабетический эффект оригинального системно-активного миметика NGF, соединения ГК-2 (гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина)) [28], но и впервые на СТЗ-модели получено прямое доказательство цитопротективного действия ГК-2 в отношении β -клеток поджелудочной железы. Цитопротекция β -клеток является новым актуальным направлением, привлекающим внимание исследователей диабета. Поскольку защитный эффект ГК-2 в отношении нейронов, подвергнутых различного рода повреждающим воздействиям, был описан ранее, полученные в настоящей работе данные о снижении СТЗ-индуцированного апоптоза β -клеток на фоне терапии ГК-2 дополнительно подтверждают правильность концепции сходства нейрохимических механизмов регуляции функций нейронов и β -клеток поджелудочной железы и механизмов их защиты. Важный научно-практический результат этой работы – сопоставимость эффектов ГК-2 и метформина, стандартного антидиабетического препарата первого выбора, по выраженности влияния на функциональные проявления СД2 (гипергликемия, потеря массы тела, полифагия, полидипсия) и цитопротективного действия. ●

Работа выполнена в рамках госзадания на 2019–2021 гг. тема № 0521-2019-0003 «Изыскание фармакологических способов избирательной активации путей трансдукции сигнала тирозинкиназных нейротрофиновых рецепторов как основы для создания лекарственных средств, свободных от побочных эффектов нативных нейротрофинов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baekkeskov S., Aanstoot H., Christgau S., Reetz A., Solimén M., Cascalho M., Folli F., Richter-Olesen H., Camilli P. // *Nature*. 1990. V. 347. P. 151–157.
2. Noble E.E., Billington C.J., Kotz C.M., Wang C. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011. V. 300. № 5. P. 1053–1069.
3. Otter S., Lammert E. // *Trends Endocrinol. Metab.* 2016. V. 27. № 3. P. 177–188.

4. Woodgett J.R. // *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 2003. V. 3 № 4. P. 281–290.
5. Heinis M., Simon M.T., Ilc K., Mazure N.M., Pouyssegur J., Scharfmann R., Duvillie B. // *Diabetes.* 2010. V. 59. № 3. P. 662–669.
6. Cheng K., Ho K., Stokes R., Scott C., Scott C., Lau S.M., Hawthorne W.J., O'Connell P.J., Loudovaris T., Kay T.W., et al. // *J. Clin. Invest.* 2010. V. 120. № 6. P. 2171–2183.
7. Polak M., Scharfmann R., Seilheimer B., Eisenbarth G., Dressler D., Verma I.M., Potter H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 5781–5785.
8. Cruz S.A., Tseng Y.C., Kaiya H., Hwang P.P. // *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.* 2010. V. 156. P. 190–200.
9. Bathina S., Das U.N. // *Arch. Med. Sci.* 2015. V. 11. № 6. P. 1164–1178.
10. Ribe E.M., Lovestone S. // *J. Intern. Med.* 2016. V. 280. № 5. P. 430–442.
11. Passaro A., Dalla Nora E., Morieri M.L., Soavi C., Sanz J.M., Zurlo A., Fellin R., Zuliani G. // *J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci.* 2015. V. 70. № 3. P. 294–302.
12. Rosenbaum T., Vidaltamayo R., Sánchez-Soto M.C., Zentella A., Hiriart M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 23. № 13. P. 7784–7788.
13. Rosenbaum T., Sanchez-Soto M.C., Hiriart M. // *Diabetes.* 2001. V. 50. № 8. P. 1755–1762.
14. Kanaka-Gantenbein C., Tazi A., Czernichow P., Scharfmann R. // *Endocrinology.* 1995. V. 136. № 2. P. 761–769.
15. Pierucci D., Cicconi S., Bonini P., Ferrelli F., Pastore D., Matteucci C., Marselli L., Marchetti P., Ris F., Halban P., et al. // *Diabetologia.* 2001. V. 44. P. 1281–1295.
16. Aloe L., Rocco M.L., Bianchi P., Manni L. // *J. Transl. Med.* 2012. V. 10. P. 239–252.
17. Cirillo G., Colangelo A.M., Bianco M.R., Cavaliere C., Zaccaro L., Sarmientos P., Alberghina L., Papa M. // *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 30. № 1. P. 223–232.
18. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // *ДАН.* 2010. Т. 434. № 4. С. 549–552.
19. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. // *Журн. неврол. и психиат.* 2015. Т. 6. С. 63–70.
20. Kaplan D.R., Miller F.D. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000. V. 10. № 3. P. 381–391.
21. Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2011. Т. 150. № 11. С. 607–609.
22. Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Antipova T.A., Firsova Y.N., Konstantinopolsky M.A., Seredenin S.B. // *J. Biomed. Sci.* 2015. V. 8. № 22. P. 106.
23. Поварнина П.Ю., Воронцова О.Н., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Середенин С.Б. // *Acta Naturae.* 2013. Т. 5. № 3. С. 88–95.
24. Середенин С.Б., Силачев Д.Н., Гудашева Т.А., Пирогов Ю.А., Исаев Н.К. // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2011. Т. 151. № 5. С. 518–521.
25. Крайнева В.А., Гудашева Т.А., Котельникова С.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2012. Т. 154. № 11. С. 598–601.
26. Островская Р.У., Ягубова С.С. // *Психиатрия.* 2014. Т. 61. № 1. С. 35–43.
27. Ostrovskaya R.U., Zolotov N.N., Ozerova I.V., Ivanova E.A., Kapitsa I.G., Taraban K.V., Michunskaya A.M., Voronina T.A., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. // *Bul. Exp. Biol. Med.* 2014. V. 157. № 3. P. 344–349.
28. Ostrovskaya R.U., Yagubova S.S., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. № 33. P. 94–102.
29. Bolen S., Feldman L., Vassy J., Wilson L., Yeh H.C., Marinopoulos S., Wiley C., Selvin E., Wilson R., Bass E.B., et al. // *Ann. Intern. Med.* 2007. V. 147. № 6. P. 386–399.
30. Garabadu D., Krishnamurthy S. // *Pharm. Biol.* 2017. V. 55. № 1. P. 722–728.
31. Жердев В.П., Колыванов Г.П., Литвин А.А., Смирнов В.В., Колик Л.Г., Раскин С.Ю., Ивашкина Н.Ю., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2017. № 1. С. 52–55.
32. Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А., Воронцова О.Н., Бондаренко Н.А., Середенин С.Б. // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2011. Т. 151. № 6. С. 634–637.
33. Feng Z.C., Donnelly L., Li J., Krishnamurthy M., Riopel M., Wang R. // *Lab. Invest.* 2012. V. 92 № 4. P. 543–555.
34. Novelli M., Bonamassa B., Masini M., Funel N., Canistro D., De Tata V., Funel N., Martano M., Soleti A., Campani D., et al. // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2010. V. 382. P. 127–137.
35. Goyal S.N., Reddy N.M., Kalpesh R.P., Kartik T.N., Shreesh O., Chandragouda R.P., Yogeeta O.A., Patel R.C. // *Chem.-Biol. Inter.* 2016. V. 244. P. 49–63.
36. Song L., Muller C., Louw J., Bouwens L. // *Curr. Drug Targets.* 2015. V. 16. № 5. P. 516–524.
37. Johansen J.S., Harris A.K., Rychly D.J., Ergul A. // *Cardiovasc. Diabetology.* 2005. V. 4. № 5. P. 1–11.
38. Tseng C.H., Lee K.Y., Tseng F.H. // *J. Environ. Sci. Health. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 2015. V. 33. № 1. P. 67–124.
39. Schnedl W.J., Ferber S., Johnson J.H., Newgard C.B. // *Diabetes.* 1994. V. 43. P. 1326–1333.
40. Szkudelski T. // *Physiol. Res.* 2001. V. 50. № 6. P. 536–546.
41. Al-Gayyar M.M., Mysona B.A., Matragoon S., Abdelsaid M.A., El-Azab M.F., Shanab A.Y., Ha Y., Smith S.B., Bollinger K.E., El-Remessy A.B. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 1. e54692.
42. Островская Р.У., Ягубова С.С., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2017. Т. 164. № 12. С. 701–705.
43. Lorna M., Rhodes J. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004. V. 287. P. 192–198.
44. Elghazi L., Rachdi L., Weiss A.J., Cras-Meneur C., Bernal-Mizrachi E. // *Diabetes, Obesity Metabolism.* 2007. V. 9. № 2. P. 147–157.
45. Garofalo R.S., Orena S.J., Rafidi K., Torchia A.J., Stock J.L., Hildebrandt A.L., Coskran T., Black S.C., Brees D.J., Wicks J.R., et al. // *J. Clin. Invest.* 2003. V. 112. P. 197–208.
46. Bernal-Mizrachi E., Fatrai S., Johnson J.D., Ohsugi M., Otani K., Han Z., Polonsky K.S., Permutt M.A. // *J. Clin. Invest.* 2004. V. 114. P. 928–936.
47. Cui W., Zhang Y., Lu D., Ren M., Yuan G. // *Mol. Med. Rep.* 2016. V. 13. P. 543–549.
48. Bernal-Mizrachi E., Wen W., Stahlhut S., Welling C.M., Permutt M.A. // *J. Clin. Invest.* 2001. V. 108. P. 1631–1638.
49. Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Seredenin S.B. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. V. 162. № 4. P. 454–457.
50. Al-Rubeaan K., Al-Hussain F., Youssef A.M., Subhani S.N., Al-Sharqawi A.H., Ibrahim H.M. // *J. Diabetes Res.* 2016. V. 4132589. P. 1–9.
51. Clodi M., Abrahamian H., Drexel H., Fasching P., Hoppichler F., Kautzky-Willer A., Lechleitner M., Ludvik B., Prager R., Roden M., et al. // *Wien Klin. Wochenschr.* 2012. V. 124. № 2. P. 10–16.
52. Rena G., Pearson E.R., Sakamoto K. // *Diabetologia.* 2013. V. 56. P. 1898–1906.
53. Zhou G., Myers R., Li Y., Chen Y., Shen X., Fenyk-Melody J., Wu M., Ventre J., Doebber T., Fujii N., et al. // *J. Clin. Invest.* 2011. V. 108. P. 1167–1174.
54. Ma J., Liu J., Yu H., Chen Y., Wang Q., Xiang L. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. V. 8. № 6. P. 6748–6755.

УДК 577.1:612.017.1:616-097

Структура Fab-фрагментов антител к фуллерену C₆₀: структурные детерминанты связывания фуллерена

Е. М. Осипов¹, О. Д. Гендриксон¹, Т. В. Тихонова¹, А. В. Жердев¹, О. Н. Солопова²,
П. Г. Свешников², Б. Б. Дзантиев¹, В. О. Попов^{1*}

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, 119071, Москва, Ленинский просп., 33

²Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Россия, 113149, Москва, Симферопольский бул., 8

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

Поступила в редакцию 11.10.2018

Принята к печати 12.02.2019

РЕФЕРАТ Структура Fab-фрагментов антител к фуллерену C₆₀ (FabC₆₀) решена методом рентгеноструктурного анализа. Виртуальный докинг C₆₀ в антигенсвязывающем кармане FabC₆₀ показал, что связывание C₆₀ с FabC₆₀ обеспечивается энтальпийными и энтропийными факторами: π-π-стэкинг-взаимодействиями с ароматическими остатками антигенсвязывающего кармана и снижением площади доступной растворителю гидрофобной поверхности C₆₀. Фрагмент подвижной петли CDR H3, локализованный на поверхности FabC₆₀, затрудняет доступ C₆₀ в антигенсвязывающий центр, что может объяснять пониженную аффинность антител к C₆₀. Структура FabC₆₀ депонирована в Protein Data Bank с pdbid 6H3H.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антитела, молекулярное моделирование, рентгеноструктурный анализ, фуллерен.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ а.о. – аминокислотный остаток; ИФА – иммуноферментный анализ; СИТ – соевый ингибитор трипсина; ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ФБ – 50 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7.4, содержащий 100 мМ NaCl; ФБТ – ФБ, содержащий 0.05% Тритона X-100; CDR – гипервариабельные участки; FabC₆₀ – Fab-фрагмент антител к фуллерену C₆₀; K_d – константа диссоциации; r.m.s.d. – среднеквадратичное отклонение; SolC₆₀ – фуллеренаминокaproновая кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема иммунного распознавания – один из ключевых вопросов современной биохимии, важный как для понимания биологических процессов, так и для создания новых лекарственных препаратов и конструирования вакцин. За последние годы получено большое количество теоретических и экспериментальных данных, способствующих пониманию структурно-функциональных закономерностей иммунного взаимодействия [1–5]. Одним из эффективных средств изучения комплекса антитело–антиген является рентгеноструктурный анализ, успешно применяемый для изучения взаимодействия антител с различными высокомолекулярными антигенами (белками, полисахаридами и др.) и низкомолекулярными водорастворимыми гаптенами [6–9].

На сегодняшний день круг потенциальных мишеней иммунного распознавания существенно расширился, в том числе благодаря частицам со структурно выродженной поверхностью. К таким частицам относятся техногенные наночастицы, объемы производства

и применения которых в различных областях науки и технологий интенсивно растут [10]. Возможность варьировать физико-химические параметры наночастиц открывает широкие горизонты для синтеза наночастиц с заданными свойствами, которые могут использоваться в таких областях биомедицины, как направленная доставка лекарственных средств, диагностика заболеваний и имиджинг органов и тканей [11–13]. Использование этих нестандартных объектов в медицине и биотехнологии делает важным изучение особенностей иммунного ответа на техногенные наночастицы, попадающие в организм.

К антигенам, взаимодействие с которыми не укладывается в рамки стандартных закономерностей иммунной реакции, относятся фуллерены – наночастицы, состоящие исключительно из атомов углерода и обладающие уникальной геометрией и свойствами [14]. Ряд исследований показывает возможность получения специфических антител к фуллеренам и предоставляет данные о комплексах антитело–фуллерен [15–18].

Изучению структуры сайта иммунного связывания фуллерена со специфическими антителами посвящена лишь одна работа [15]. Методами рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования показано, что специфический сайт связывания молекул фуллерена представляет собой сферическую полость размером 7 Å, образованную кластером гидрофобных аминокислот. Однако в смоделированной структуре комплекса фуллерена с Fab-фрагментом антитела [15] во взаимодействие с фуллереном вовлечены гидрофобные остатки за пределами CDR.

Задача настоящего исследования состояла в изучении структуры Fab-фрагмента антител против фуллерена C₆₀ методом рентгеноструктурного анализа и в моделировании строения комплекса антитело-фуллерен. С этой целью использованы Fab-фрагменты полученных ранее моноклональных антител к фуллерену C₆₀ (FabC₆₀) [18].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Растворимое производное C₆₀ – фуллеренаминокaproновая кислота (C₆₀(H)₃(NH(CH₂)₅COONa)₃ × 10 H₂O, SolC₆₀) с чистотой 98% – приобретено у «Интелфарм» (Россия). Меченные пероксидазой хрена козы антитела против λ-цепей IgG мыши приобретены у Bethyl Laboratories Inc. (США), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и Тритон X-100 – у Sigma-Aldrich (США). Остальные реагенты имели аналитическую степень чистоты. Для иммуноферментного анализа (ИФА) использованы микропланшеты Costar 9018 фирмы Corning (США).

Получение Fab-фрагментов моноклональных антител мыши

Использовали Fab-фрагменты (FabC₆₀) клона B1 моноклональных антител мыши (Ful B1, IgG2a lambda), полученных нами ранее [18]. Антитела B1 очищали из асцитной жидкости одностадийной аффинной хроматографией на G-сефарозе и диализовали в течение ночи против 200 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7.4, содержавшего 2 мМ EDTA и 10 мМ цистеин. Для получения Fab-фрагментов антител B1 кристаллический папаин (Sigma, США) растворяли в том же буфере, смешивали с антителами в пропорции 1 : 100 и инкубировали смесь в течение 4 ч при 37°C и легком покачивании. Реакцию останавливали добавлением йодоуксусной кислоты до конечной концентрации 10 мМ. Для удаления Fc-фрагментов реакцию смесь наносили на колонку с белок-A-сефарозой, проскок собирали и диализовали против натрий-фосфатного буфера. Концентрацию FabC₆₀ опреде-

ляли спектрофотометрически при 280 нм, используя коэффициент E₂₈₀ (1 мг/мл) = 1.4. Чистоту образцов контролировали методом электрофореза по Лэммли в 12% полиакриламидном геле без добавления β-меркаптоэтанола.

Характеристика Fab-фрагментов моноклональных антител мыши

Непрямой ИФА. Конъюгат C₆₀-тиреоглобулин (5 мкг/мл) в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7.4, содержавшем 100 мМ NaCl (ФБ), добавляли в лунки микропланшета и инкубировали в течение 16 ч при 4°C. Микропланшет отмывали 4 раза ФБ, содержавшим 0.05% Тритона X-100 (ФБТ). Затем в лунки микропланшета добавляли серию разведений антитела B1 и его Fab-фрагмента и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После четырехкратной отмывки ФБТ в лунки добавляли меченные пероксидазой хрена козы антитела против λ-цепей IgG мыши в разведении 1:10 000 и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Микропланшет отмывали 4 раза ФБТ и измеряли пероксидазную активность иммунных комплексов. Для этого в лунки вносили субстратную смесь, содержащую 0.42 мМ ТМБ и 1.8 мМ H₂O₂ в 0.1 М цитратном буфере, рН 4.0, и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Ферментативную реакцию останавливали, добавляя в лунки 1 М H₂SO₄. Оптическую плотность продукта окисления измеряли при 450 нм, используя микропланшетный фотометр Zenyth 3100 (Anthos Labtec Instruments, Австрия).

Конкурентный ИФА SolC₆₀. Конъюгат C₆₀ – соевый ингибитор трипсина (C₆₀-СИТ) (1 мкг/мл) в ФБ добавляли в лунки микропланшета и инкубировали в течение 16 ч при 4°C. Микропланшет промывали 4 раза ФБТ и вносили в лунки растворы SolC₆₀ (от 5 мкг/мл до 0.1 нг/мл) и FabC₆₀ (5 мкг/мл), инкубировали в течение 90 мин при 37°C. После четырехкратной отмывки ФБТ в лунки микропланшета добавляли меченные пероксидазой хрена козы антитела против λ-цепей IgG мыши в разведении 1:10 000 и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После отмывки микропланшета измеряли пероксидазную активность полученных комплексов как описано выше.

Зависимость оптической плотности от концентрации антигена аппроксимировали с помощью программы Origin 7.5 (OriginLab, США), используя четырехпараметрическую сигмоидную функцию:

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p},$$

где A₁ – максимальная величина оптической плотности, A₂ – минимальная величина оптической плотно-

сти, p – наклон калибровочной кривой, x_0 – концентрация антигена, приводящая к 50% ингибированию связывания антителом.

Кристаллизация

Для кристаллизации использовали два препарата белка: раствор FabC₆₀ (7 мг/мл) в 50 мМ буфере HEPES, pH 7.0, и раствор комплекса FabC₆₀ с SolC₆₀, полученный смешиванием 100 мкл раствора FabC₆₀ (0.16 мМ или 7 мг/мл) с 20 мкл 1 мМ водного раствора SolC₆₀.

Поиск условий кристаллизации проводили методом диффузии пара в варианте с висючей каплей при 298 К. В качестве противорастворов использовали наборы кристаллизационных растворов Index HR2-134 и Crystal Screen HR2-110/112 фирмы Hampton Research (США). Капли состояли из равных объемов (1 мкл) раствора белка и противораствора. Кристаллы FabC₆₀, пригодные для рентгеноструктурного анализа, получены с использованием противораствора, содержавшего 25% полиэтиленгликоль 3350, 0.2 М (NH₄)₂SO₄, 0.1 М бис-Трис, pH 6.5. Образование кристаллов наблюдалось на третий день, в течение недели кристаллы вырастали до размеров 200×200×50 мкм.

Сбор дифракционных данных и решение структуры

Набор дифракционных данных с кристалла FabC₆₀ собирали на пучке К4.4е (станция «Белок» Курчатовского источника синхротронного излучения, Москва, Россия) на длине волны 0.98 Å при 100 К в токе азота. Перед сбором данных кристаллы вымачивали в противорастворе, дополнительно содержащем 20% глицерина, и замораживали в жидком

азоте. Набор дифракционных данных обрабатывали программой XDS [19]. Кристаллографические расчеты проводили с использованием комплекта программ CCP4 [20]. Структуру FabC₆₀ решали методом молекулярного замещения программой BALBES [21]. В качестве модели для молекулярного замещения использовали структуру антител из Protein Data Bank (код pdbid 1MFB) [22]. Уточнение структуры проводили с использованием программы REFMAC5 [23]. Визуальную коррекцию модели проводили вручную с использованием COOT [24]. Иллюстрации подготавливали с использованием программного пакета PyMOL [25]. Структуру депонировали в Protein Data Bank (PDB, код pdbid 6H3H).

Докинг малых молекул

Докинг и подготовку структур рецептора и лиганда выполняли с использованием программы Autodock Vina [26]. Файл с координатами C₆₀ скачивали из ChemSpider (www.chemspider.com). Рецептор определяли как трехмерную сеть со стороной, равной 22.5 Å, и с центром в точке (13.95; -9.51; 38.74). Каждое измерение сети содержало 60 точек.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика Fab-фрагментов моноклональных антител мыши

FabC₆₀, использованные в настоящей работе, получены расщеплением полноразмерных анти-C₆₀-антител В1 папаином и очищены до гомогенного состояния, что подтверждено данными электрофореза в 12% полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях (рис. 1А).

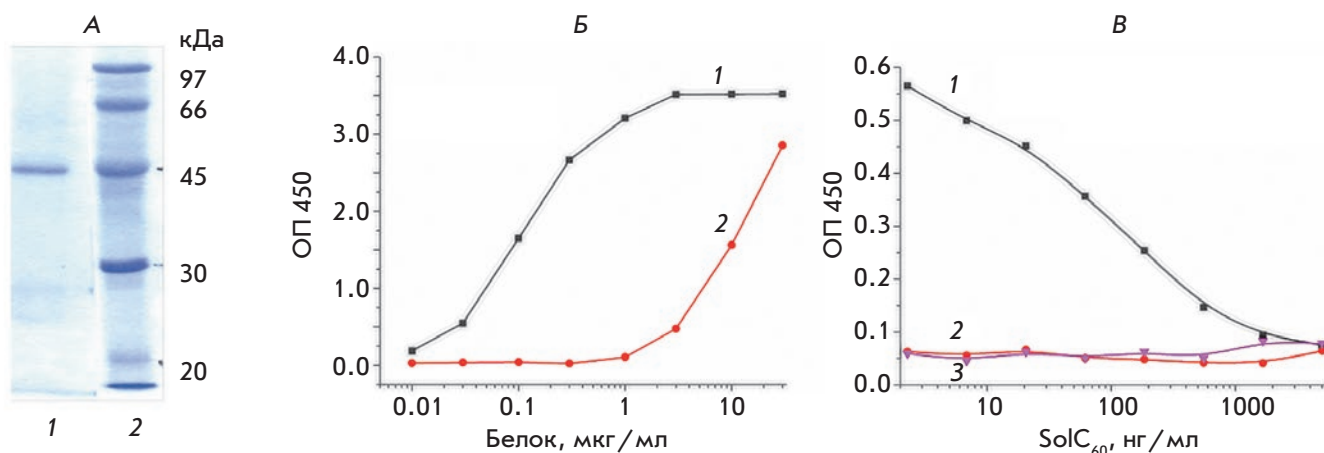


Рис. 1. Характеристика FabC₆₀. А – определение гомогенности FabC₆₀ (1) с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях. Полоса 2 – маркеры молекулярных масс. Б – кривые титрования моноклонального антитела В1 (1) и FabC₆₀ (2) в непрямом ИФА. В – конкурентный ИФА SolC₆₀: иммобилизован конъюгат C₆₀-СИТ, в растворе – FabC₆₀ (1); иммобилизован конъюгат C₆₀-СИТ, в растворе – Fab-фрагмент моноклональных антител к X-вирусу картофеля (2); иммобилизован конъюгат атразин-СИТ, в растворе – FabC₆₀ (3)

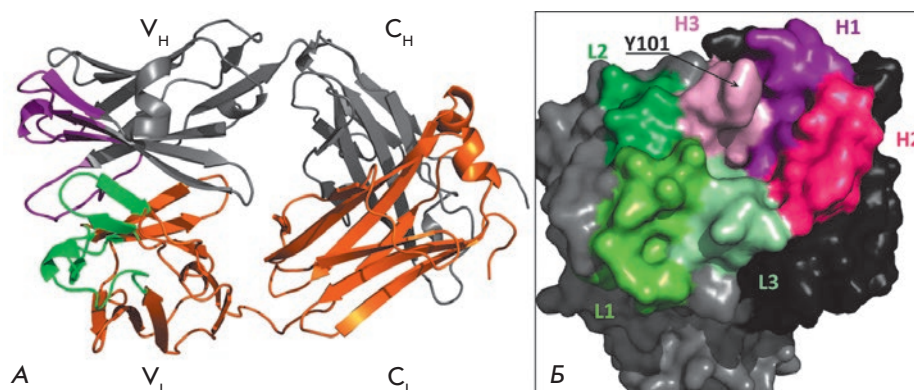


Рис. 2. А – структура FabC₆₀. Н-цепь и ее CDR окрашены серым и фиолетовым, L-цепь и ее CDR окрашены оранжевым и зеленым цветом соответственно. Б – поверхность антигенсвязывающего кармана в FabC₆₀. Поверхность Н- и L-цепей показана черным и серым цветом, поверхность CDR Н- и L-цепей – оттенками фиолетового и зеленого цветов соответственно

Иммунохимическая реакционная способность FabC₆₀ изучена методом непрямого ИФА (рис. 1Б). По данным ИФА реакционная способность полученных FabC₆₀ примерно в 80 раз ниже по сравнению с полноразмерными антителами.

Антигенсвязывающую способность FabC₆₀ изучали с помощью конкурентного ИФА. В данном формате анализа конъюгат С₆₀-белок, иммобилизованный на твердой фазе, и водорастворимое производное фуллерена, SolC₆₀, конкурентно взаимодействовали с Fab-фрагментами антител. Специфичность взаимодействия подтверждали в экспериментах, где в качестве контроля использовали Fab-фрагменты моноклональных антител к другому антигену (Х-вирусу картофеля), а также иммобилизованный на твердой фазе конъюгат белка с другим гаптеном (пестицидом атразином) (рис. 1В). Как видно из полученных данных, FabC₆₀ не взаимодействует с адсорбированным конъюгатом атразин-СИТ (кривая 3 на рис. 1В). Кроме того, иммобилизованный конъюгат С₆₀-СИТ не связывается с неспецифическими антителами (кривая 2 на рис. 1В). Кривая 1 на рис. 1В свидетельствует о наличии эффекта конкуренции между свободным SolC₆₀ и иммобилизованным конъюгатом С₆₀-СИТ за антигенсвязывающие участки FabC₆₀. Таким образом, полученные результаты подтверждают специфическую природу иммунного взаимодействия Fab-фрагментов антител В1 и производного фуллерена С₆₀.

Структура FabC₆₀

Кристаллизация комплекса FabC₆₀ с SolC₆₀ привела к образованию кристаллов свободной формы FabC₆₀. Структуры FabC₆₀, полученные без SolC₆₀ и в ее присутствии, были одинаковыми, и в дальнейшем мы рассматриваем только структуру, полученную при кристаллизации свободной формы FabC₆₀.

Структура FabC₆₀ была решена методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 1.9 Å. Статистика собранных дифракционных данных

представлена в таблице. В независимой части элементарной ячейки располагаются две молекулы FabC₆₀, которые совмещаются по координатам 2717 эквивалентных атомов со среднеквадратичным отклонением 1.0 Å. Эти же молекулы совмещаются по координатам атомов варибельного домена со среднеквадратичным отклонением 0.4 Å. Две молекулы независимой части элементарной ячейки отличаются конформацией С-концов и межмолекулярными контактами (см. ниже).

FabC₆₀ имеет характерную для Fab-фрагментов двухдоменную структуру, состоящую из тяжелой (H) и легкой (L) λ-цепей, и линейные размеры 45×50×100 Å (рис. 2А). Варибельный домен тяжелой цепи (V_H) включает остатки 1–119, а варибельный домен легкой цепи (V_L) – остатки 1–108. Константный домен тяжелой цепи (C_H) включает остатки 123–222, константный домен легкой цепи (C_L) – остатки 115–215. В электронной плотности уточнены все аминокислотные остатки легких цепей. Остатки 135–139, расположенные в петле между доменами V_H и C_H, разупорядочены и не локализованы на картах электронной плотности.

Гиперварибельные участки (CDR) определены следующим образом: **L1** (Arg23-Asn36), **L2** (Gly51-Ala57), **L3** (Ala91-Val99), **H1** (Gly26-His35), **H2** (Tyr50-Glu59) и **H3** (Gly99-Trp109) [27, 28] (рис. 2Б). Аминокислотные остатки этих участков формируют антигенсвязывающий карман с размерами 9×7 Å и глубиной 5 Å (диаметр сферы С₆₀ = 7 Å). Из-за наличия у фуллерена сопряженной системы π-π-связей мы ожидали, что CDR будет содержать остатки, склонные к π-π-стэкинг-взаимодействиям. Действительно, поверхность антигенсвязывающего кармана частично образована расположенными в CDR гидрофобными ароматическими остатками Tyr50 (H2), Tyr101 (H3), Tyr34 (L1), Trp93 (L3) и Trp98 (L3). Боковая группа Tyr101 из петли Asp100-Tyr101 в CDR H3 плохо видна на картах электронной плотности; В-факторы у атомов боковой группы

Статистика сбора данных и уточнения структуры

Обработка данных	
Пространственная группа симметрии	P2 ₁
Параметры элементарной ячейки a; b; c, Å; β, град	40.18; 137.58; 83.15 β = 91.9°
Разрешение	28.83–1.91 (2.02–1.91)
I / σ	17.5 (3.2)
Полнота набора, %	99.5 (97.3)
Общее число отражений	349716 (52972)
Уникальные отражения	69665 (10963)
Избыточность набора	5.0 (4.8)
R _{meas} , %*	8.4 (2.3)
CC _{1/2}	99.9 (83.0)
В-фактор Вильсона	29.7
Уточнение структуры	
R _{cryst} , %	19.3 (27.9)
R _{free} , %	23.5 (34.3)
Отклонение величин от идеальных значений:	
Длина связей, Å	0.02
Углы между связями, град	1.9
Двугранные углы, град	7.2
Число атомов	
Белок	6535
Вода	456
Величина среднего температурного фактора, Å ²	
Белок	30.1
Вода	32.5
Статистика графика Рамачандрана	
Разрешенная область, %	97.4
Запрещенная область, %	0.2

*Для R_{meas} величина в скобках дана для слоя с наивысшим разрешением.

Tyr101 (54 Å²) выше, чем у атомов Tyr101 основной цепи (28 Å²). Это различие в величине В-факторов свидетельствует о подвижности боковой группы Tyr101 и может быть связано с локализацией Tyr101 на поверхности белка. Подвижный Tyr101 может выполнять функцию «крышки» кармана, затрудняя вход C₆₀ в антигенсвязывающий карман и снижая тем самым аффинность взаимодействия антитело–антиген (рис. 2Б).

На поверхности антигенсвязывающего сайта обнаружены остатки Thr33 и His35 из CDR H1, способные образовывать водородные связи, которые могут быть вовлечены в связывание фуллерена [15]. Однако в полученной нами структуре свободной формы FabC₆₀ остатки Thr33 и His35 двух молекул FabC₆₀ независимой части элементарной ячейки образуют водородные связи с С-концевыми остатками Н- и L-цепей симметрично упакованных молекул FabC₆₀ (рис. 3А,Б). В первой молекуле FabC₆₀ антигенсвязывающий карман занят С-концевым пептидом Ala219–Ser222 Н-цепи симметричной молекулы. Карбоксильная группа Ser222 симметрично-связанной молекулы FabC₆₀ образует две водородные связи с Thr33 и His35. Во второй молекуле FabC₆₀ антигенсвязывающий карман занят С-концевым пептидом Asp213–Ser215 L-цепи другой симметрично-связанной молекулы FabC₆₀. В этом случае водородные связи С-концевого остатка Ser215 с остатками Thr33 и His35 опосредованы молекулами воды. Вероятнее всего, связывание в антигенсвязывающем сайте FabC₆₀ одного из С-концов другой молекулы не имеет отношения к биологической роли и является арте-

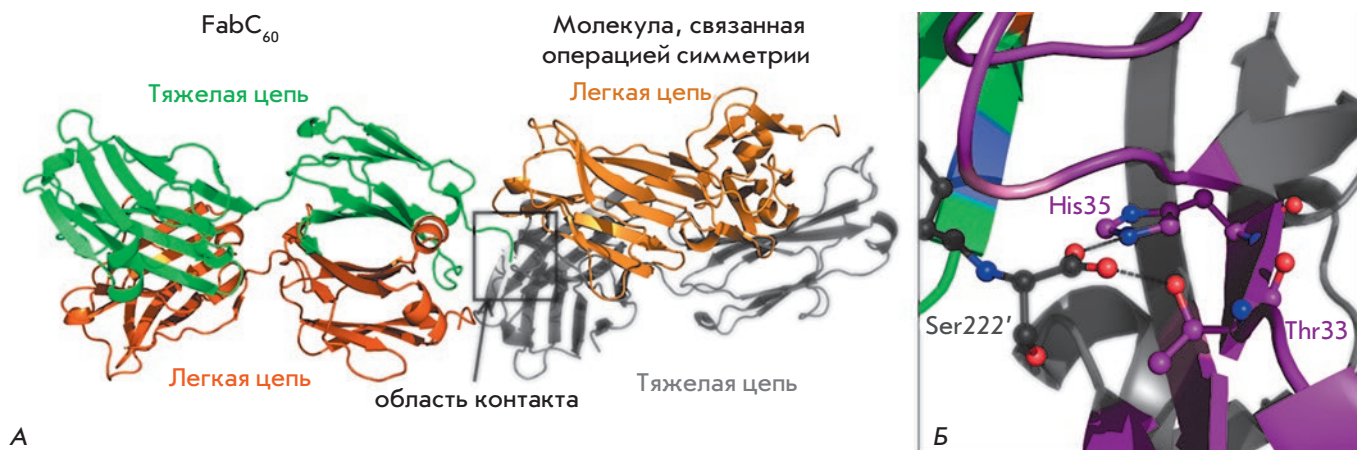


Рис. 3. А – упаковка FabC₆₀ в кристалле с пространственной группой P2₁. С-Конец тяжелой цепи FabC₆₀ (зеленый) занимает антигенсвязывающий сайт соседней FabC₆₀. Б – увеличенная область контакта (ориентация и окрашивание отличаются от рис. 3А). Связывание С-концевого Ser222' тяжелой цепи соседней молекулы в антигенсвязывающем кармане FabC₆₀. Тяжелая и легкая цепи гипервариабельных участков окрашены фиолетовым и зеленым цветом соответственно. Водородные связи С-концевой карбоксильной группы Ser222' (атомы углерода черного цвета) показаны пунктиром черного цвета

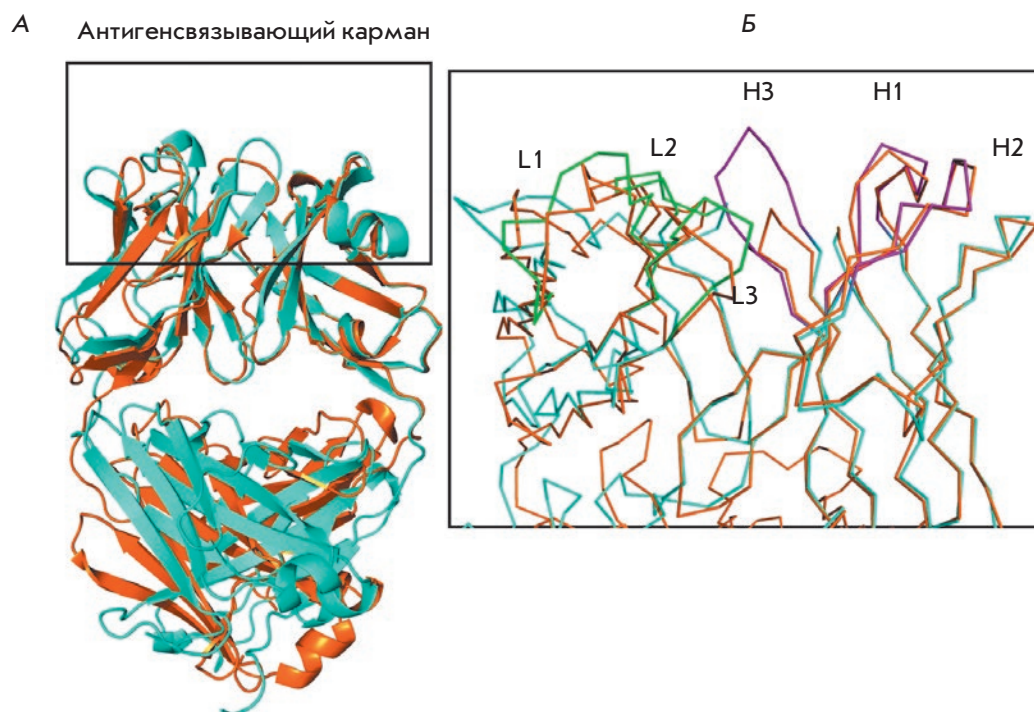


Рис. 4. А – структуры FabC₆₀ (показана голубым) и анти-C₆₀ Fab (показана оранжевым цветом) [15], совмещенные по V_H-доменам. Антигенсвязывающий карман выделен рамкой. Б – увеличенные области связывания C₆₀ в FabC₆₀ (голубой) и анти-C₆₀ Fab (оранжевый), совмещенные по V_H-доменам. Гиперварибельные участки тяжелых и легких цепей FabC₆₀ окрашены фиолетовым и зеленым

фактом кристаллической упаковки. Однако мы предполагаем, что подобная кристаллическая упаковка, стабилизированная дополнительными водородными связями, препятствует связыванию антигена и является одной из причин, не позволивших нам закристаллизовать комплекс FabC₆₀ и SolC₆₀.

Степень гомологии первичной структуры FabC₆₀ и ранее описанных антител к фуллерену (анти-C₆₀ Fab, pdbid 1emt) [15] довольно высока и составляет 76 и 40% по H- и L-цепям соответственно. FabC₆₀ содержит легкую λ-цепь, в то время как анти-C₆₀ Fab – легкую κ-цепь. Структуры этих антител отличаются взаимным расположением V- и C-доменов, поэтому сравнительный анализ этих двух структур затруднен. При совмещении структур по координатам V_H домена r.m.s.d. составляет 0.4 Å (рис. 4А). Антигенсвязывающие карманы этих антител отличаются по составу и строению, максимальные отличия наблюдаются в укладке L-цепи и петли CDR H3 (рис. 4Б). Петля H3 анти-C₆₀ Fab [15] на семь остатков короче петли H3 FabC₆₀ (11 остатков).

Докинг C₆₀ в FabC₆₀ и анализ связывания C₆₀ с FabC₆₀

Поскольку нам не удалось получить структуру комплекса C₆₀ с FabC₆₀, мы выполнили докинг C₆₀ в антигенсвязывающем кармане FabC₆₀, чтобы определить структурные особенности связывания фуллерена с антителами [26]. Известно, что связывание антигена сопровождается конформационными изменениями в гиперварибельных участках [29, 30].

Максимальные структурные перестройки наблюдаются в петле CDR H3, которая имеет наибольшую подвижность и наиболее трудна для моделирования среди всех петель антигенсвязывающего региона [31]. Для понимания возможного влияния петли CDR H3 на связывание антигена мы сравнили две модели комплекса C₆₀ с нативной формой FabC₆₀ (Комплекс I) и модифицированной формой FabC₆₀ с удаленными остатками Asp100 и Tyr101 из CDR H3 (Комплекс II) (рис. 5).

В комплексе I молекула C₆₀ связывается на поверхности антигенсвязывающего сайта и образует π-π-стэкинг с остатками: Tyr50 (CDR H2), Tyr101 (CDR H3) и Trp93 (CDR L3). При связывании фуллерена площадь его доступной растворителю поверхности снижается на 40%. Энергия связывания, рассчитанная с использованием программы Autodock Vina, составила -7 ккал×моль⁻¹, что соответствует константе диссоциации (K_d) комплекса, равной 7.4 × 10⁻⁶ М. Экспериментально определенная K_d комплекса C₆₀ и полноразмерных антител В1 к фуллерену составила 1.1 × 10⁻⁷ М [18]. С учетом 80-кратного снижения аффинности взаимодействия C₆₀ с FabC₆₀, K_d комплекса C₆₀ и FabC₆₀ оценивается величиной 9 × 10⁻⁶ М, что хорошо коррелирует с величиной, рассчитанной для модели комплекса C₆₀ с нативной формой FabC₆₀, полученной докингом.

Удаление остатков Asp100 и Tyr101 приводит к тому, что в комплексе II молекула C₆₀ глубже входит в антигенсвязывающую полость и связывается на расстоянии около 4 Å от положения C₆₀ в комплек-

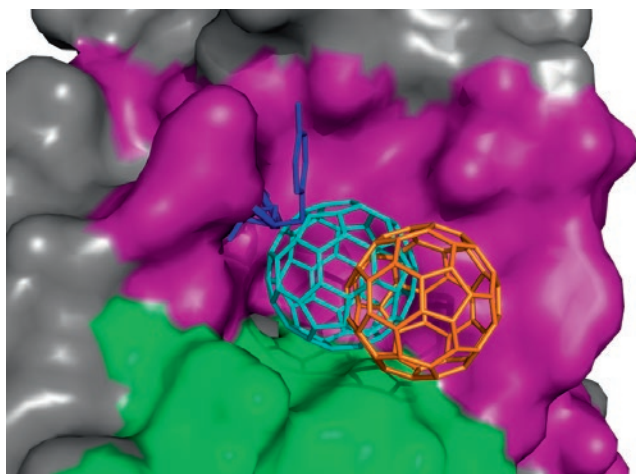


Рис. 5. Смоделированное с использованием программы Autodock Vina связывание C_{60} (показан стержневой моделью) в немодифицированном (оранжевый каркас C_{60}) и модифицированном (голубой каркас C_{60}) антигенсвязывающем кармане $FabC_{60}$. Остатки Asp100-Tyr101, удаленные в модифицированной структуре, показаны стержневой моделью синего цвета. Поверхность Н- и L-цепей модифицированного антигенсвязывающего кармана, использованная для генерации рецептора в Autogrid, окрашена фиолетовым и зеленым соответственно

се I (рис. 5). Энергия связывания, рассчитанная с использованием программы Autodock Vina, растет с -7 до -12 ккал \times моль $^{-1}$, что соответствует снижению величины K_d комплекса с 7.4×10^{-6} до 1.6×10^{-9} М. Рост аффинности в отсутствие Asp100 и Tyr101 объясняется образованием дополнительных (помимо ранее упомянутых) π - π -взаимодействий с His35 Н-цепи и Tyr34 L-цепи, а также снижением площади доступной растворителю гидрофобной поверхности C_{60} с 60 до 40% от исходной. Таким образом, остатки Asp100 и Tyr101 из CDR H3 могут играть ключевую роль в снижении аффинности взаимодействия фуллерена C_{60} с соответствующими антителами.

В уже упомянутой работе [15] также не удалось получить кристаллическую структуру комплекса Fab-фрагментов (pdbid 1emt) с C_{60} , и структура комплекса была смоделирована с использованием программы INSIGHT 2 по методике, отличной от ис-

пользованной в нашей работе: молекулу C_{60} вручную помещали в полость варибельного домена между Н- и L-цепями, после чего энергия системы минимизировалась [15]. В связывание C_{60} в полученной модели вовлечены остатки Tyr36, Gln89, Phe96 и Phe98 L-цепи и Asn35, Trp47 и Trp106 Н-цепи, связывание сопровождалось уменьшением на 90% площади доступной растворителю гидрофобной поверхности фуллерена [15].

Единственными экспериментально установленными структурами, по которым возможно проверить правильность выводов о движущих силах образования комплекса антитело-фуллерен, являются структуры комплекса C_{60} с синтетическим белком (pdbid 5hkn, 5hkr, 5et3) [32]. Фуллерен C_{60} в этих комплексах связан в гидрофобном кармане. При связывании доступная растворителю гидрофобная поверхность C_{60} уменьшается на $\sim 90\%$ и образуется π - π -стэкинг-взаимодействие с остатком Tyr9. Проведенный нами дополнительный анализ структур позволил обнаружить не упомянутое в работе [32] еще одно π - π -взаимодействие C_{60} с пептидной связью Leu19-Ala20.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты, полученные при моделировании строения комплексов C_{60} с $FabC_{60}$, согласуются с экспериментальными данными [32]. Основной вклад в энергию связывания фуллерена с белками вносят гидрофобные и π - π -стэкинг-взаимодействия. Подвижный фрагмент петли в гиперварибельном участке H3 затрудняет доступ C_{60} к антигенсвязывающему сайту, что объясняет низкую аффинность изучаемых антител (K_d около 10^{-7} М).

Остатки Thr33 и His35 в антигенсвязывающем кармане, которые в растворе могут быть вовлечены в связывание фуллерена, в условиях кристаллизации образуют водородные связи с С-концевыми остатками симметрично расположенной молекулы $FabC_{60}$, стабилизируя кристаллическую упаковку свободной формы $FabC_{60}$ и препятствуя кристаллизации комплекса C_{60} с $FabC_{60}$. ●

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН № 32 «Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sundberg E.J., Mariuzza R.A. // Adv. Protein Chem. 2002. V. 61. P. 119–160.
- Sundberg E.J. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 524. P. 23–36.
- Calvaresi M., Zerbetto F., Ciamician C.G., Bologna U., Selmi V.F. // ACS Nano. 2010. V. 4. № 4. P. 2283–2299.
- Dunbar J., Krawczyk K., Leem J., Baker T., Fuchs A., Georges G., Shi J., Deane C.M. // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. № D1. P. D1140–D1146.
- Abbott W.M., Damschroder M.M., Lowe D.C. // Immunology. 2014. V. 142. № 4. P. 526–535.
- Wilson I.A., Rini J.M., Fremont D.H., Fieser G.G., Stura E.A. // Methods Enzymol. 1991. V. 203. P. 153–176.
- Clementi N., Mancini N., Castelli M., Clementi M., Burioni R. // Drug Discov. Today. 2013. V. 18. № 9–10. P. 464–471.
- Narciso J.E.T., Uy I.D.C., Cabang A.B., Chavez J.F.C., Pablo J.L.B., Padilla-Concepcion G.P., Padlan E.A. // Nat. Biotechnol. 2011. V. 28. № 5. P. 435–447.

9. Malito E., Carfi A., Bottomley M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. № 12. P. 13106–13140.
10. Jeevanandam J., Barhoum A., Chan Y.S., Dufresne A., Danquah M.K. // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2018. V. 9. № 1. P. 1050–1074.
11. Boraschi D., Italiani P. // *Vaccines.* 2015. V. 3. № 4. P. 930–939.
12. Sun T., Zhang Y.S., Pang B., Hyun D.C., Yang M., Xia Y. // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2014. V. 53. № 46. P. 12320–12364.
13. Stylianopoulos T., Jain R.K. // *Nanomedicine Nanotechnology. Biol. Med.* 2015. V. 11. № 8. P. 1893–1907.
14. Castro E., Garcia A.H., Zavala G., Echegoyen L. // *J. Mater. Chem. B.* 2017. V. 5. № 32. P. 6523–6535.
15. Braden B.C., Goldbaum F.A., Chen B.X., Kirschner A.N., Wilson S.R., Erlanger B.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 22. P. 12193–12197.
16. Chen B.-X., Wilson S.R., Das M., Coughlin D.J., Erlanger B.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 18. P. 10809–10813.
17. Hendrickson O.D., Fedyunina N.S., Martianov A.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *J. Nanoparticle Res.* 2011. V. 13. № 9. P. 3713–3719.
18. Hendrickson O., Fedyunina N., Zherdev A., Solopova O., Sveshnikov P., Dzantiev B. // *Analyst.* 2012. V. 137. № 1. P. 98–105.
19. Kabsch W. // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 2010. V. 66. № 2. P. 125–132.
20. Winn M.D., Ballard C.C., Cowtan K.D., Dodson E.J., Emsley P., Evans P.R., Keegan R.M., Krissinel E.B., Leslie A.G.W., McCoy A., et al. // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 2011. V. 67. № Pt 4. P. 235–242.
21. Long F., Vagin A.A., Young P., Murshudov G.N. // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 2008. V. 64. № Pt 1. P. 125–132.
22. Cygler M., Wu S., Zdanov A., Bundle D.R., Rose D.R. // *Biochem. Soc. Trans.* 1993. V. 21. № 2. P. 437–441.
23. Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 1997. V. 53. № 3. P. 240–255.
24. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 2010. V. 66. № 4. P. 486–501.
25. The PyMOL Molecular Graphics System. Version 2.0 Schrödinger, LLC.
26. Trott O., Olson A.J. // *J. Comput. Chem.* 2009. V. 31. № 2. P. 455–461.
27. Kabat E.A., Te Wu T., Foeller C., Perry H.M., Gottesman K.S. *Sequences of Proteins of Immunological Interest.* Diane Publ. Comp. Bethesda, MD, USA, 1992.
28. Martin A.C. // *Proteins.* 1996. V. 25. № 1. P. 130–133.
29. Stanfield R.L., Wilson I.A. // *Trends Biotechnol.* 1994. V. 12. № 7. P. 275–279.
30. Weitzner B.D., Dunbrack R.L., Gray J.J., Gray J.J. // *Structure.* 2015. V. 23. № 2. P. 302–311.
31. Regep C., Georges G., Shi J., Popovic B., Deane C.M. // *Proteins.* 2017. V. 85. № 7. P. 1311–1318.
32. Kim K.H., Ko D.K., Kim Y.T., Kim N.H., Paul J., Zhang S.Q., Murray C.B., Acharya R., Degrado W.F., Kim Y.H., et al. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. A. 11429.

УДК 578.242, 578.831.11

Адаптация вируса болезни Ньюкасла к клеточным линиям с целью повышения онколитических свойств

К. С. Юрченко^{1*}, И. Цзин², А. М. Шестопапов¹¹Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

*E-mail: xenia7yurchenko@gmail.com

Поступила в редакцию 30.10.2018

Принята к печати 11.02.2019

РЕФЕРАТ Настоящая работа посвящена адаптации природных штаммов вируса болезни Ньюкасла, выделенных от диких птиц, на опухолевых клетках человека. Большинство потенциальных онколитических вирусов относится к патогенным для человека видам. При манипуляции с генетическим материалом всегда есть риск получить вирус с нестабильным геномом. Решением может быть применение в качестве онколитических агентов природных апатогенных для человека вирусов. Вирус болезни Ньюкасла – возбудитель контагиозных заболеваний птиц, природные штаммы которого проявляют противоопухолевое действие и считаются безопасными для человека. Как показано в ряде работ, онколитические свойства природных штаммов можно повысить в процессе адаптации к культурам клеточных линий без вмешательства в геном вируса. В данной работе показано, что последовательные пассажи позволяют повысить инфекционный титр вируса на раковых клетках и привести к снижению жизнеспособности опухолевых клеток после инфицирования штаммом, адаптированным на этих клеточных линиях. Полученные результаты дополняют известные данные о процессе адаптации вируса болезни Ньюкасла к опухолевым клеткам человека. Таким образом, при адаптации вируса болезни Ньюкасла можно получить штамм с более выраженным онколитическим потенциалом, что необходимо учитывать при выборе стратегии разработки противоопухолевых препаратов на основе этого вируса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА адаптация, вирус болезни Ньюкасла, онколитические свойства, опухолевые клетки, цитотоксическое действие.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВБН – вирус болезни Ньюкасла; ДМСО – диметилсульфоксид; ИФН – интерферон; ТЦД50 – 50%-тканевая цитопатическая доза; ФБС – фетальная бычья сыворотка; ЦТД – цитотоксическое действие; ВСЖ – вирусосодержащая жидкость.

ВВЕДЕНИЕ

Виротерапия – это экспериментальный метод таргетной терапии злокачественных заболеваний с использованием онколитических вирусов, в том числе вируса болезни Ньюкасла (ВБН) (семейство Paramyxoviridae, род *Avulavirus*) для селективного уничтожения опухолевых клеток [1]. Онколитические вирусы избирательно инфицируют опухолевые клетки и используют их активированный синтетический аппарат для репликации, что вызывает цитотоксическое действие (ЦТД) и приводит к гибели клеток [2]. Нормальные здоровые клетки остаются при этом неповрежденными за счет развития раннего противовирусного интерферонового ответа, который предотвращает репликацию вирусного генома [3]. Вирус болезни Ньюкасла привлек к себе

внимание в качестве потенциального онколитического вируса в середине XX века и на сегодняшний день зарекомендовал себя как безопасный и эффективный противоопухолевый агент [4].

Штаммы ВБН для виротерапевтических исследований делят на литические и нелитические на основании свойств F-белка [5]. И литические, и нелитические штаммы могут действовать как мощные противораковые агенты. Преимущество литических штаммов обусловлено созданием инфекционного потомства за счет множественных циклов репликации и распространения цитотоксического эффекта в опухолевой ткани. Нелитические штаммы выполняют только один цикл репликации. Потомство нелитических штаммов содержит неактивные варианты F-белка, а противоопухолевые эффекты связаны

преимущественно со стимуляцией иммунного ответа [6].

Значительная часть исследований в области виротерапии посвящена созданию рекомбинантных штаммов для усиления противоопухолевых свойств вирусов. Однако разработка вирусных конструкций сопряжена с необходимостью контроля биологических свойств полученного вируса, его тропности, элиминации возможного инсерционного мутагенеза и рекомбинаций, связанных с восстановлением свойств изначально патогенных для человека вирусов [7, 8]. Природный онколитический потенциал штаммов ВБН, выделенных от диких птиц, позволяет использовать их для виротерапии без сложных модификаций генома. Различные лентогенные (низкопатогенные) и мезогенные (средней патогенности) штаммы ВБН изучали с 1960-х годов *in vitro* и *in vivo*, а также в клинических исследованиях на онкологических больных [9].

Несмотря на популярность генно-инженерных методов, применяемых при разработке вирусных конструкций для виротерапии, природные немодифицированные штаммы также могут выступать мощным противоопухолевым агентом. Отмечено, что природные штаммы ВБН, в число которых входят и хорошо изученные и участвовавшие в клинических испытаниях штаммы 73-Т, МТН-68, PV701 и NDV-HUJ [10], проявляют высокую онколитическую активность. Все эти штаммы объединяет принадлежность к литическому типу вируса, который напрямую убивает клетки. Кроме того, вирулентные мезогенные штаммы способны индуцировать в опухолевых клетках более мощный апоптотический ответ, в отличие от апатогенных и низковирулентных штаммов [11, 12].

Нерекомбинантный, природный аттенуированный штамм PV701, полученный от мезогенного штамма МК107 (Gaithersburg, США) [13], обладает противоопухолевой активностью на широком спектре опухолей эпителиального, нейроэктодермального и мезенхимального происхождения [10]. Другой литический штамм МТН-68/Н, происходящий от природного штамма Hertfordshire (Herts'33), оказывает цитотоксический эффект на различных опухолевых клетках человека [10], а системное или локорегиональное введение вируса приводит к частичной, а в некоторых случаях полной регрессии первичных и метастатических опухолей [14, 15]. Адаптированный природный штамм 73-Т вызывает образование синцития и гибель широкого ряда злокачественных клеток *in vitro* и *in vivo* [16, 17]. При этом природные мезогенные штаммы, оказывающие цитотоксическое действие на злокачественные клетки, безопасны для нормальных клеток человека [12, 16–18].

Изучение механизма противоопухолевого цитотоксического действия вирусных изолятов привело к появлению предположения о возможности получения штамма с еще более выраженными литическими свойствами в ходе адаптации вируса к культуре клеток [19]. В процессе адаптации вирусов могут возникать варианты, способные к более эффективному размножению в клетках-хозяевах, чем вирус дикого типа. С одной стороны, есть опасение, что при увеличении инфекционности вируса к адаптированным клеткам будет происходить снижение его вирулентности [20, 21], что, вероятно, может отрицательно сказаться на онколитических свойствах. С другой стороны, адаптация вируса к конкретной клеточной линии может приводить к усилению цитотоксического потенциала адаптированного вируса на этих клетках [22].

Так, полученный методом серийных ($n = 38$) пассажей на клетках асцитной карциномы Эрлиха штамм на основе природного MD20Z (США, 1945) проверили на модели *in vivo*. Общая недельная выживаемость мышей с асцитными опухолями после терапии вирусом поздних пассажей увеличивалась с 0 до 63,6%, при этом вирус активно реплицировался в опухолевых клетках и вызывал цитотоксический эффект быстрее, чем природный штамм [23]. Cassel W.A. и Garrett R.E. в своих исследованиях подтвердили усиление онколитического эффекта после адаптации вируса ВБН 379-SI, полученного из природного штамма MD20Z методом серийных ($n = 73$) пассажей на клетках асцитной карциномы Эрлиха *in vitro* и затем 13 пассажей *in vivo* [24]. В дальнейшем в США был проведен ряд успешных клинических испытаний аллогенных и аутологических вакцин на основе штамма ВБН 73-Т при метастатической меланоме [25].

Таким образом, учитывая данные, подтверждающие успешную адаптацию природных штаммов с усиленным противоопухолевым эффектом при последовательном пассировании, мы изучили адаптацию природных штаммов ВБН различного патотипа на линиях опухолевых клеток человека с целью проверки эффективности цитотоксических свойств, полученных при пассировании штаммов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеточных линий и штаммы вируса болезни Ньюкасла

В работе использованы перевиваемые клеточные культуры: Vero – линия клеток эпителия почки африканской зеленой мартышки, HCT116 – линия клеток колоректального рака (Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская обл.); HeLa – ли-

ния клеток рака шейки матки (НИИ клинической и экспериментальной лимфологии, Новосибирск); MCF7 – линия клеток аденокарциномы молочной железы (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург); A549 – линия клеток немелкоклеточного рака легкого (Клиника иммунопатологии Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск).

Для культивирования клеток Vero и опухолевых культур использовали ростовую среду ДМЕМ, содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 50 ед/мл гентамицина. Клетки культивировали в культуральных флаконах (25 см²) в стандартных условиях (при 37°С в атмосфере с 5% содержанием СО₂).

Штаммы вируса болезни Ньюкасла

В работе использовали четыре штамма ВБН: два вирулентных мезогенных штамма ВБН, выделенных на территории РФ от сизых голубей – NDV/Altai/pigeon/770/2011 [26] и NDV/Altai/pigeon/777/2010 [27], и два лентогенных штамма – NDV/mallard/Amur/264/2009 и NDV/teal/Novosibirsk_region/320/2010, выделенных от кряквы и чирка-свистунка соответственно.

Подготовка штаммов вируса болезни Ньюкасла

Штаммы вируса были наработаны в аллантоисной жидкости 10-дневных развивающихся куриных эмбрионов. Наличие вируса подтверждали в реакции гемагглютинации (РГА) с эритроцитами петуха и определяли титр гемагглютинина каждого штамма вируса по стандартной методике, рекомендованной ВОЗ [28].

Титрование вируса болезни Ньюкасла в культуре клеток Vero (ТЦД50)

Титрование вируса болезни Ньюкасла на чувствительной к цитопатическому действию ВБН культуре клеток Vero проводили согласно [29]. Клеточную суспензию рассеивали в ростовой среде на 96-луночные планшеты в концентрации 30000 клеток на лунку и культивировали в стандартных условиях.

Суточный монослой клеток отмывали раствором Хенкса и вносили 10-кратные разведения вируса на поддерживающей среде Игла-МЕМ с добавлением 1% ФБС. Планшеты инкубировали в стандартных условиях в течение 1 ч для адсорбции вируса, затем меняли вирусосодержащую жидкость (ВСЖ) на поддерживающую среду. Ежедневно под микроскопом контролировали состояние монослоя клеток на наличие ЦТД. Окончательный учет титрования проводили на 4-е сутки. Инфекционный титр вируса для культуры клеток Vero рассчитывали по мето-

ду Кербера в модификации Ашмарина и выражали в lgТЦД50/мл [30].

Последовательные пассирования штаммов ВБН на перевиваемой клеточной линии Vero и опухолевых клеточных линиях человека

Подготовку клеточной культуры и инфицирование 10-кратными разведениями вируса проводили так же, как при методе титрования. На 4-е сутки после инфицирования подсчитывали инфекционный титр и собирали ВСЖ крайних разведений. После чего проводили следующий пассаж с инфицированием клеток Vero собранным крайним разведением с использованием того же метода. Таким образом проводили 11 пассажей и рассчитывали инфекционный титр каждого пассажа.

Оценка жизнеспособности клеточных линий после инфицирования штаммами ВБН колориметрическим методом (МТТ-тест)

Жизнеспособность клеток всех опухолевых линий человека определяли с помощью МТТ-теста на 4-е сутки после инфицирования штаммами вируса. Суточный монослой опухолевых клеток на 96-луночном планшете отмывали раствором Хенкса и инкубировали с вирусами (титр 8 ГАЕ на 10000 клеток) в течение 1 ч в стандартных условиях. Далее клетки промывали раствором Хенкса и инкубировали в 200 мкл поддерживающей среды в течение 4 суток в стандартных условиях. Контрольные опухолевые клетки без вируса инкубировали в поддерживающей среде.

На 4-е сутки клетки отмывали раствором Хенкса. Рабочий раствор МТТ массовой концентрации 5 мг/мл на основе поддерживающей среды добавляли в объеме 100 мкл в лунку и инкубировали в течение 4 ч в стандартных условиях. Далее меняли раствор МТТ на ДМСО (150 мкл на лунку) и инкубировали в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре. Оптическую плотность измеряли при длине волны 540 и 630 нм на микропланшетном фотометре Lonza Biotek ELX808 Absorbance Microplate Reader (США). Жизнеспособность клеток оценивали по соотношению относительной доли живых и контрольных клеток, не обработанных вирусом, по формуле: $(V_{540} - V_{630}) / (K_{540} - K_{630}) \times 100\%$, где V – показатели зараженных вирусом лунок, а K – показатели контрольных лунок.

Инфицирование клеток опухолевых линий человека мезогенными штаммами ВБН для оценки репликативной активности вируса на разных опухолевых клетках

Репликативную активность штаммов ВБН на разных опухолевых клеточных линиях оценивали методом

титрования на клетках НСТ116, HeLa, A549, MCF7 после инфицирования штаммами ВБН.

Клетки опухолевых линий человека и контрольную культуру клеток Vero высевали в ростовой среде в культуральные флаконы (25 см²) и культивировали в стандартных условиях. Суточный монослой клеток дважды отмывали раствором Хенкса и инкубировали с вирусами в объеме 1 мл (титр 8 ГАЕ на 10000 клеток) с адсорбцией в течение 45 мин в стандартных условиях. Затем дважды промывали раствором Хенкса и добавляли свежую поддерживающую среду в объеме 10 мл и инкубировали в стандартных условиях. На 3, 6, 24, 48, 72 ч после заражения клеток штаммами ВБН инфекционный титр культуральной среды определяли титрованием в соответствующих опухолевых и модельной клеточной культуре общепринятым методом.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0. На основании *t*-критерия по таблице Стьюдента определяли вероятность различия сравниваемых средних величин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Штаммы вируса болезни Ньюкасла были наработаны в аллантоисной жидкости 10-дневных развивающихся куриных эмбрионов. Присутствие вируса в аллантоисной жидкости подтверждено в реакции РГА с эритроцитами петуха, инфекционный титр вируса определен на клеточной линии Vero (табл. 1). Показан высокий титр мезогенных штаммов, выделенных от сизых голубей, в реакции РГА и при титровании на клетках Vero.

На следующем этапе использовали две возможных системы повышения противоопухолевых свойств вируса болезни Ньюкасла. Первая система заключалась в пассировании штаммов ВБН на перевиваемой чувствительной клеточной линии Vero с адаптацией

Таблица 1. Титры природных штаммов вируса болезни Ньюкасла

Штамм	РГА/50 мкл	lgТЦД50/мл
NDV/Altai/pigeon/770/2011	512	6.7
NDV/Altai/pigeon/777/2010	256	6.5
NDV/mallard/Amur/264/2009	64	3.0
NDV/teal/Novosibirsk_region/320/2010	64	3.0

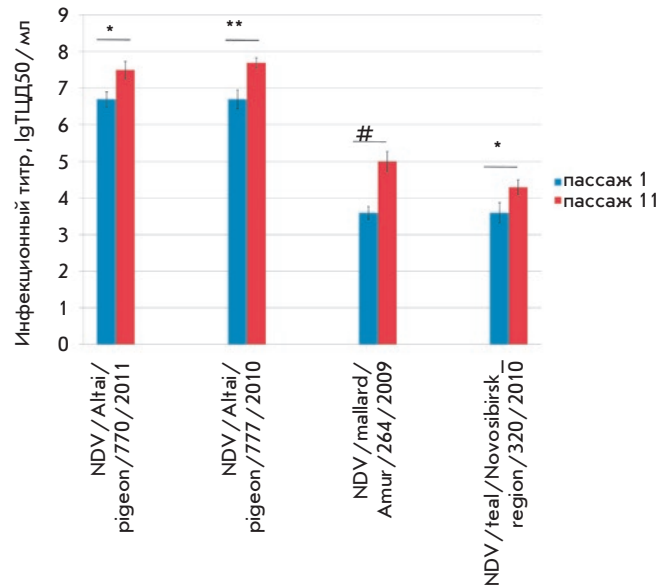


Рис. 1. Повышение значения инфекционного титра штаммов вируса болезни Ньюкасла в процессе адаптации к перевиваемой клеточной культуре Vero.

* *p* = 0.05, ** *p* = 0.01, # *p* = 0.001 (*t*-критерий Стьюдента)

вируса к данной линии и последующей проверкой жизнеспособности опухолевых клеточных линий после инфицирования адаптированными штаммами ВБН. Клетки Vero не синтезируют ИФН α и ИФН β , что позволяет вирусу болезни Ньюкасла беспрепятственно размножаться с высвобождением нового вирусного потомства и формировать ЦТД.

Вторая система заключается в адаптации штаммов к опухолевым линиям с оценкой динамики изменения жизнеспособности опухолевых клеток при инфицировании адаптированными штаммами вируса на поздних пассажах.

Согласно первой схеме, за 11 пассажей на клеточной линии Vero мезогенные штаммы NDV/Altai/pigeon/770/2011 и NDV/Altai/pigeon/777/2010, титр которых изначально был на несколько порядков выше, чем у лентогенных штаммов, и составлял 6.7 lgТЦД50/мл после первого пассажа, повысился до 7.5 и 7.7 lgТЦД50/мл соответственно (табл. 2, рис. 1). Не удалось достичь значения титра лентогенных штаммов NDV/mallard/Amur/264/2009 и NDV/teal/Novosibirsk_region/320/2010, схожего с титром мезогенных штаммов на поздних пассажах, несмотря на то, что титры выросли с 3.6 до 5.0 lgТЦД50/мл и с 3.6 до 4.3 lgТЦД50/мл соответственно. Вероятно, на способность вируса эффективно реплицироваться в клеточной культуре с образованием ЦТД влияет не только наличие «вирулентной» последовательности в сайте расщепления F-белка, но и принадлежность к патотипу,

Таблица 2. Динамика изменения титра штаммов вируса болезни Ньюкасла в процессе адаптации к перевиваемой клеточной культуре Vero

Штамм ВБН	Пассаж										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
NDV/Altai/pigeon/770/2011	6.7± 0.21	6.8± 0.52	6.7± 0.39	6.9± 0.15	6.9± 0.18	6.9± 0.23	7.0± 0.25	7.5± 0.31	7.5± 0.14	7.5± 0.34	7.5± 0.24
NDV/Altai/pigeon/777/2010	6.7± 0.26	6.7± 0.28	6.9± 0.31	6.9± 0.21	7.0± 0.19	7.0± 0.23	7.2± 0.33	7.7± 0.23	7.7± 0.21	7.7± 0.40	7.7± 0.14
NDV/mallard/Amur/264/2009	3.6± 0.18	3.6± 0.19	3.8± 0.22	3.8± 0.25	4.5± 0.24	4.7± 0.36	4.7± 0.33	5.0± 0.40	5.1± 0.36	5.0± 0.22	5.0± 0.28
NDV/teal/Novosibirsk_ region/320/2010	3.6± 0.28	3.6± 0.21	3.8± 0.18	3.7± 0.19	4.3± 0.31	4.2± 0.14	4.3± 0.29	4.3± 0.18	4.3± 0.26	4.4± 0.33	4.3± 0.20

Примечание. Представлено среднее значение ± стандартное отклонение.

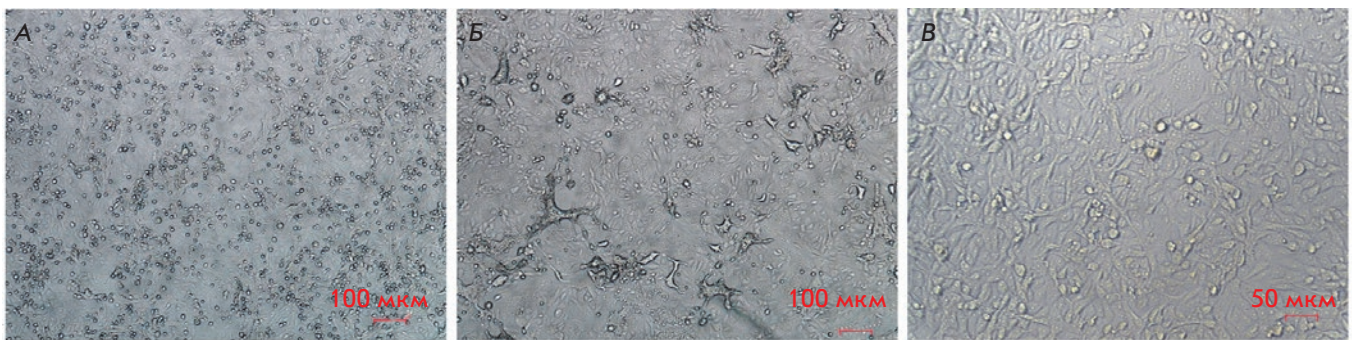


Рис. 2. Цитотоксическое действие ВБН NDV /Altai/pigeon/770/2011 на перевиваемой клеточной линии Vero, 7-й пассаж. А – инфицированная клеточная линия на 3-и сутки после инкубации с вирусом; Б – инфицированная клеточная линия на 4-е сутки после инкубации с вирусом; В – образование синцития в инфицированной клеточной линии на 2-е сутки после инкубации с вирусом

напрямую связанная с цитолитической способностью, так как все исследуемые штаммы содержат «вирулентную» последовательность сайта, но только NDV/Altai/pigeon/770/2011 и NDV/Altai/pigeon/777/2010 относятся к мезогенному типу [26, 27].

В процессе адаптации к клеточной линии Vero титр всех исследуемых штаммов вируса увеличивался и после 7–8-го пассажей не изменялся. Помимо увеличения инфекционного титра при постановке ТЦД50 отмечено нарастание морфологических изменений клеточного монослоя в культуре. При инфицировании мезогенными штаммами вируса на 1–3-м пассажах на Vero на 2–3-й день культивирования в клеточной культуре наблюдается цитотоксическое действие вируса с образованием областей с округлившимися погибшими клетками, которые открепляются от поверхности культурального планшета с распространением ЦТД на весь монослой к 4-м суткам. На последующих 5–11-ти пассажах помимо погибших округлившихся клеток, стандартного проявления цитотоксического действия вируса, в процессе вирусной репликации в клеточном монослое на 3–4-е сутки

образуются тяжи клеточных агломератов. К 7–10-му пассажу на 2–3-и сутки появляются структуры, похожие на синцитий, характерные для ЦТД при инфицировании парамиксовирусами (рис. 2). При этом, несмотря на различие в проявлении ЦТД на разных пассажах, максимальное поражение монослоя составляло примерно до 90% независимо от пассажа, а деструктивные изменения были наиболее выражены, как правило, на 4-е сутки после инфицирования.

Образование синцития, что характерно для культивирования разных представителей семейства парамиксовирусов, отмечено только в единичных случаях: штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 на 7-м пассаже на клетках Vero (рис. 2B) и штамма NDV/mallard/Amur/264/2009 на 10-м пассаже на 2-е и 3-и сутки соответственно, но не наблюдалось при первичном пассировании вируса на клетках Vero.

Не отмечено морфологических изменений монослоя в процессе пассирования лентогенных штаммов NDV/mallard/Amur/264/2009 и NDV/teal/Novosibirsk_region/320/2010, кроме одного случая образования синцития в монослое.

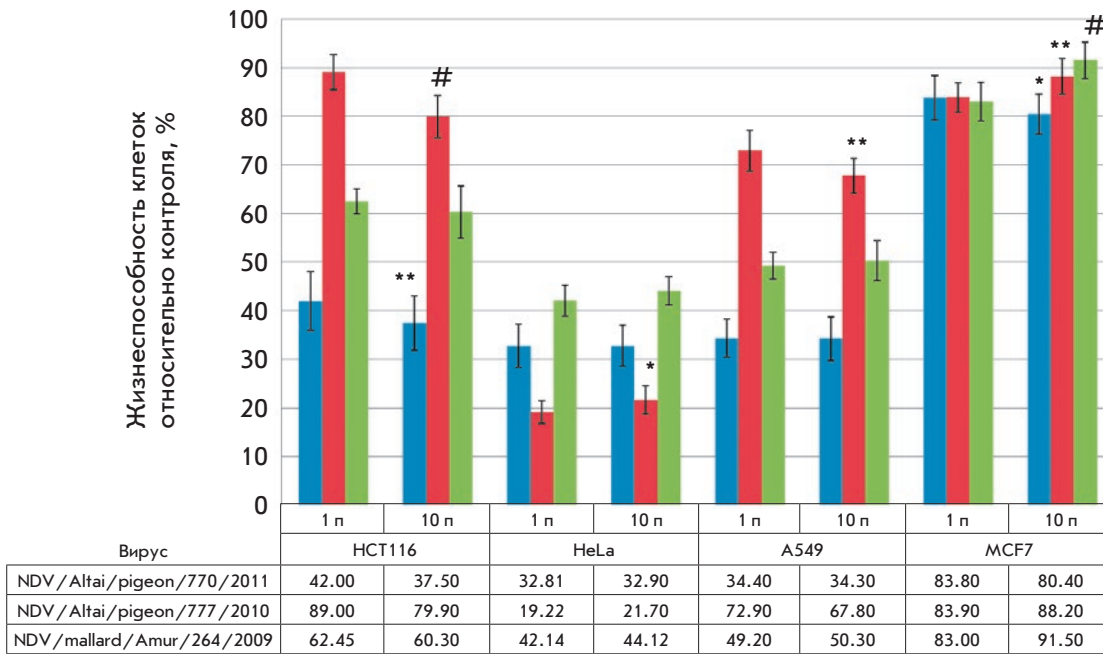


Рис. 3. Сравнительная оценка жизнеспособности опухолевых клеточных линий человека в зависимости от инфицирования штаммами ВБН 1-го (1 п) и 10-го (10 п) пассажа на Vero. МТТ-тест, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, # $p = 0.001$ (t-критерий Стьюдента)

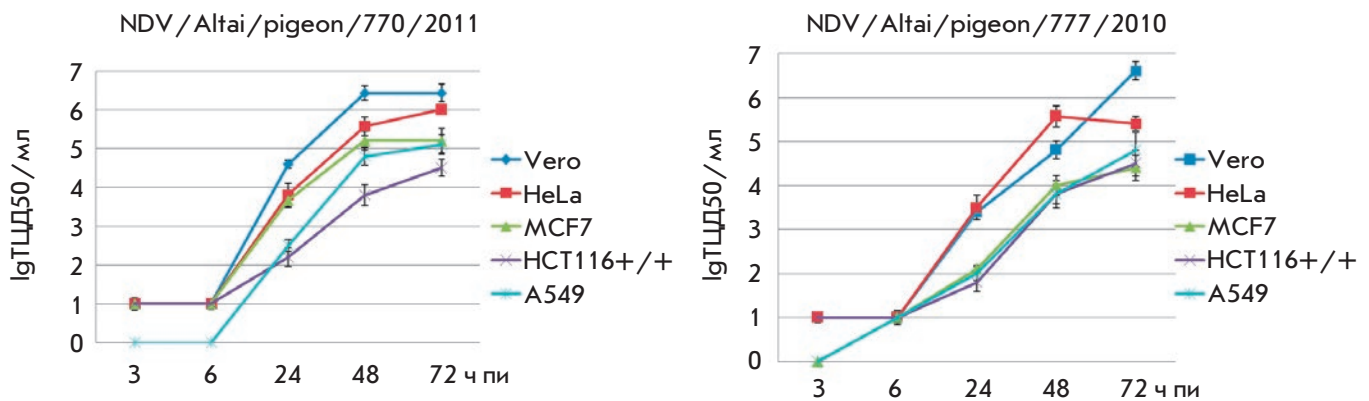


Рис. 4. Динамика репликативной активности штаммов вируса болезни Ньюкасла на чувствительной культуре Vero и опухолевых клеточных линиях человека. ч пи – часы после инфицирования

Адаптированные мезогенные штаммы NDV /Altai/pigeon/770/2011, NDV/Altai/pigeon/777/2010 и лентогенный штамм NDV/mallard/Amur/264/2009 на 10-м пассаже использовали для сравнительной оценки противоопухолевых свойств на перевиваемых линиях опухолевых клеток – HCT116, HeLa, A549, MCF7.

Множественность инфицирования опухолевых клеточных линий составила 8 ГАЕ/10000 клеток. Выживаемость клеточных линий после инфицирования оценивали в МТТ-тесте на 4-е сутки (рис. 3).

Сравнение жизнеспособности линий опухолевых клеток, инфицированных штаммами вируса 1-го и 10-го пассажей на линии клеток Vero, не выявило значительного увеличения противоопухолевой

активности ВБН, за исключением клеточной линии HCT116, жизнеспособность клеток которой снизилась на 5.0 и 9.9% после инфицирования NDV/Altai/pigeon/770/2011 и NDV/Altai/pigeon/777/2010 в 10-м пассаже на Vero соответственно.

На следующем этапе работы штаммы адаптировали на каждой опухолевой линии, чтобы проверить увеличится ли их противоопухолевый потенциал при адаптации на конкретной опухолевой линии.

Определена динамика репликативной активности мезогенных штаммов на всех опухолевых клеточных линиях, в том числе на линии клеток Vero в качестве положительного контроля (рис. 4). Титрование ВСЖ, собранной на 3, 6, 24, 48 и 72 ч, штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 показало динамику роста титра ви-

Таблица 3. Динамика изменения титра штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 в процессе адаптации к перевиваемым опухолевым клеточным культурам

Опухолевые клеточные линии	Пассаж										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
HCT116	4.5± 0.33	4.6± 0.32	4.6± 0.47	4.6± 0.40	5.0± 0.60	5.4± 0.28	5.2± 0.39	5.6± 0.41	6.0± 0.14	6.4± 0.63	6.4± 0.56
HeLa	6.0± 0.54	5.8± 0.44	5.6± 0.61	5.8± 0.56	5.8± 0.36	5.4± 0.42	6.0± 0.55	6.0± 0.61	6.2± 0.21	6.8± 0.61	6.6± 0.78
A549	5.1± 0.58	5.4± 0.41	5.2± 0.37	5.6± 0.26	5.8± 0.33	5.8± 0.29	5.8± 0.34	5.8± 0.36	6.2± 0.36	6.0± 0.52	6.0± 0.45
MCF7	5.2± 0.43	5.2± 0.43	5.2± 0.51	5.0± 0.44	5.6± 0.49	5.8± 0.52	5.8± 0.55	5.8± 0.32	5.8± 0.26	5.8± 0.48	5.8± 0.36

Примечание. Приведены средние значения ± стандартное отклонение.

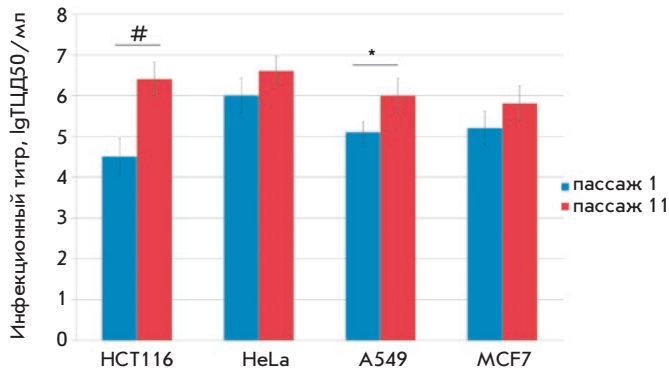


Рис. 5. Повышение инфекционного титра штаммов вируса болезни Ньюкасла в процессе адаптации к перевиваемым линиям опухолевых клеток человека, * $p = 0.05$, # $p = 0.001$ (t -критерий Стьюдента)

руса – наибольший титр на 3-и сутки получен на клеточной культуре Vero, наименьший – на клеточной линии HCT116. Схожие данные получены для штамма NDV/Altai/pigeon/777/2010, а наименьший титр получен на клеточных линиях HCT116 и MCF7.

Штаммы NDV/Altai/pigeon/770/2011 и NDV/Altai/pigeon/777/2010 сходны по своим параметрам и репликативной активности, поэтому для дальнейшей работы по адаптации вируса к клеточным опухолевым линиям с целью повышения онколитического потенциала был выбран один штамм – NDV/Altai/pigeon/770/2011. Этот штамм пассировали на опухолевых клеточных линиях до 11-го пассажа как описано выше (табл. 3, рис. 5).

Увеличение титра наблюдали при пассировании вируса (пассажи 1–11) на клетках: HCT116 – на 1.9 lgTCID50/мл, HeLa – на 0.6 lgTCID50/мл, A549 – на 0.9 lgTCID50/мл, MCF7 – на 0.6 lgTCID50/мл. Однако только в случае клеточной линии HCT116 можно говорить о нарастании титра почти на 2 порядка в ре-

зультате адаптации штаммов. Жизнеспособность клеточных опухолевых линий после инфицирования штаммами 10-го пассажа, наработанными на опухолевых клетках HCT116, HeLa и A549 снизилась на 1.6, 4.1 и 6.0% соответственно, а в случае клеток MCF7 повысилась на 0.8% (рис. 6).

Возможно, для адаптации на опухолевых клетках необходима другая методика, включающая культивирование в более высоких пассажах или пассирование в аллантоисной жидкости развивающихся куриных эмбрионов и в комбинации *in vitro*.

Таким образом, прямая взаимосвязь между динамикой наработки вируса в опухолевых клеточных линиях и эффективностью противоопухолевого действия путем прямого онколизиса этих клеток, вероятно, отсутствует, что может подтверждать существование различий в чувствительности каждой конкретной клеточной линии к онколитическому действию вируса. Так, удалось добиться снижения жизнеспособности клеток HCT116 на 5 и 10% после их инфицирования штаммами NDV/Altai/pigeon/770/2011 и NDV/Altai/pigeon/777/2010, которые пассировали на перевиваемой культуре клеток Vero. Возможно, клеточная линия HCT116 более чувствительна к инфицированию адаптированными штаммами и для усиления эффекта необходимо более длительное пассирование штаммов, возможно, в комбинации с пассированием в аллантоисной жидкости развивающихся куриных эмбрионов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адаптация вируса может служить способом повышения инфекционного титра для последующего использования вируса в качестве противоопухолевого агента с более выраженными онколитическими свойствами. Чувствительная культура клеток Vero может использоваться для наработки природных штаммов ВБН. Адаптация штаммов ВБН на клеточной культу-

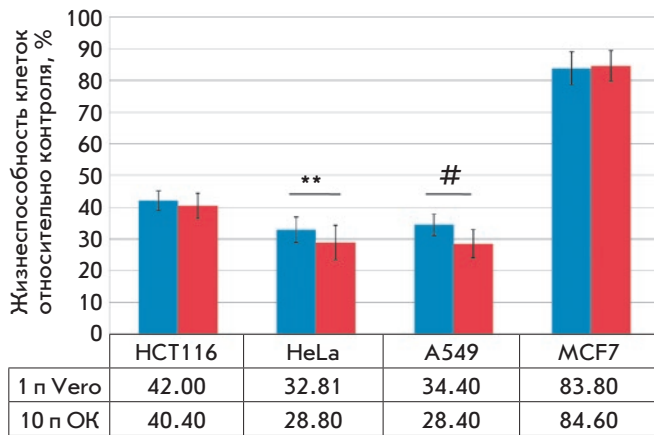


Рис. 6. Сравнительная оценка жизнеспособности опухолевых клеточных линий человека в зависимости от инфицирования штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 1-го (1 п) пассажа на Vero и 10-го (10 п) пассажа на опухолевых клетках (ОК), МТТ-тест, ** $p = 0.01$, # $p = 0.001$ (t -критерий Стьюдента)

ре Vero (11 пассажей) приводит к статистически значимому повышению титра вируса независимо от его вирулентности и уровня начального титра: средний инфекционный титр повысился на 0.8 и 1.1 lgТЦД50/мл у мезогенных штаммов и на 0.7 и 1.4 lgТЦД50/мл у лентогенных.

Снижение жизнеспособности опухолевых клеток, чувствительных к ВБН в 1-м пассаже, после инфицирования адаптированным на этих линиях штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 в 11-м пассаже и невосприимчивость резистентной линии MCF7 как к ВБН в 1-м пассаже, так и к ВБН в 11-м пассаже на MCF7, свидетельствуют о возможности повышения онкологических свойств путем адаптации штаммов и необходимостью оптимизации пассирования. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00139.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Buijs P.R., Verhagen J.H., van Eijck C.H., van den Hoogen B.G. // Hum. Vaccin. Immunother. 2015. V. 11. № 7. P. 1573–1584.
- Schirmacher V. // Expert Opin. Biol. Ther. 2015. V. 15. № 12. P. 1757–1771.
- Biswas M., Kumar S.R., Allen A., Yong W., Nimmanapalli R., Samal S.K., Elankumaran S. // Viral Immunol. 2012. V. 25. № 4. P. 268–276.
- Schirmacher V. // Biomedicines. 2016. V. 4. № 3. P. pii: E16.
- Schirmacher V., Fournier P. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 542. P. 565–605.
- Ginting T.E., Suryatenggara J., Christian S., Mathew G. // Oncolytic Virother. 2017. V. 6. P. 21–30.
- Chen N., Bellone C.J., Schriewer J., Owens G., Fredrickson T., Parker S., Buller R.M. // Virology. 2011. V. 409. № 2. P. 328–337.
- Lee P., Knight R., Smit J.M., Wilschut J., Griffin D.E. // J. Virol. 2002. V. 76. № 12. P. 6302–6310.
- PDQ Integrative, Alternative, and Complementary Therapies Editorial Board. Newcastle Disease Virus (PDQ®): Health Professional Version. 2018 Aug 22. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65752/>
- Lam H.Y., Yeap S.K., Rasoli M., Omar A.R., Yusoff K., Suraini A.A., Alitheen N.B. // J. Biomed. Biotechnol. 2011. V. 2011. P. 718710.
- Ghrici M., El Zowalaty M., Omar A.R., Ideris A. // Int. J. Mol. Med. 2013. V. 31. № 3. P. 525–532.
- Bian J., Wang K., Kong X., Liu H., Chen F., Hu M., Zhang X., Jiao X., Ge B., Wu Y., Meng S. // Arch. Virol. 2011. V. 156. № 8. P. 1335–1344.
- Pecora A.L., Rizvi N., Cohen G.I., Meropol N.J., Stermann D., Marshall J.L., Goldberg S., Gross P., O’Neil J.D., Groene W.S., et al. // J. Clin. Oncol. 2002. V. 20. № 9. P. 2251–2266.
- Csatary L.K., Bakács T. // JAMA. 1999. V. 281. № 17. P. 1588–1589.
- Apostolidis L., Schirmacher V., Fournier P. // Int. J. Oncol. 2007. V. 31. № 5. P. 1009–1019.
- Reichard K.W., Lorence R.M., Cascino C.J., Peeples M.E., Walter R.J., Fernando M.B., Reyes H.M., Greager J.A. // J. Surg. Res. 1992. V. 52. № 5. P. 448–453.
- Lorence R.M., Katubig B.B., Reichard K.W., Reyes H.M., Phuangsab A., Sasseti M.D., Walter R.J., Peeples M.E. // Cancer Res. 1994. V. 54. № 23. P. 6017–6021.
- Yurchenko K.S., Zhou P., Kovner A.V., Zavjalov E.L., Shestopalova L.V., Shestopalov A.M. // PLoS One. 2018. V. 13. № 4. P. e0195425.
- Moore A.E. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1952. V. 54. № 6. P. 945–952.
- Ahamed T., Hossain K.M., Billah M.M., Islam K.M.D., Ahasan M.M., Islam M.E. // Int. J. Poult. Sci. 2004. V. 3. № 2. P. 153–156.
- Visnuvinayagam S., Thangavel K., Lalitha N., Malmarugan S., Sukumar K. // Braz. J. Microbiol. 2015. V. 46. № 3. P. 861–865.
- Kumar R., Tiwari A.K., Chaturvedi U., Kumar G.R., Sahoo A.P., Rajmani R.S., Saxena L., Saxena S., Tiwari S., Kumar S. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2012. V. 167. № 7. P. 2005–2022.
- Flanagan A.D., Love R., Tesar W. // Proc. Soc. Exper. Bid. Med. 1955. V. 90. № 1. P. 82–86.
- Cassel W.A., Garrett R.E. // Cancer. 1965. V. 18. P. 863–868.
- Cassel W.A., Murray D.R., Torbin A.H., Olkowski Z.L., Moore M.E. // Cancer. 1977. V. 40. № 2. P. 672–679.
- Yurchenko K.S., Sivay M.V., Glushchenko A.V., Alkhovskiy S.V., Shchetinin A.M., Shchelkanov M.Y., Shestopalov A.M. // Genome Announ. 2015. V. 3. № 1. P. e01514-14.
- Kabilov M.R., Alikina T.Y., Yurchenko K.S., Glushchenko A.V., Gunbin K.V., Shestopalov A.M., Gubanov N.V. // Genome Announ. 2016. V. 4. № 6. pii: e01348-16.
- World Health Organization. Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf;jsessionid=E809BBF6E7FAD9118D7247FB101FF77E?sequence=1.
- World Health Organization. Virus titration and determination of tissue culture infectious dose (TCID50) for microneutralization assay. 2013. http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/cnic_serological_diagnosis_microneutralization_a_h7n9.pdf.
- Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград: Медгиз, Ленинградское отделение, 1962. 180 с.

УДК 577.151.34; 577.151.64

CASBench: эталонный набор белков с аннотированными каталитическим и аллостерическим сайтами в их структурах

А. С. Злобин^{1,2}, Д. А. Суплатов^{1,2}, К. Е. Копылов^{1,2}, В. К. Швядас^{1,2*}¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

*E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 06.11.2017

Принята в печать 13.12.2017

РЕФЕРАТ В последние годы все большее внимание уделяется явлению аллостерии. Это обусловлено как фундаментальным интересом к поиску новых путей регуляции функциональных свойств белков, так и перспективами использования аллостерических сайтов в качестве мишеней для дизайна лекарственных препаратов с меньшей токсичностью за счет большей селективности связывания и специфичности механизма действия. Современные методы биоинформатики позволяют в отдельных случаях обнаруживать ранее неизвестные центры связывания лигандов, однако для создания более универсальных и эффективных подходов необходимо дальнейшее изучение общих закономерностей и отличительных особенностей структурной организации функциональных (каталитических) и аллостерических сайтов, эволюции их аминокислотных последовательностей в семействах гомологичных белков, а также путей аллостерической коммуникации. Эталонный набор CASBench содержит 91 запись о ферментах, в структурах которых на основании экспериментальной информации из баз данных ASD, CSA и PDB аннотированы как каталитические, так и аллостерические сайты. Полученная выборка может быть использована для оценки эффективности существующих методов и разработки/обучения перспективных алгоритмов поиска новых каталитических и регуляторных сайтов в структурах белков, а также для изучения механизмов аллостерии на большой выборке ферментов. Установление взаимосвязи между структурой, функцией и регуляцией должно улучшить наше понимание механизмов действия ферментов и предоставить новые возможности для создания новых лекарств и дизайна более эффективных биокатализаторов. Работать с CASBench можно офлайн на локальном компьютере или онлайн с использованием встроенных интерактивных инструментов по адресу <https://biokinet.belozersky.msu.ru/casbench>.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аллостерический сайт, биоинформатика, веб-сервер, каталитический сайт, структурно-функциональные взаимосвязи, функция и регуляция белков, центры связывания лигандов, эталонный набор.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ASD – Allosteric Database; CASBench – Catalytic and Allosteric Sites Benchmark set; CSA – Catalytic Site Atlas; HTML5 – HyperText Markup Language версии 5; PDB – Protein Data Bank; PSE – Pymol Session (расширение бинарного файла).

ВВЕДЕНИЕ

Аллостерия – процесс регуляции функции белка при связывании лиганда или другого белка на соответствующем участке структуры [1]. Пятьдесят лет назад, когда на основании первых известных на тот момент случаев были предложены классические модели кооперативности, этот феномен считался особенностью полисубъединичных белков, функ-

ционирующих на уровне четвертичной структуры [2, 3]. Исследования последних лет позволили накопить большое количество свидетельств наличия аллостерии в белках с разным строением и функцией, в том числе в небольших мономерных белках. Стало понятно, что аллостерия – не исключительное свойство сложно организованных полисубъединичных комплексов, а широко распространенное явление,

которое играет важную роль в регуляции многих биологических процессов [4–8]. Методы компьютерной биологии были применены для изучения феномена аллостерии в попытке понять взаимосвязь между функцией и регуляцией [6, 9]. Биоинформатический анализ показал, что аминокислотная последовательность регуляторных сайтов менее консервативна по сравнению с каталитическими центрами [10]. Установлено, что каталитические и аллостерические центры насыщены так называемыми специфическими позициями, которые консервативны только внутри функциональных подсемейств, но различаются между ними и могут отвечать за функциональное разнообразие представителей одного суперсемейства, обуславливая, например, различия в специфичности к субстратам и регуляторным лигандам [11–13]. Анализ коррелирующих замен в аминокислотных последовательностях топологически независимых, но функционально взаимосвязанных центров в структуре родственных белков все более активно используется для изучения молекулярных механизмов аллостерии [9, 14]. Показано, что такие коррелирующие/ко-эволюционирующие позиции могут образовать цепочку взаимодействующих остатков между функциональным и регуляторным сайтами в структуре белка, обеспечивая их коммуникацию путем последовательных конформационных изменений, инициированных связыванием регуляторного агента [15, 16]. Описаны случаи прямой корреляции между позициями, расположенными в разных сайтах связывания на значительном удалении друг от друга (например, в семействе бактериальных факторов транскрипции LacI [17]). Информация о физически контактирующих аминокислотных остатках, а также удаленных коррелирующих позициях, в принципе, может быть использована для аннотации новых участков связывания и изучения молекулярных механизмов аллостерической коммуникации [18].

Структура белка все чаще рассматривается как набор конформеров, равновесие между которыми может измениться при связывании практически любого вещества на поверхности глобулы, вопрос состоит лишь в эффективности такого сдвига и его влиянии на функцию [19–22]. В таком случае аллостерия должна представлять универсальное явление, характерное для большинства белков. Обнаружение такого регуляторного механизма в белках, у которых аллостерия еще не известна, вызывает большой интерес в связи с важностью установления новых путей регуляции белков/ферментов с фундаментальной точки зрения и перспективами создания на основе аллостерических модуляторов лекарственных средств, обладающих меньшей токсичностью за счет

большей селективности действия [4, 23–26]. В последние годы все большее внимание уделяется разработке компьютерных методов нахождения новых регуляторных сайтов в структурах белков и поиска комплементарных им селективных лигандов, связывание которых способно влиять на функциональную активность биополимера [9]: с использованием геометрических [27–30], энергетических [31, 32] или биоинформатических критериев [13, 33–35], обучающих выборок экспериментально аннотированных сайтов [36, 37] и процедуры высокопроизводительного виртуального скрининга [38, 39]. Компьютерные программы могут предсказать много новых сайтов в структуре выбранного белка (десятки или даже сотни, в зависимости от размера глобулы и заданных параметров поиска), однако затем необходимо понять их функциональную роль и классифицировать в соответствии с выбранной оценочной функцией, например, по степени насыщения сайтов статистически значимыми консервативными [34, 35] или специфическими позициями [13]. Существующие методы позволяют в отдельных случаях находить новые регуляторные центры, однако очевидно, что возможности эффективного предсказания аллостерических сайтов пока весьма ограничены и необходимы достаточно универсальные компьютерные подходы, позволяющие выйти за рамки частных решений этой задачи. Можно отметить общий недостаток большинства известных алгоритмов поиска – они не учитывают различий между функциональными (каталитическими) и регуляторными (аллостерическими) центрами, а потому не могут дискриминировать сайты разных типов. Для создания более эффективных стратегий необходимо систематическое изучение общих закономерностей, а также отличительных особенностей структурной организации сайтов разных типов и эволюции их аминокислотных последовательностей в семействах гомологичных белков.

Первая попытка обобщить накопленный массив экспериментальной информации об аллостерических сайтах была предпринята в рамках базы данных ASD, которая содержит почти две тысячи записей [40]. База ASD является важным ресурсом для сбора экспериментальной информации об аллостерических белках, но содержит избыточные (повторяющиеся) данные, а также аннотации низкого качества, поэтому только небольшая часть этой коллекции может использоваться для изучения аллостерии и обучения/тестирования новых алгоритмов (235 записей [41]). Кроме того, в базе ASD не приведена аннотация функциональных (каталитических) центров – эта информация представлена в отдельной базе данных CSA [42]. В основе CSA лежат экспериментальные данные об одной тысяче ферментов, а методы био-

информатики используются для того, чтобы с высокой степенью значимости аннотировать наиболее консервативные каталитические остатки в ближайших гомологах с известной структурой, что позволяет расширить объем базы до десятков тысяч записей. Совместное использование экспериментальной информации об известных каталитических и аллостерических сайтах в структурах белков/ферментов могло бы помочь в изучении взаимосвязи между структурой, функцией и регуляцией, однако особенности организации и сложности форматирования записей в базах ASD и CSA делают их прямое сопоставление невозможным.

В данной работе на основании анализа публичных баз данных ASD, CSA и PDB составлена коллекция CASBench с описанием всех ферментов, в структурах которых на основании экспериментальных данных аннотированы каталитические и аллостерические сайты связывания. CASBench может быть использована в качестве эталонного набора для оценки эффективности существующих и разработки перспективных методов поиска новых функциональных и регуляторных сайтов в структурах белков. Наличие аннотации обоих центров в каждом белке позволит изучить особенности организации сайтов разных типов и научить компьютерные алгоритмы распознавать их. Работать с CASBench можно офлайн на локальном компьютере или онлайн с использованием встроенных интерактивных инструментов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создание эталонного набора CASBench

Сопоставлены последние версии трех публичных баз данных – аннотаций аллостерических сайтов в ASD, аннотаций каталитических сайтов в CSA и структурной информации, содержащейся в PDB. Работа выполнена с помощью оригинального программного обеспечения на Python 3 с использованием пакета BioPython [43], а также библиотек numru и ProDu. Протокол создания CASBench состоял из четырех основных этапов: (1) нумерация остатков аллостерических сайтов в ASD была приведена к нумерации остатков в репрезентативных PDB-структурах соответствующих белков; (2) для каждого белка в ASD собрана актуальная информация о всех структурах, представленных в PDB; (3) записи в ASD были сопоставлены с записями в CSA для выбора белков, представленных в обеих базах; (4) аннотация каталитического и аллостерического сайта по ASD и CSA уточнена с использованием информации о лигандах в структурах всех найденных кристаллографических комплексов и с учетом четвертичной структуры каждого белка (при наличии).

На первом этапе аннотация аллостерических сайтов каждого белка в ASD была приведена к единой нумерации в соответствии с записями в PDB. Трудность в работе с ASD заключалась прежде всего в неоднозначной нумерации аминокислотных остатков, образующих регуляторный сайт, которая иногда не соответствовала нумерации аминокислотной последовательности белка ни по PDB, ни по Uniprot, или была заменена на условные обозначения (например, DFG motif), что в некоторых случаях делало невозможной однозначную идентификацию сайта. Нумерация аминокислотных остатков сайта, аннотированного в ASD, которая не совпадала с нумерацией остатков соответствующего белка ни по PDB, ни по UniProt, автоматически корректировалась – проводился перебор всех возможных локализаций аминокислотных остатков сайта в последовательности каждой цепи PDB с учетом возможных замен, делеций и вставок. Те записи в ASD, однозначное установление нумерации остатков аллостерического сайта которых в соответствии с нумерацией по PDB-структуре было невозможно, далее не рассматривали. На втором этапе была собрана информация о всех представленных в PDB структурах каждого белка в ASD. Для этого аминокислотные последовательности всех белков, представленных в PDB, кластеризовали на уровне сходства 95% с использованием программы CD-HIT [44] (набор PDB95). Все PDB-структуры кластера, содержащего репрезентативную PDB-структуру, включали в соответствующую запись ASD для дальнейшего анализа. Четвертичная структура каждого белка (при наличии) была восстановлена по соответствующим записям BIOMT. На третьем этапе записи в ASD сопоставляли с записями в CSA. Аннотации каталитических сайтов в CSA для белков, схожих на 95% и более, объединяли в одну запись на основании выравниваний соответствующих аминокислотных последовательностей. Белки в ASD, которые не были аннотированы в CSA (т.е. ни одна PDB-структура белка, найденная на предыдущем этапе, не представлена в CSA), исключали из дальнейшего рассмотрения. На последнем этапе протокола в оставшихся записях (т.е. белках, у которых известен и каталитический, и аллостерический центры) первичная аннотация сайтов была уточнена. Аннотации сайтов в базах ASD и CSA могут быть представлены только несколькими остатками, роль которых проверена экспериментально (например, ключевые каталитически важные аминокислоты), что не дает представления о размерах и границах участков связывания. Для уточнения аннотации центров использована вся доступная экспериментальная информация о кристаллографических комплексах белков с лигандами. Собранная информация о всех

структурах в PDB каждого белка, представленного в ASD и в CSA, использована для поиска лигандов, расположенных в каждом сайте на расстоянии не более 5 Å от любого остатка, включенного в аннотацию. После этого первичную аннотацию каталитического и аллостерического сайтов по ASD и CSA дополняли вторичной аннотацией, полученной на основании анализа доступных кристаллографических комплексов – в каждой структуре выделены все остатки, расположенные на расстоянии не более 5 Å от соответствующего лиганда, полученные таким образом вторичные аннотации каждого сайта объединяли (дополняли) по всем PDB-структурам одного белка. Сформированный таким образом набор CASBench содержал записи о 91 ферменте.

Построение множественного выравнивания семейств белков

Уникальные цепи каждого белка, представленного в CASBench, использовали в качестве затравок для построения множественных выравниваний соответствующих семейств с использованием метода Mustguseal [45]. Поиск по сходству аминокислотных последовательностей использован для того, чтобы отобрать не более 5000 гомологов для последующего анализа [46]. Полученную первичную выборку фильтровали для исключения слишком похожих и слишком далеких белков. Вначале удаляли все последовательности, длина которых отличалась от затравки более чем на 20% – для исключения неполных записей и предотвращения образования колонок с избытком делеций в финальном выравнивании. Затем использовали алгоритм CD-HIT [44] для кластеризации белков на уровне сходства 95% по аминокислотной последовательности. Из каждого кластера автоматически выбирали одного представителя, остальные белки исключали из дальнейшего рассмотрения, затем удаляли белки, значительно отличающиеся по аминокислотной последовательности от затравки (сходство менее чем 0.25 бит на колонку и таким образом могли вызвать ошибки при выравнивании) [47, 48]. Множественное выравнивание полученной выборки представителей одного семейства строили алгоритмом MAFFT [49].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эталонный набор CASBench содержит 91 запись о ферментах, в структурах которых аннотированы как каталитические, так и аллостерические сайты на основании информации из баз данных ASD и CSA и анализа кристаллографических структур соответствующих комплексов с лигандами. CASBench включает ферменты всех основных функциональных классов EC-классификации, которые представ-

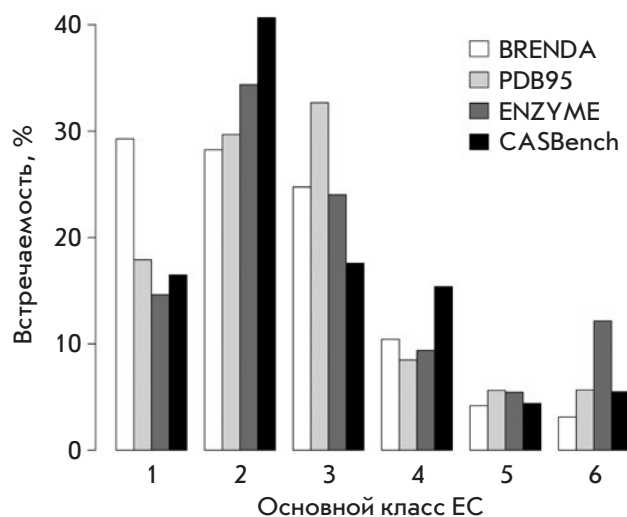


Рис. 1. Статистика представленности ферментов шести основных функциональных классов EC-классификации в базе данных BRENDA, 95% неизбыточном наборе белков в PDB (PDB95), базе данных ENZYME и наборе CASBench. Информация из базы данных BRENDA получена с использованием веб-сервиса SOAP (<https://www.brenda-enzymes.org/soap.php>). Протокол подготовки набора PDB95 см. в «Методах». Кластеры PDB95, которые включали неодинаковые цепи одного белка, объединяли. Для каждого полученного кластера по одному разу учитывали все основные классы EC-классификации, приведенные в PDB-аннотациях всех цепей соответствующих белков. Информация о представленности ферментов в базе данных ENZYME взята из [10]

лены пропорционально встречаемости в других базах данных (рис. 1). Топологический анализ показал, что CASBench содержит белки с разной пространственной организацией, а каталитический и аллостерический сайты в структуре могут быть по-разному расположены друг относительно друга (рис. 2). В 70% случаев в CASBench представлена аннотация мономерных белков, которые состоят из одной цепи, а в 30% речь идет о многомерных белках, состоящих из нескольких одинаковых или разных субъединиц. В 5% записей оба сайта образованы в области межсубъединичных контактов, в 22% один из сайтов формируется на стыке субъединиц, а в 73% случаев оба центра образованы непрерывными полостями, расположенными внутри отдельных цепей. Во всех аннотациях, представленных в CASBench, центры разных типов топологически независимы друг от друга, т.е. представляют отдельные полости в структуре фермента, но в 30% случаев каталитический и аллостерический сайты имеют общую область или границу,

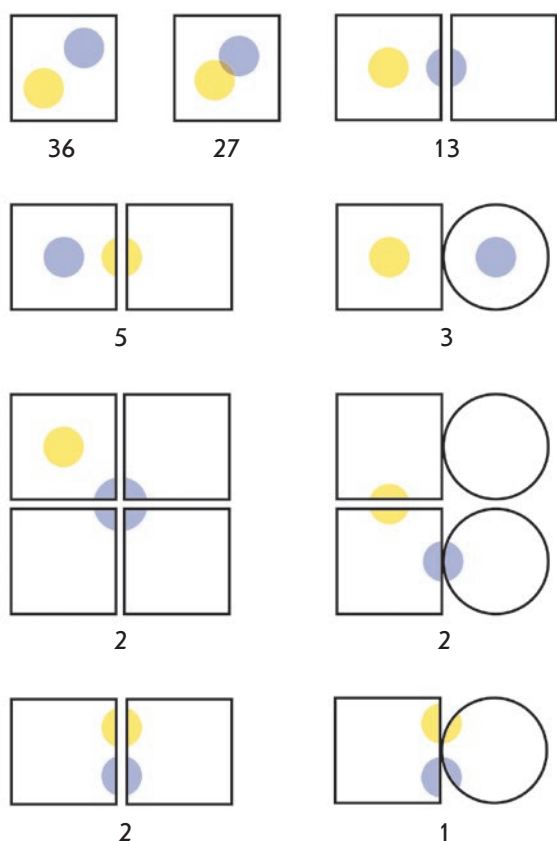


Рис. 2. Топологическая классификация расположения каталитического (желтый) и аллостерического (синий) сайтов в структуре ферментов, представленных в CASBench. Число соответствует количеству записей в CASBench с такой топологией. Одинаковые цепи многомерных белков показаны в виде квадратов, разные цепи – в виде квадрата и круга

а в 70% записей находятся на значительном удалении друг от друга и не пересекаются в структуре.

Запись CASBench для каждого белка имеет идентификатор вида CAS0001 (CAS0002, CAS0003 и т.д.) и содержит аннотацию всех центров, а также связанных в них лигандов во всех имеющихся кристаллографических структурах в базе данных PDB. Информация представлена в виде бинарных файлов в формате PSE для программы PyMOL Molecular Graphics System, которые могут быть использованы для визуального экспертного анализа, а также в виде текстовых файлов, предназначенных для автоматизированной обработки. Нужно отметить, что первичная аннотация каталитических и аллостерических сайтов в базах ASD и CSA может состоять только из нескольких остатков, роль которых в функции и регуляции белка проверена экспериментально.

Важной особенностью CASBench является уточнение аннотаций сайтов, приведенных в ASD и CSA, с использованием информации о кристаллографических комплексах из PDB – в эталонном наборе учитываются все остатки, непосредственно взаимодействующие с лигандами, что представляется более удобным для последующего анализа, поскольку дает четкие представления о размерах и границах участков связывания (рис. 3). Для каждой записи CASBench также доступны множественные выравнивания представителей соответствующих семейств белков в формате FASTA, которые могут быть полезны при тестировании алгоритмов, использующих биоинформатический анализ для поиска и/или ранжирования центров связывания лигандов в структурах белков (например, pocketZebra [13]). Вся информация, содержащаяся в записях CASBench, доступна для работы офлайн на локальном компьютере или онлайн с использованием интерактивных инструментов. Доступ к веб-версии CASBench осуществляется через единый список всех доступных записей, а также через функцию поиска по идентификатору структуры белка в базе PDB или ключевым словам, содержащимся в PDB-аннотации. Каждая запись CASBench представлена на отдельной веб-странице, где содержится информация обо всех доступных PDB-структурах соответствующего белка, аннотированных центрах и связанных в них лигандах. Аннотация каталитических и аллостерических сайтов может быть визуализирована на структуре или аминокислотной последовательности белка с использованием встроенных интерактивных инструментов – JSMol [50] и Strap [51] соответственно. Онлайн-интерактивность имплементирована на языке HTML5 и не требует установки плагинов или Java на компьютер пользователя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тенденцией последних лет является возрастающее внимание к аллостерической регуляции функциональных свойств белков/ферментов, поиску соответствующих модуляторов и возможности создания на их основе лекарственных средств, обладающих меньшей токсичностью за счет большей селективности действия. Однако, несмотря на большой интерес к изучению взаимосвязи структуры, функции и регуляции, а также к разработке методов поиска новых регуляторных центров в структурах белков, эти проблемы еще далеки от разрешения. В данной работе на основании анализа баз данных ASD, CSA и PDB составлен эталонный набор CASBench с описанием всех ферментов, в структурах которых на основании экспериментальных данных аннотированы каталитические и аллостерические сайты

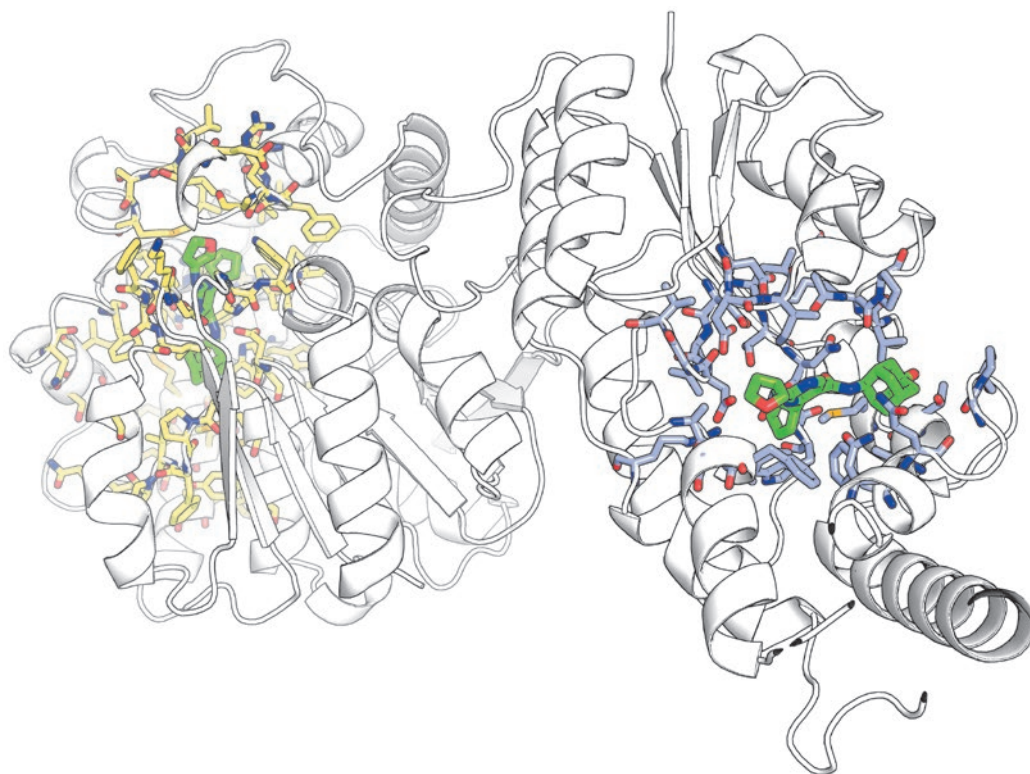


Рис. 3. Пример аннотации сайтов в CASBench. Каталитический (желтый) и аллостерический (синий) сайты аннотированы в структуре эпоксидгидролазы из *Spodoptera frugiperda*, при этом показаны все аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании лигандов в PDB-структурах кристаллографических комплексов. Расположение лигандов в кристаллографических структурах показано зеленым цветом. Иллюстрация подготовлена с использованием PSE-файла структурной аннотации, который включен в дистрибутив CASBench для записи CAS0002, PDB-код 5ALU

связывания. Полученная выборка может использоваться для оценки эффективности существующих методов и разработки/обучения алгоритмов поиска новых сайтов в структурах белков, а также для изучения механизмов аллостерической коммуникации между топологически независимыми центрами на большой выборке конкретных семейств ферментов. Установление взаимосвязи между структурой, функцией и регуляцией должно улучшить наше понимание механизмов действия ферментов и открыть ранее неизвестные пути для создания новых

лекарств и дизайна более эффективных биокатализаторов. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 15-14-00069) с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ им. М.В. Ломоносова [52].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Laskowski R.A., Gerick F., Thornton J.M. // FEBS Lett. 2009. V. 583. № 11. P. 1692–1698.
- Monod J., Wyman J., Changeux J.P. // J. Mol. Biol. 1965. V. 12. № 1. P. 88–118.
- Koshland D.E., Nemethy G., Filmer D. // Biochemistry. 1966. V. 5. № 1. P. 365–385.
- Nussinov R., Tsai C.J. // Cell. 2013. V. 153. № 2. P. 293–305.
- Cui Q., Karplus M. // Protein Sci. 2008. V. 17. № 8. P. 1295–1307.
- Goodey N.M., Benkovic S.J. // Nat. Chem. Biol. 2008. V. 4. № 8. P. 474–482.
- Arkin M.R., Wells J.A. // Nat. Rev. Drug Discov. 2004. V. 3. № 4. P. 301–317.
- Hardy J.A., Wells J.A. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2004. V. 14. № 6. P. 706–715.
- Суплатов Д.А., Швьядас В.К. // Acta Naturae. 2015. T. 7. № 4. C. 39–52.
- Yang J.S., Seo S.W., Jang S., Jung G.Y., Kim S. // PLoS Comput Biol. 2012. V. 8. № 7. P. e1002612.
- Suplatov D., Shalaeva D., Kirilin E., Arzhanik V., Švedas V. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2014. V. 32. № 1. P. 75–87.
- Suplatov D., Kirilin E., Takhaviev V., Švedas V. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2014. V. 32. № 11. P. 1752–1758.
- Suplatov D., Kirilin E., Arbatsky M., Takhaviev V., Švedas V. // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. № W1. P. W344–W349.
- de Oliveira S., Deane C. // F1000 Research. 2017. V. 6. P. 1224.
- Anishchenko I., Ovchinnikov S., Kamisetty H., Baker D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. № 34. P. 9122–9127.
- Reynolds K.A., McLaughlin R.N., Ranganathan R. // Cell. 2011. V. 147. № 7. P. 1564–1575.
- Raman S., Taylor N., Genuth N., Fields S., Church G.M. // Trends Genet. 2014. V. 30. № 12. P. 521–528.
- Suplatov D.A., Sharapova Ya.A., Timonina D.S., Kopylov K.E., Švedas V. // J. Bioinform. Comput. Biol. 2018. V. 16. № 2. P. 1840005.

19. Gunasekaran K., Ma B., Nussinov R. // *Proteins*. 2004. V. 57. № 3. P. 433–443.
20. Chennubhotla C., Yang Z., Bahar I. // *Mol. Biosyst.* 2008. V. 4. № 4. P. 287–292.
21. Hilser V.J., Thompson E.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 20. P. 8311–8315.
22. Popovych N., Sun S., Ebright R.H., Kalodimos C.G. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006. V. 13. № 9. P. 831–838.
23. Wenthur C.J., Gentry P.R., Mathews T.P., Lindsley C.W. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2014. V. 54. P. 165–184.
24. Lu S., Li S., Zhang J. // *Med. Res. Rev.* 2014. V. 34. № 6. P. 1242–1285.
25. Eglén R., Reisine T. // *Pharmacol. Ther.* 2011. V. 130. № 2. P. 144–156.
26. Nussinov R., Tsai C.J., Csérmely P. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2011. V. 32. № 12. P. 686–693.
27. Yu J., Zhou Y., Tanaka I., Yao M. // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. № 1. P. 46–52.
28. Le Guilloux V., Schmidtke P., Tuffery P. // *BMC Bioinformatics*. 2009. V. 10. № 1. P. 168.
29. Yaffe E., Fishelovitch D., Wolfson H.J., Halperin D., Nussinov R. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № suppl 2. P. W210–W215.
30. Weisel M., Proschak E., Schneider G. // *Chem. Cent. J.* 2007. V. 1. № 7. P. 1–17.
31. Hernandez M., Ghersi D., Sanchez R. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № suppl 2. P. W413–W416.
32. Laurie A.T.R., Jackson R.M. // *Bioinformatics*. 2005. V. 21. № 9. P. 1908–1916.
33. Saroj Devi N., Shanmugam R., Ghorai J., Ramanan M., Anbarasan P., Doble M. // *Mol. Inform.* 2017. V. 36. P. 1700073.
34. Kalinina O.V., Gelfand M.S., Russell R.B. // *BMC Bioinformatics*. 2009. V. 10. № 1. P. 174.
35. Huang B., Schroeder M. // *BMC Struct. Biol.* 2006. V. 6. № 1. P. 19.
36. Huang W., Lu S., Huang Z., Liu X., Mou L., Luo Y., Zhao Y., Liu Y., Chen Z., Hou T., Zhang J. // *Bioinformatics*. 2013. V. 29. № 18. P. 2357–2359.
37. Volkamer A., Kuhn D., Grombacher T., Rippmann F., Rarey M. // *J. Chem. Inf. Model.* 2012. V. 52. № 2. P. 360–372.
38. Гущина И.В., Нилов Д.К., Захаренко А.Л., Лаврик О.И., Швядас В.К. // *Acta Naturae*. 2017. T. 9. № 2. С. 62–69.
39. Suplatov D., Popova N., Zhumatiy S., Voevodin V., Švedas V. // *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2016. V. 14. № 2. P. 1641008.
40. Huang Z., Zhu L., Cao Y., Wu G., Liu X., Chen Y., Wang Q., Shi T., Zhao Y., Wang Y., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № suppl 1. P. D663–D669.
41. Huang W., Wang G., Shen Q., Liu X., Lu S., Geng L., Huang Z., Zhang J. // *Bioinformatics*. 2015. V. 31. № 15. P. 2598–2600.
42. Furnham N., Holliday G.L., de Beer T.A., Jacobsen J.O., Pearson W.R., Thornton J.M. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № D1. P. D485–D489.
43. Cock P.J.A., Antao T., Chang J.T., Chapman B.A., Cox C.J., Dalke A., Friedberg I., Hamelryck T., Kauff F., Wilczynski B., De Hoon M.J. // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. № 11. P. 1422–1423.
44. Fu L., Niu B., Zhu Z., Wu S., Li W. // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. № 23. P. 3150–3152.
45. Suplatov D., Kopylov K., Popova N., Voevodin V., Švedas V. // *Bioinformatics*. 2018. V. 34. № 9. P. 1583–1585.
46. Vouzis P.D., Sahinidis N.V. // *Bioinformatics*. 2010. V. 27. № 2. P. 182–188.
47. Fischer J.D., Mayer C.E., Söding J. // *Bioinformatics*. 2008. V. 24. № 5. P. 613–620.
48. Söding J., Biegert A., Lupas A.N. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № S2. P. W244–W248.
49. Katoh K., Standley D.M. // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. № 4. P. 772–780.
50. Hanson R.M., Prilusky J., Renjian Z., Nakane T., Sussman J.L. // *Isr. J. Chem.* 2013. V. 53. № 3–4. P. 207–216.
51. Gille C., Föhling M., Weyand B., Wieland T., Gille A. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № W1. P. W3–W6.
52. Sadovnichy V., Tikhonravov A., Voevodin V.I., Opanasenko V. *Contemp. High Perform. Comput. Petascale Exascale. Boca Raton, USA*, 2013. P. 283–307.

Mauritian Endemic Medicinal Plant Extracts Induce G2/M Phase Cell Cycle Arrest and Growth Inhibition of Oesophageal Squamous Cell Carcinoma *in Vitro*

N. Rummun^{1,2,3}, R. E. Hughes⁴, R. Beesoo^{1,2,4,5}, W. W. Li³, O. Aldulaimi³, K. G. Macleod⁴, T. Bahorun², N. O. Carragher^{4*}, A. Kagansky^{4,6***}, V. S. Neergheen-Bhujun^{1,2*}

¹Department of Health Sciences, Faculty of Science, University of Mauritius, Réduit, 80837, Republic of Mauritius

²ANDI Centre of Excellence for Biomedical and Biomaterials Research, MSIRI Building, University of Mauritius, Réduit, 80837, Republic of Mauritius

³Guy Hilton Research Centre, Institute for Science and Technology in Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, ST5 5BG, Keele University, UK

⁴Cancer Research UK Edinburgh Centre, MRC Institute of Genetics and Molecular Medicine, Western General Hospital, University of Edinburgh, Edinburgh, EH4 2XU, United Kingdom

⁵Department of Biosciences and Ocean Sciences, Faculty of Science, University of Mauritius, Réduit, 80837, Republic of Mauritius

⁶Centre for Genomic and Regenerative Medicine, School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, 690091, Vladivostok, Russia

*E-mail: v.neergheen@uom.ac.mu, **E-mail: N.Carragher@ed.ac.uk, ***E-mail: kagasha@yahoo.com

Received December 10, 2018; in final form, February 25, 2019

ABSTRACT Terrestrial plants have contributed massively to the development of modern oncologic drugs. Despite the wide acceptance of Mauritian endemic flowering plants in traditional medicine, scientific evidence of their chemotherapeutic potential is lacking. This study aimed to evaluate the *in vitro* tumor cytotoxicity of leaf extracts from five Mauritian endemic medicinal plants, namely *Acalypha integrifolia* Willd (Euphorbiaceae), *Labourdonnaisia glauca* Bojer (Sapotaceae), *Dombeya acutangula* Cav. subsp. *rosea* Friedmann (Malvaceae), *Gaertnera psychotrioides* (DC.) Baker (Rubiaceae), and *Eugenia tinifolia* Lam (Myrtaceae). The cytotoxicities of the extracts were determined against six human cancer cell lines, including cervical adenocarcinoma, colorectal carcinoma, oesophageal adenocarcinoma, and oesophageal squamous cell carcinoma. The potent extracts were further investigated using cell cycle analysis and reverse phase protein array (RPPA) analysis. The antioxidant properties and polyphenolic profile of the potent extracts were also evaluated. Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analyses revealed the presence of (+)-catechin and gallic acid in *E. tinifolia* and *L. glauca*, while gallic acid was detected in *A. integrifolia*. *L. glauca*, *A. integrifolia*, and *E. tinifolia* were highly selective towards human oesophageal squamous cell carcinoma (KYSE-30) cells. *L. glauca* and *E. tinifolia* arrested KYSE-30 cells in the G2/M phase, in a concentration-dependent manner. RPPA analysis indicated that the extracts may partly exert their tumor growth-inhibitory activity by upregulating the intracellular level of 5'AMP-activated kinase (AMPK). The findings highlight the potent antiproliferative activity of three Mauritian endemic leaf extracts against oesophageal squamous cell carcinoma and calls for further investigation into their chemotherapeutic application.

KEYWORDS Mauritian endemic, medicinal plant, oesophageal carcinoma, tumor cytotoxicity, AMPK,

ABBREVIATIONS AMPK – 5'AMP-activated kinase; CCE – cyanidin chloride equivalent; DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid; FRAP – ferric reducing antioxidant power; GAE – gallic acid equivalent; GC-MS – gas chromatography coupled to mass spectrometry; HPLC – high-performance liquid chromatography; LW – lyophilized weight; mTORC1 – mammalian target of rapamycin complex 1; OC – oesophageal cancer; QE – quercetin equivalent; RFI – relative fluorescence intensity; RPPA – reverse phase protein array; TFC – total flavonoid content; TMSi – trimethylsilylimidazole; TPC – total phenolic content; TPrC – total proanthocyanidin content.

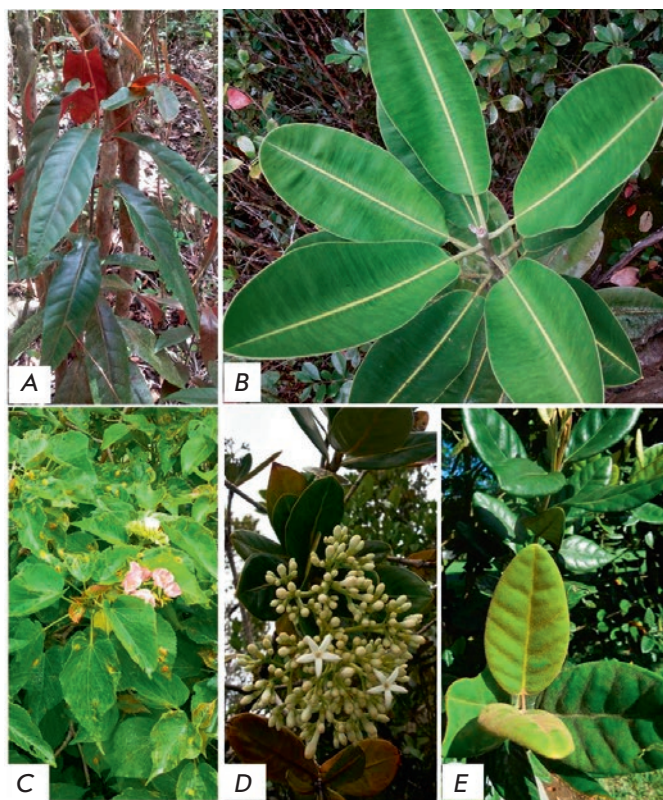


Fig. 1. The Mauritian endemic medicinal plants under study. The Mauritius herbarium voucher specimen barcode number is given in brackets (). A – *A. integrifolia* (MAU 0016402); B – *L. glauca* (MAU 0016430); C – *D. acutangula* (MAU 0016638); D – *G. psychotrioides* (MAU 0009450); – *E. tinifolia* (MAU 0016540)

INTRODUCTION

Oesophageal cancer (OC) is of increasing global concern due to poor prognosis, aggressive disease course, and a lack of efficient selective therapeutics. Oesophageal squamous cell carcinoma and oesophageal adenocarcinoma represent the sixth leading cause of cancer death worldwide and are associated with a 5-year survival of less than 15% and a median overall survival of less than a year [1]. Current treatment options rely primarily on broad-spectrum cytotoxic chemotherapeutics such as cisplatin, fluorouracil, and paclitaxel, which are associated with toxic side effects and limited efficacy, in addition to resistance [2]. Therefore, there is a dire need for searching for novel agents targeted against oesophageal cancer cells.

Plant-sourced bioactive molecules have provided architectural scaffolds for numerous lifesaving clinical agents, including 27% of the approved natural anticancer drugs, since 1980 [3]. Furthermore, over 3,000 global plant taxa have documented ethno-medicinal uses in the treatment of cancer [4].

Mauritius is a biodiversity hotspot located off the southeast coast of the African continent in the Indian Ocean. To date, the ethno-medicinal uses of about 32% of Mauritian endemic plants are documented with limited insight into their anticancer potential [5]. Therefore, this untapped unique resource represents a fertile ground for the bioprospecting of novel oncologic agents.

Thus, the present work evaluated the *in vitro* antioxidant and tumor cytotoxicity of *A. integrifolia*, *D. acutangula*, *E. tinifolia*, *G. psychotrioides*, and *L. glauca* Bojer (Fig. 1), in relation to their polyphenolic content. The effect of the three most potent extracts on cell cycle progression, mode of induced cell death, and their ability to modulate AMPK in oesophageal adenocarcinoma cells was also studied.

METHODS

Plant material and preparation of extracts

Fresh leaves of *L. glauca*, *A. integrifolia*, and *G. psychotrioides* were collected at Gaulette serré, near Camp Thorel (coordinates 20° 12' 09" S, 57° 25' 11" E; 20° 12' 43" S, 57° 38' 29" E and 20° 12' 43" S, 57° 38' 29" E, respectively), while leaves of *E. tinifolia* and *D. acutangula* were collected at lower gorges national park, 'Morne Sec' (coordinates 20° 23' 35" S, 57° 38' 05" E) and Réduit (coordinates 20° 14' 05" S, 57° 29' 45" E), respectively. Dried leaves were exhaustively extracted with aqueous methanol (80 %, v/v) and freeze-dried as described [6].

Estimation of polyphenolic contents

The Folin-Ciocalteu assay, aluminum chloride assay, and HCl/Butan-1-ol assay were used to estimate the phenolic, flavonoid, and proanthocyanidin contents, respectively [6]. The results were expressed as mg of gallic acid equivalent (GAE)/g lyophilized weight (LW), quercetin equivalent (QE)/gLW, and cyanidin chloride equivalent (CCE)/gLW, respectively.

Chromatographic determination of phenolic compounds

The GC-MS analysis of trimethylsilylimidazole derivatized extracts of *L. glauca*, *E. tinifolia* and *A. integrifolia* was carried out using an Agilent 7890A gas chromatography system (Agilent Technologies, USA) as described in [7]. The analysis began with the initial oven temperature set at 150°C, which increased at the rate of 10°C/min to 300°C, and was maintained for another 4–5 min to yield a total run of 20 min under constant helium pressure (10 psi). The chromatogram was analyzed by matching the MS spectra of the peaks with those stored in the NIST 2011 Mass Spectral Library.

In vitro antioxidant capacities of extracts

The *in vitro* antioxidant activities of the extracts were evaluated using ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay; iron chelating assay; superoxide anion radical scavenging assay; and nitric oxide radical inhibition assay, as described in [6]. The modified method proposed by Chu et al. [8] was employed for the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity. Briefly, 100 µl of a methanolic extract (of varying concentration) and 200 µl of 100 µM DPPH dissolved in methanol were incubated for 30 min at room temperature and the absorbance was read at 492 nm.

The negative and positive controls contained extract vehicle and gallic acid (or otherwise stated), respectively, instead of the extract. The percentage of metal chelating and free radical scavenging activity of the extracts were calculated with reference to the negative control according to equation 1. A concentration response curve was generated, and the IC_{50} value was determined using the GraphPad Prism 6 software (GraphPad Inc., USA). All the experiments were performed in triplicates in three independent assays.

Equation 1

$$\% \text{ Chelating / Scavenging / cytotoxic activity} = \frac{(\text{Absorbance negative control} - \text{Absorbance extract})}{(\text{Absorbance negative control})} \times 100$$

Human cell cultures

Human cancer cell lines purchased from American Type Culture Collection included cervical adenocarcinoma (HeLa), colorectal carcinoma (HCT 116), oesophageal adenocarcinoma (OE 33, FLO-1, OE 19 (platinum resistant)), and oesophageal squamous cell carcinoma (KYSE-30), while non-malignant ones included retinal pigment (RPE-1) and fibroblast (FIBR) cell lines. HeLa, HCT 116, FLO-1, RPE-1, and FIBR were grown in DMEM, while OE 33, OE 19, and KYSE-30 were cultured in RPMI-1640, both media supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 2 mM *L*-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin solution with the medium for RPE-1 having an additional supplementation of 20% sodium carbonate. The cells were grown under standard culture conditions.

Cell proliferation analysis using the metabolic assay

The HeLa, HCT 116, FLO-1, OE 33, OE 19, KYSE-30, RPE-1, and FIBR cell lines were plated at 1×10^4 cells per well in a 96-well plate and incubated for 24 h before treatment. The medium was replaced with a fresh medium containing the test extracts (0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25 and 50 µg/ml). The experimental negative and positive controls included 0.1% (v/v, final concentration) dimethyl sulfoxide (DMSO) and etoposide

(0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 and 25 µg/ml), respectively. After 24 h, 10 µl of Alamar blue reagent (10% (v/v)) was added and the plates were incubated at 37°C for 4 h. Fluorescence was measured using an excitation wavelength of 544 nm and an emission wavelength of 590 nm in a Synergy H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, USA). Cell viability of the treated cells was calculated as a percentage of the number of viable cells in the negative control (equation 1) and the IC_{50} value determined. The results were expressed as the mean $IC_{50} \pm SD$ µg/ml ($n=3$). The selectivity index (SI) values for the test extracts were calculated as the ratio of IC_{50} values of RPE-1 cells to cancer cells.

Cell death assay and cell cycle analysis

FLO-1 and KYSE-30 cells were seeded (2.6×10^4 and 1.8×10^4 , respectively) in 384-well Greiner, black, tissue culture plates. The plates were incubated for 24 h under standard culture conditions before test extracts (*L. glauca*, *E. tinifolia* and *A. integrifolia*) were added using a Biomek FX liquid handler (Beckman Coulter Inc., USA), to give 6-point dose responses with final assay concentrations of 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1 µg/ml with four replicates. DMSO and Staurosporine (3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01 µM) were added as controls. The cells were further incubated for 48 h before staining. The media were aspirated from the plate wells and replaced with the staining mixture (Hoechst 33342 (2 µg/ml, Invitrogen) and MitoTracker Deep Red FM (500 nM, Invitrogen)). The plates were incubated in the dark (30 min), before washing three times with PBS. The staining solution was replaced with normal media, and the plates were imaged on an ImageXpress system (Molecular Devices, UK), taking four images per well. The percentage of cells in each cell cycle phase was determined using the cell cycle application module within the MetaXpress software (Molecular Devices, UK)

Reverse phase protein array (RPPA)

Samples were analyzed by Zeptosens RPPA as described previously [9]. Briefly, tumor lysates were normalized to 2 mg/ml with CLB1 lysis buffer and diluted 1:10 in CSBL1 spotting buffer (Zeptosens-Bayer) prior to preparing a final 4-fold concentration series of 0.2, 0.15, 0.1, and 0.75 mg/ml. The diluted concentration series of each sample was printed onto Zeptosens protein microarray chips (ZeptoChip™, Zeptosens-Bayer) under environmentally controlled conditions (constant 50% humidity and 14°C) using a non-contact printer (Nanoplotter 2.1e, Gesim). A single 400 picoliter droplet of each lysate concentration was deposited onto the Zeptosens chip (thus representing four spots per single biological replicate). A reference grid of AlexaFluor647 conjugate BSA consisting of four column X 22 rows was

spotted onto each subarray; each sample concentration series was spotted in between the reference columns. After array printing, the arrays were blocked with an aerosol of a BSA solution using a custom-designed nebulizer device (ZeptoFOG™, Zeptosens-Bayer) for 1 h. The protein array chips were subsequently washed in double-distilled water and dried prior to performing the dual antibody immunoassay comprising 24-hour incubation of primary antibody, followed by 2.5-hour incubation with the secondary Alexa-Fluor conjugated antibody detection reagent (anti-rabbit A647 Fab).

A selected panel of antibodies, pre-validated for RPPA application, was used. Following secondary antibody incubation and final wash step in the BSA solution, the immune stained arrays were imaged using the ZeptoREADER™ instrument (Zeptosens-Bayer, Germany). For each subarray, five separate images were acquired using different exposure times ranging from 0.5-10 s. Microarray images representing the longest exposure without saturation of fluorescent signal detection were automatically selected for analysis using the ZeptoView™ 3.1 software (Zeptosens-Bayer, Germany). An error weighted least squares linear fit through the fourfold concentration series was used to calculate the median relative fluorescence intensity (RFI) value for each sample replicate. Local normalization of the sample signal to the reference BSA grid was used to compensate for any intra- inter-array/chip variation. Local normalized RFI values were used for the subsequent analysis, and the data are presented as a fold change over DMSO control samples.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the GraphPad Prism 6 software. The mean values were compared using One-Way ANOVA. Student's t-test and/or Tukey's multiple comparisons as the Post Hoc test was used to determine the significances of the mean cytotoxic activities of phytochemicals and antioxidants among different extracts and the positive control. All charts were generated using the Microsoft Excel software (version 2010).

RESULTS

Phytochemical analysis

The TPC varied significantly between the investigated leaf extracts ($p < 0.05$), with the highest level measured in *L. glauca* (Fig. 2). The TPC in terms of gallic acid equivalent ranged from 298.9 ± 9.4 to 110.4 ± 13.7 mg GAE/gLW. *G. psychotrioides* had the most abundant TPrC in terms of the cyanidin chloride equivalent, while a negligible amount was measured in the *A. integrifolia* leaf extract. The total flavonoid levels ranged

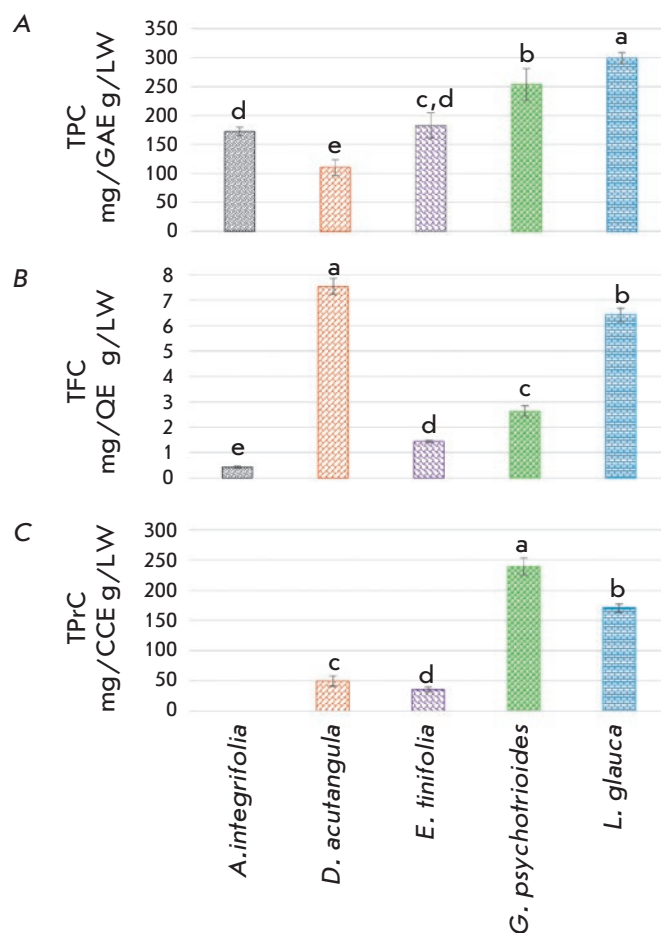


Fig. 2. Total phenolic, flavonoid, and proanthocyanidin contents in the investigated extracts. LW – Lyophilized weight; CCE – cyanidin chloride equivalent; GAE – gallic acid equivalent; QE – quercetin equivalent; TPC – total phenolic content; TFC – total flavonoid content; TPrC – total proanthocyanidin content. The different superscripts between the columns represent a significant difference between the extracts ($p < 0.05$). The data are expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 3$)

between $7.6 \text{ mg} \pm 0.3$ and 0.4 ± 0.1 mg QE/gLW, with *D. acutangula* having the most prominent flavonoid level followed by *L. glauca*. GC-MS analysis revealed the presence of (+)-catechin and gallocatechin in *E. tinifolia* and *L. glauca*, while gallic acid was detected only in *A. integrifolia* (Fig. 3).

Antioxidant activities of extracts in *in vitro* models

The trend in antioxidant potential between the extracts differed in each of the investigated assays (Table 1). The FRAP value of *L. glauca* was significantly higher than that of other endemic plant extracts ($p < 0.05$), and 2.4-fold lower compared to the positive control gallic acid ($24.9 \text{ mmol Fe}^{2+}$). All the extracts under

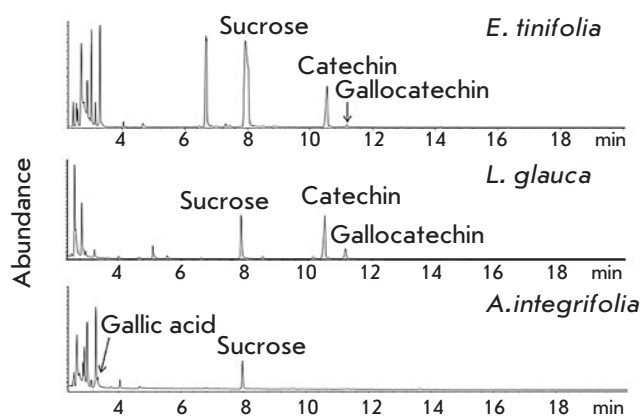


Fig. 3. GC Chromatogram of TMSi derivatives of crude extracts

study showed dose-dependent metal chelating and free radical scavenging activity; the IC_{50} values are shown in Table 1. *L. glauca* had the most potent radical scavenging activity against DPPH and NO radicals. While *G. psychotrioides* had the highest O_2^- radical scavenging activity, the metal ion chelating activities of *A. integrifolia* and *E. tinifolia* were notable compared to those of other investigated extracts.

Cytotoxicity of herbal extracts

The *A. integrifolia* and *E. tinifolia* extracts exhibited dose-dependent growth inhibition of the tested cancer cell lines. Both extracts were strongly cytotoxic towards KYSE-30 cells and were 6.9- and 5.6-fold, respectively, less toxic with respect to the immortalized normal RPE-1 cell line. The chemotherapeutic agent etoposide exhibited greater cytotoxicity toward all the tested cancer cell lines, relative to the extracts. However, it is worth noting that etoposide was more cytotoxic to-

wards RPE-1 (SI = 2.3) and fibroblast (SI = 1.5) cells compared to KYSE-30 cells. The calculated IC_{50} value for each extract against the tested cell lines is shown in Table 2.

Cell cycle analysis

The cell cycle stage of cells determined using the Cell Cycle Application Module within the MetaXpress software (Molecular Devices, UK) revealed that the extracts affected oesophageal squamous cell carcinoma (KYSE-30) selectively, showing no changes in the oesophageal adenocarcinoma (FLO-1) cell line. Both the *E. tinifolia* and *L. glauca* extracts exhibited a concentration-dependent effect on the cell cycle (Fig. 4), causing significant G2/M arrest of KYSE-30 cells, down to 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0.05$). Even though the *A. integrifolia* extract also caused cell cycle arrest at G2/M, the effect was less concentration-dependent. None of the extracts caused any changes in the cell cycle of FLO-1 cells (Fig. 4).

Interestingly, a similar selectivity pattern was observed in the cell death assays. The number of nuclei per image was determined using the MetaXpress software. Extracts of *E. tinifolia* and *L. glauca* induced cell death in KYSE-30 cells in a concentration-dependent manner. However, both extracts had no effect on FLO-1 cells. The calculated IC_{50} for *E. tinifolia* against KYSE-30 was 1.37 $\mu\text{g}/\text{ml}$; IC_{50} for *L. glauca* was 1.77 $\mu\text{g}/\text{ml}$. *E. tinifolia* at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ significantly decreased the KYSE-30 cell number relative to the negative control ($p < 0.05$), while for *L. glauca* a significant reduction in the cell number was observed at 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0.05$) (Fig. 5).

The selective effect on KYSE-30 was based on the effects of the extracts on cell morphology (Fig. 6). The three extracts had a marked effect on the cell number, cell and nuclear morphology, being indicative of cytotoxic and cytokinesis defects. However, there were

Table 1. Antioxidant potential of the investigated medicinal plants leaf extracts

Extracts	Ferric reducing antioxidant power ¹	Iron chelating activity ²	DPPH Scavenging activity ³	Superoxide scavenging activity ³	Nitric oxide scavenging activity ³
<i>A. integrifolia</i>	5.8 ± 0.6 ^{d,****}	655.7 ± 50.4 ^{a,****}	9.4 ± 0.9 ^{c,****}	9.4 ± 2.6 ^{b,****}	528.4 ± 18.0 ^{b,****}
<i>L. glauca</i>	12.1 ± 0.5 ^{a,****}	6783.0 ± 1562.0 ^{c,*}	2.2 ± 0.1 ^{a,**}	7.6 ± 0.3 ^{a,b,*}	10.5 ± 1.0 ^a
<i>G. psychotrioides</i>	9.9 ± 0.7 ^{b,****}	2189.0 ± 483.3 ^{b,****}	2.8 ± 0.3 ^{a,****}	6.4 ± 0.6 ^a	21.7 ± 6.4 ^a
<i>E. tinifolia</i>	8.4 ± 0.5 ^{c,****}	674.1 ± 87.7 ^{a,****}	4.4 ± 0.4 ^{b,****}	8.9 ± 1.1 ^{b,****}	15.6 ± 2.0 ^a
<i>D. acutangula</i>	3.9 ± 0.4 ^{e,****}	1289.0 ± 44.6 ^{a,b,****}	9.9 ± 1.3 ^{c,****}	23.2 ± 1.6 ^{c,****}	43.9 ± 14.0 ^a
Gallic acid	24.9 ± 0.9	8002.0 ± 169.6 (47.0 ± 1.0 mM)	0.7 ± 0.1 (3.9 ± 0.6 μM)	5.5 ± 0.2 (32.1 ± 1.3 μM)	9.9 ± 3.4 (58.4 ± 20.1 μM)

¹Values are expressed in mmol Fe²⁺; ² IC_{50} values are expressed in $\mu\text{g}/\text{ml}$; ³ IC_{50} values are expressed in $\mu\text{g}/\text{ml}$; Data represent a mean ± standard deviation (n = 3). Different letters between rows in each column represent significant differences between the extracts ($p < 0.05$). Asterisks represent significant differences between the extracts and gallic acid (positive control), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

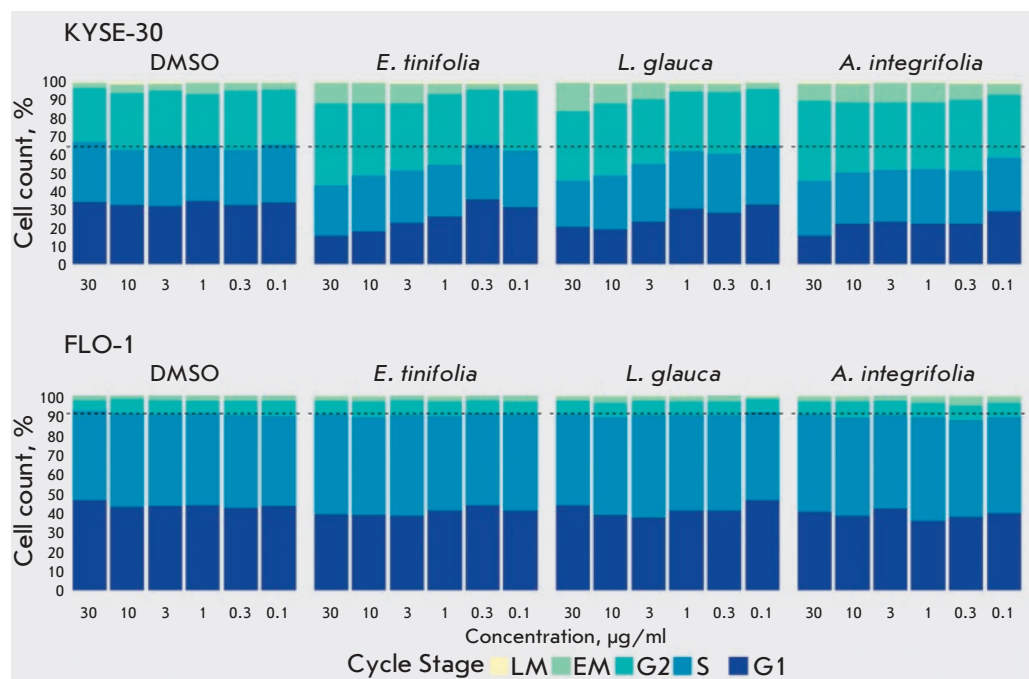


Fig. 4. Cell cycle distribution after extract treatment in the KYSE-30 and FLO-1 cell lines. Cell cycle distribution was analyzed by high-content microscopy (ImageXpress-Micro). *E. tinifolia* and *L. glauca* caused significant G2/M arrest down to 3 µg/ml (Student's *t*-test, $p < 0.05$), and the effect caused by *A. integrifolia* was significant at all concentrations

Table 2: Cytotoxicity (IC_{50} µg/LW/ml) of extracts against Human cell lines

Extracts	Flo-1	OE 33	OE 19	KYSE-30	HeLa	HCT 116	Fibroblast	RPE1
<i>A. integrifolia</i>	10.43 ± 2.10 [SI = 4.2] ^c	28.03 ± 4.21 [SI = 1.6] ^{a****}	39.28 ± 7.52 [SI = 1.1] ^a	6.42 ± 2.21 [SI = 6.9] ^a	7.67 ± 1.58 [SI = 5.7] ^a	14.51 ± 1.23 [SI = 3.0] ^{b,c****}	36.93 ± 6.41 _{b****}	43.99 ± 4.76 _{a,b****}
<i>D. acutangula</i>	45.72 ± 7.93 [SI = 0.8] ^{a****}	ND	ND	ND	14.27 ± 2.97 [SI = 2.6] ^{b****}	14.13 ± 2.62 [SI = 2.7] ^{c****}	45.30 ± 4.33 _{a****}	37.47 ± 4.50 _{b****}
<i>E. tinifolia</i>	48.62 ± 3.24 [SI = 0.8] ^{a****}	45.72 ± 7.93 [SI = 0.9] ^{b****}	44.65 ± 8.87 [SI = 0.9] ^b	6.99 ± 0.38 [SI = 5.6] ^a	35.26 ± 5.01 [SI = 1.1] ^{c****}	19.54 ± 5.16 [SI = 2.0] ^{b****}	27.04 ± 1.84 _{c****}	38.94 ± 4.10 _{b****}
<i>L. glauca</i>	11.19 ± 2.53 [SI = 4.3] ^c	ND	ND	9.22 ± 1.16 [SI = 5.2] ^{b**}	41.53 ± 3.28 [SI = 1.2] ^{d****}	31.58 ± 5.25 [SI = 1.5] ^{a****}	26.74 ± 1.64 _{c****}	48.49 ± 6.12 _{a****}
Etoposide	5.23 ± 0.56 [SI = 3.1]	6.74 ± 0.66 [SI = 2.4]	ND	7.05 ± 0.89 [SI = 2.3]	5.47 ± 0.66 [SI = 3.0]	4.93 ± 0.35 [SI = 3.3]	10.24 ± 2.77	16.17 ± 3.93

Data represent mean IC_{50} values ± standard deviation (n = 3). Selectivity index determined as a ratio of the IC_{50} immortalized RPE-1 normal cell to the IC_{50} of cancer cell lines is indicated. ND = at 50 and 25 µg/ml the extracts and etoposide, respectively, failed to induce 50% growth; hence, no IC_{50} value was determined. Different letters between the rows in each column represent significant differences between the extracts ($p < 0.05$). Asterisks represent significant differences between the extracts and etoposide (positive control), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

no apparent morphological changes in the FLO-1 cells (Fig. 6).

RPPA results

A selected panel of antibodies, pre-validated for RPPA application, was used to compare the individual levels of the corresponding proteins in cancer cells treated with each of the extracts (at different concentrations) with the mock-treated cells. The comparison of the RPPA analysis revealed that, at the 3-h time point, all three extracts upregulated the level of Thr-172 phosphorylation of the alpha subunit of AMPK in a

dose-dependent manner, peaking at 3 µg/ml (Fig. 7), suggesting the AMPK pathway of activation in cancer cells.

DISCUSSION

The role played by the chemical scaffolds provided by terrestrial plants for lifesaving drugs is immense [3]. To date, only about 15% of the global plant species have been appraised for their curative potential [10]. In Mauritius, about 32% of the endemic flora have ethnomedicinal uses, although there has been limited scientific validation of their efficacies [5]. The majority

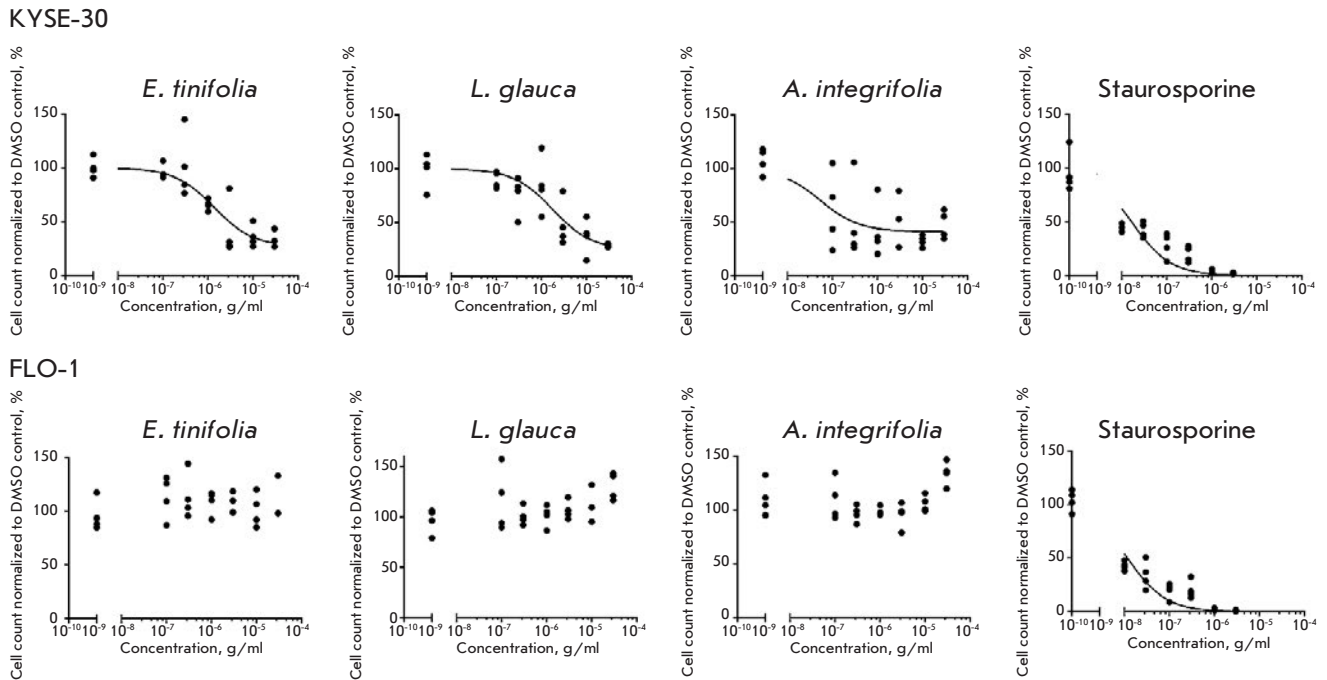


Fig. 5. Concentration response graphs for the extracts and Staurosporine control cytotoxicity on the KYSE-30 and FLO-1 cell lines. The DMSO controls to which the data were normalized were included for reference (data points left of the break on the x-axis)

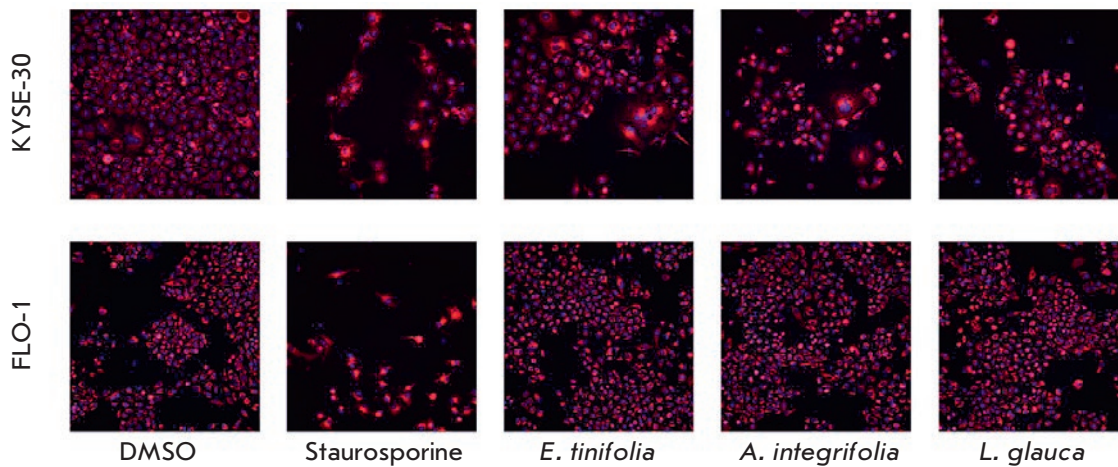


Fig. 6. Fluorescence microscopy images showing cell number and morphological changes in the KYSE-30 and FLO-1 cells. The cells were treated with the extracts (3 $\mu\text{g/ml}$) and Staurosporine (0.3 μM) for 48 h

of the untapped endemic species, both medicinal and non-medicinal, continue to represent a valuable source of novel chemotypes that await discovery. The therapeutic benefits of plants are ascribed to their secondary metabolites, which are broadly grouped into alkaloids, terpenoids, and phenolics, of which the latter represent an interesting class [11].

A high level of phenolics was estimated in *L. glauca*, *G. psychotriodes*, *E. tinifolia*, and *A. integrifolia*. *D. acutangula* had the highest flavonoid level, al-

though a low total phenolic content was measured, closely followed by *L. glauca*. The polyphenolic richness of Mauritian plant extracts has been extensively reported on and may be attributed to the high sunlight conditions of the island [12]. Furthermore, a number of reports have delineated the phenolic composition of selected Mauritian endemic plant leaf extracts [13–17]. Consistent with the current findings, previous reports by Neergheen and co-workers demonstrated the relatively higher abundance of total proanthocyanidin

compared to total flavonoid components in a *G. psychotriodes* leaf extract [15, 18]. Moreover, the occurrence of flavan-3-ols, namely, (+)-catechin and (-)-epigallocatechin, detected in the *E. tinifolia* leaf extract (Fig. 3) is concordant with findings in the literature [18]. Polyphenolic compounds, inclusive of flavan-3-ols derivatives, are extensively documented with regard to their antioxidant capacities [11, 19].

The pivotal role of plant polyphenols in modulating intracellular redox homeostasis and mitigating oxidative stress-induced pathologies is well established [19]. Mechanistically, antioxidants may neutralize free radicals either by single electron or hydrogen atom transfer [20]. The antioxidant capacity of phenolic compounds emanates from the presence and degree of an electron-donating hydroxyl group on the aromatic ring [21]. Polyphenols, for instance flavonoids, are multifunctional in their antioxidative ability and prevent oxidative damage in multiple ways, including free radical scavenging through direct donation of hydrogen atoms, inactivating enzymes due to hydrogen bonding of hydroxyl groups to proteins and chelating of the metal iron involved in free radical generation, among others [22]. Given the diverse mode of action of phenolic antioxidants, the present study employed a battery of five independent *in vitro* models to determine the antioxidant potential of the extracts. *L. glauca* exhibited the most effective antioxidant capacity in terms of ferric-reducing potential and scavenging of DPPH and nitric oxide free radicals. The antioxidant capacity of the endemic leaf extracts correlated significantly with the total phenolic content $r = -0.887$ ($p < 0.05$) for DPPH free radical scavenging activity and $r = 0.970$ ($p < 0.01$) for FRAP. The strong correlation between TPC and FRAP may be partly attributed to the fact that both assays share a similar redox mechanism [23]. Similar linear correlation between the TPC and FRAP values of Mauritian endemic leaf extracts was previously reported [17]. The positive association between the phenolics and antioxidant activity is not restricted only to Mauritian endemic plants, as comparable relationships have also been reported for Mauritian citrus fruits [24] and Mauritian tea infusate extracts [14].

Given the involvement of oxidative stress in the multistage carcinogenic process [25], polyphenol-rich extracts are expected to prevent or halt the progression of cancerous cell growth. Polyphenolics are reported to attenuate *in vitro* cancerous cell growth via diverse mechanisms [26]. The *in vitro* antiproliferative potential of selected Mauritian endemic *Eugenia* and *Syzygium* species against breast cancer cells (MDA-MB and MCF-7) has been described earlier [27]. However, this study reports for the first time on the growth inhibitory activity of Mauritian endemic leaf extracts

against cervical adenocarcinoma, colorectal carcinoma, and oesophageal squamous cell carcinoma. The leaf extracts of *A. integrifolia*, *L. glauca*, and *E. tinifolia* exhibited dose-dependent growth inhibition against the selected cancer cell lines (Table 2). However, oesophageal squamous cell carcinoma KYSE-30 cells were the most sensitive to the extracts' treatment. As per the United States National Cancer Institute cytotoxicity guidelines, crude extracts having an IC_{50} value below $20 \mu\text{g/ml}$ are considered active against tested cell lines [28]. In the present study, the calculated IC_{50} values ranged between 6.42 and $9.89 \mu\text{g/ml}$ when KYSE-30 cells were co-cultured with *A. integrifolia*, *L. glauca*, and *E. tinifolia* extracts for 24 h. Furthermore, the selective cytotoxicity of the extracts toward KYSE-30 cells was fivefold or greater compared to immortalized non-malignant normal cells.

Guided by the AlamarBlue™ assay results, the effects of the three extracts on cell death and cell cycle stages of KYSE-30 and FLO-1 cells were further investigated across a concentration dilution series using fluorescence staining and high-content image analysis. The findings indicated that extract treatment for 48 h induces considerable dose-dependent cell death in KYSE-30 cells but not in FLO-1 cells (Figs. 5, 6). A similar trend was also observed in cell cycle analysis, as extracts treatment induced accumulation of KYSE-30 cells in the G2/M phase, but no effect on the FLO-1 cell cycle was apparent (Fig. 4). The blockade of KYSE-30 cells through G2/M was concentration-dependent for both *E. tinifolia* and *L. glauca*, while in the case of *A. integrifolia* the effect was less influenced by the extract dose.

In cancerous cells, signaling components of different cellular pathways are often mutated [29]. In this vein, activation of AMPK and subsequent inhibition of the mTOR pathway is an area of active research [30]. It was previously suggested that activators of AMPK, which include plant polyphenols, can interfere with tumor growth via cell cycle arrest [31] and apoptosis [32, 33] in cancerous cells. The RPPA analysis of the canonical signaling pathways that regulate the cell cycle progression and survival pathways, which in turn regulate cell cycle progression and survival, revealed that all three extracts increase the level of Thr-172 phosphorylation of the alpha subunit of AMPK in KYSE-30 cells (Fig. 7), suggesting its activation. This study showed for the first time that the antiproliferative effect of Mauritian endemic medicinal plant leaf extracts is related to their influence on the AMPK pathway modulation.

CONCLUSIONS

In conclusion, the specific selectivity of *A. integrifolia*, *E. tinifolia*, and *L. glauca* to KYSE-30 oesophageal

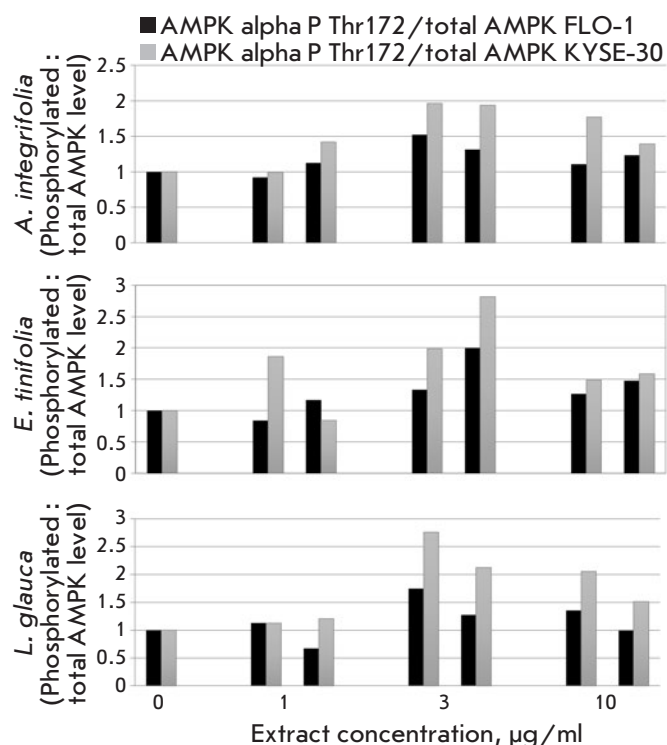


Fig. 7. Graphs showing the changes in the activated phosphorylated AMPK level in the FLO-1 and KYSE-30 cell lines. The cells were treated for 3 h at different concentrations. The results represent the ratio of phosphorylated to total AMPK levels and are expressed as a fold change over DMSO control for each cell type

squamous cell carcinoma relative to oesophageal adenocarcinoma (FLO-1) calls for further investigation into the anticancer effect of these medicinal plants. This is further substantiated by the G2/M phase cell cycle arrest, leading to cell death. AMPK pathway modulation following the exposure of KYSE-30 cells to the extracts provides novel insight into the

mechanism of action of these leaf extracts as a potential chemotherapeutic treatment. This is particularly important since esophageal cancer is among the leading causes of cancer mortality worldwide as treatment is limited due to adverse systemic effects, limited efficacy, and emergence of drug resistance. Clinical studies with molecularly targeted therapies have so far been disappointing, with little improvement in patient outcomes. Hence, there is an urgent need to search for new effective treatments for oesophageal cancer. Although preliminary characterization indicated the presence of (+)-catechin and gallic acid, in-depth phytochemical identification is warranted in order to identify the AMPK modulator.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Global Young Academy (GYA), GYA Bio2bio working group, and GYA North-South grant (to V.N.B and A.K.), that allowed us to initiate this work. We thank the director and staff of Alteo Group, Médiine Sugar Estate and Mauritius National Park Conservation Services for permission to collect endemic plant samples and the Mauritius Herbarium for plant identification. This study was supported by the Royal Society and Royal Society of Chemistry international exchange award, the Anne Forrest Fund for oesophageal cancer research, MRC Institute of Genetics and Molecular Medicine studentship, Mauritius Research Council under the National Research and Innovation Chair Program studentship, the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (project no. 6.7997.2017/8.9), and Chancellor’s Fellowship from the University of Edinburgh to Alexander Kagansky.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the lack of any conflict of interest. ●

REFERENCES

- Pennathur A., Gibson M.K., Jobe B.A., Luketich J.D. // *Lancet*. 2013. V. 381. № 9864. P. 400–412.
- Napier K.J. // *World J. Gastrointest. Oncol.* 2014. V. 6. № 5. P. 112.
- Willis K.J. *State of the World’s Plants* 2017.
- Graham J.G., Quinn M.L., Fabricant D.S., Farnsworth N.R. // *J. Ethnopharmacol.* 2000. V. 73. № 3. P. 347–377.
- Rummun N., Neergheen-Bhujun V.S., Pynee K.B., Baider C., Bahorun T. // *J. Ethnopharmacol.* 2018. V. 213. № April 2017. P. 111–117.
- Rummun N., Somanah J., Ramsaha S., Bahorun T., Neergheen-Bhujun V.S. // *Int. J. Food Sci.* 2013. V. 2013. P. 1–12.
- Johnson-Ajinwo O.R., Richardson A., Li W.-W. // *Phytomedicine*. 2015. V. 22. № 1. P. 1–4.
- Chu W.L., Lim Y.W., Radhakrishnan A.K., Lim P.E. // *BMC Complement. Altern. Med.* 2010. V. 10. № 53.
- Macleod K.G., Serrels B., Carragher N.O. *Proteomics for Drug Discovery*. New York: Springer, 2017. P. 153–169.
- Mathur S., Hoskins C. // *Biomed. Reports*. 2017. V. 6. № 6. P. 612–614.
- Grzesik M., Naparło K., Bartosz G., Sadowska-Bartosz I. // *Food Chem.* 2018. V. 241. № June 2017. P. 480–492.
- Bahorun T., Luximon-Ramma A., Crozier A., Aruoma O.I. // *J. Sci. Food Agric.* 2004. V. 84. № 12. P. 1553–1561.
- Mersch-Sundermann V., Bahorun T., Stahl T., Neergheen V.S., Soobrattee M.A., Wohlfarth R., Sobel R., Brunn H.E., Schmeiser T., Lamy E., et al. // *Toxicol. Vitro*. 2006. V. 20. № 8. P. 1427–1434.
- Luximon-Ramma A., Neergheen V.S., Bahorun T., Crozier A., Zbarsky V., Datla K.P., Dexter D.T., Aruoma O.I. // *Biofactors*. 2006. V. 27. № 1–4. P. 79–91.
- Neergheen V.S., Bahorun T., Jen L.-S., Aruoma O.I. // *Pharm. Biol.* 2007. V. 45. № 1. P. 9–17.
- Soobrattee M.A., Bahorun T., Thaunoo P. // *Food Agric. Res. Counc. Réduit, Mauritius*. 2005. P. 13–21.
- Soobrattee M.A., Bahorun T., Neergheen V.S., Googoolye K., Aruoma O.I. // *Toxicol. Vitro*. 2008. V. 22. № 1. P. 45–56.

18. Neergheen V.S., Soobrattee M.A., Bahorun T., Aruoma O.I. // *J. Plant Physiol.* 2006. V. 163. № 8. P. 787–799.
19. Soobrattee M.A., Neergheen V.S., Luximon-Ramma A., Aruoma O.I., Bahorun T. // *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 2005. V. 579. № 1–2. P. 200–213.
20. San Miguel-Chávez R. In: *Phenolic Compounds – Biological Activity.* // *InTechopen.* 2017. P. 59–74
21. Cuvelier M.-E., Richard H., Berset C. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1992. V. 56. № 2. P. 324–325.
22. Procházková D., Boušová I., Wilhelmová N. // *Fitoterapia.* 2011. V. 82. № 4. P. 513–523.
23. Huang D., Ou B., Prior R.L. // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53. № 6. P. 1841–1856.
24. Ramful D., Tarnus E., Rondeau P., Da Silva C.R., Bahorun T., Bourdon E. // *J. Agric. Food Chem.* 2010. V. 58. № 20. P. 11119–11129.
25. Toyokuni S., Okamoto K., Yodoi J., Hiai H. // *FEBS Lett.* 1995. V. 358. № 1. P. 1–3.
26. Soobrattee M.A., Bahorun T., Aruoma O.I. // *Biofactors.* 2006. V. 27. № 1–4. P. 19–35.
27. Neergheen V., Bahorun T., Aruoma O.I. // *Univ. Mauritius Res. J.* 2011. V. 17. P. 240–255.
28. Ramos-Silva A., Tavares-Carreón F., Figueroa M., De la Torre-Zavala S., Gastelum-Arellanez A., Rodríguez-García A., Galán-Wong L.J., Avilés-Arnaut H. // *BMC Complement. Altern. Med.* 2017. V. 17. № 1. P. 241.
29. Sever R., Brugge J.S. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2015. V. 5. № 4. P. a006098–a006098.
30. Li W., Saud S.M., Young M.R., Chen G., Hua B. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 10. P. 7365–7378.
31. Cai X., Hu X., Tan X., Cheng W., Wang Q., Chen X., Guan Y., Chen C., Jing X. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 7. P. e0133349.
32. Wu P., Liu S., Su J., Chen J., Li L., Zhang R., Chen T. // *Food Funct.* 2017. V. 8. № 10. P. 3707–3722.
33. Xiao J., Niu G., Yin S., Xie S., Li Y., Nie D., Ma L., Wang X., Wu Y. // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 2014. V. 46. № 5. P. 394–400.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий. Журнал выпускается на русском и английском языках. Журнал *Acta Naturae* входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России, включен в базы данных PubMed, Web of Science, Scopus, РИНЦ.

Редакция журнала *Acta Naturae* просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редакцией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков с пробелами (примерно 30 страниц формата А4, напечатанных через 1.5 интервала, шрифт Times New Roman, 12 размер) и 16 рисунков.

Объем экспериментальной статьи не должен превышать 30 000 знаков с пробелами (примерно 15 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10.

Новые приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в разделе «Краткие сообщения». Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (5–6 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать трех.

Рукопись и сопроводительные документы следует присылать в редакцию в электронном виде:

- 1) текст в формате Word 2003 for Windows;
- 2) рисунки в формате TIFF;
- 3) текст статьи с рисунками в едином pdf-файле;
- 4) перевод на английский язык названия статьи, фамилий и инициалов авторов, названий организаций, реферата, ключевых слов, сокращений, подписей к рисункам, русскоязычных ссылок;
- 5) сопроводительное письмо, в котором надо указать, что представленный материал ранее нигде не был опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях;
- 6) лицензионный договор (форму договора можно скачать с сайта www.actanaturae.ru).

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт – курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт – полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).

- Указывается электронный адрес автора, ответственного за переписку с редакцией, включая работу с корректурой. Автор, ответственный за переписку, выделяется значком *.
- Приводится полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.
- Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы, описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк (примерно 1500 знаков).
- Ключевые слова (3–6). В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.
- Список сокращений.
- Введение.
- Раздел «Экспериментальная часть».
- Раздел «Результаты».
- Раздел «Обсуждение» (или «Результаты и обсуждение»).
- Раздел «Выводы» (или «Заключение»). В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.
- Раздел «Список литературы».

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.
- Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Интервал между строками 1.5.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах: $T_{\text{пл}}$ – температура плавления, $T_{\text{ф.п}}$ – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.

- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μM ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только « \times ». Знак « \times » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « \cdot » обозначаются комплексы соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой ре-

дакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегией определяется дальнейшая судьба рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с ответами на все замечания рецензента.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде pdf-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте в порядке их цитирования, нумеруются и приводятся в квадратных скобках. Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Для книг: фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

Для периодических изданий: фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Указываются фамилии первых 10 авторов, например:

Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337.

Ссылки на *авторефераты* диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. М.: ФГУ ВНИИФК, 2009.

Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

Для связи с редакцией следует использовать следующий электронный адрес: actanaturae@gmail.com, телефон: (495) 727-38-60.

Acta Naturae

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

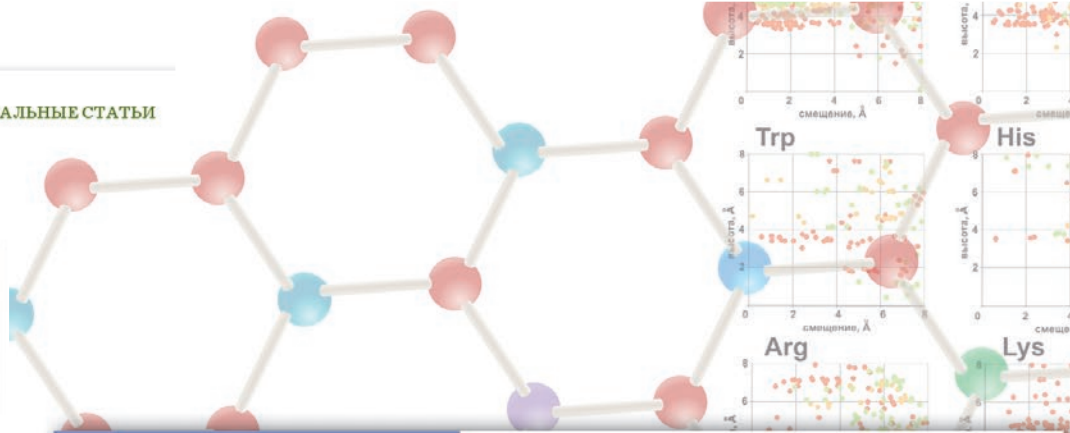
Флуоресценция клеток после окрашивания различными белками. Приведены средние значения трех экспериментов \pm ошибка среднего

Образец	Интенсивность флуоресценции в канале FL1	
	Клетки SK-BR-3	Клетки CHO
Неокрашенные клетки	3700 \pm 400	3700 \pm 900
+ β -LG-FITC	5700 \pm 600	3300 \pm 400
+ 4D5scFv-FITC	2.7 $\times 10^4 \pm 7 \times 10^3$	3200 \pm 500
+ 4D5scFv-miniSOG	2.3 $\times 10^4 \pm 3 \times 10^3$	4600 \pm 400
+ DARPin-miniSOG	1.71 $\times 10^4 \pm 1.6 \times 10^3$	3000 \pm 400

Наличие на поверхности клеток рецептора HER2/neu было подтверждено их окрашиванием 4D5scFv, конъюгированным с флуоресцеинизотиоцианатом (4D5scFv-FITC). В качестве отрицательного контроля использовали бета-лактоглобулин, конъюгированный с FITC (β -LG-FITC), не связывающийся с HER2 на поверхности клеток. Показано, что HER2-отрицательные клетки CHO не дают флуоресцентного сигнала после инкубации с белками 4D5scFv-FITC, β -LG-FITC и целевыми белками 4D5scFv-miniSOG, DARPin-miniSOG (таблица).

Таким образом, показано, что адресные рекомбинантные белки 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG высокоспецифично связываются с поверхностным рецептором HER2/neu на поверхности клеток SK-BR-3 аденокарциномы молочной железы человека.

Обнаружено, что после связывания белков DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG с рецептором на поверхности клеток SK-BR-3 при температуре +4°C рецептор-опосредованной интернализации белков не происходит. Однако при +37°C комплексе рецептор-белок подвергается интернализации, о чем свидетельствует снижение интенсивности флуоресценции Δ МFI (разность между средними значениями флуоресценции окрашенных и неокрашенных клеток) (рис. 1). При этом рекомбинантный белок DARPin-miniSOG интернализуется в комплексе с рецептором быстрее, чем 4D5scFv-miniSOG, так как Δ МFI для DARPin-miniSOG снижается вдвое по сравнению с начальной точкой в течение первых 10 мин, в то время как для 4D5scFv-miniSOG это занимает 40 мин. Полученные данные согласуются с опубликованными: 4D5scFv-miniSOG проявляет более высокую цитотоксичность по сравнению с DARPin-miniSOG [5, 6], так как дольше локализован на мембране. Поскольку преимущественным механизмом гибели клеток, облученных в присутствии данных фотоксисов, является некроз, по-

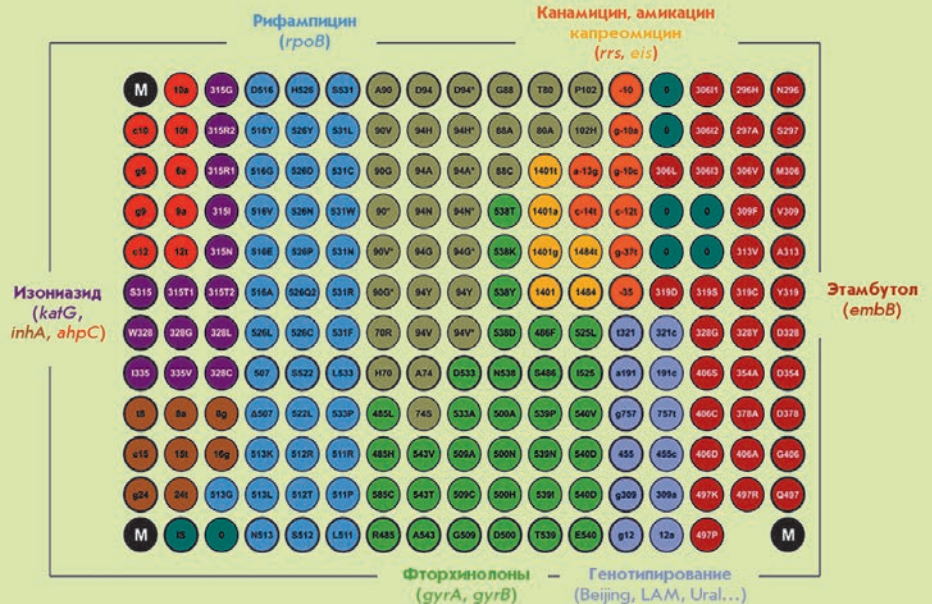


ОКТАБРЬ-ДЕКАБРЬ 2018 ТОМ 10 № 4 (39)

ISSN 2075-8243

Acta Naturae

Технология гидрогелевых биочипов ИМБ РАН: 30 лет спустя



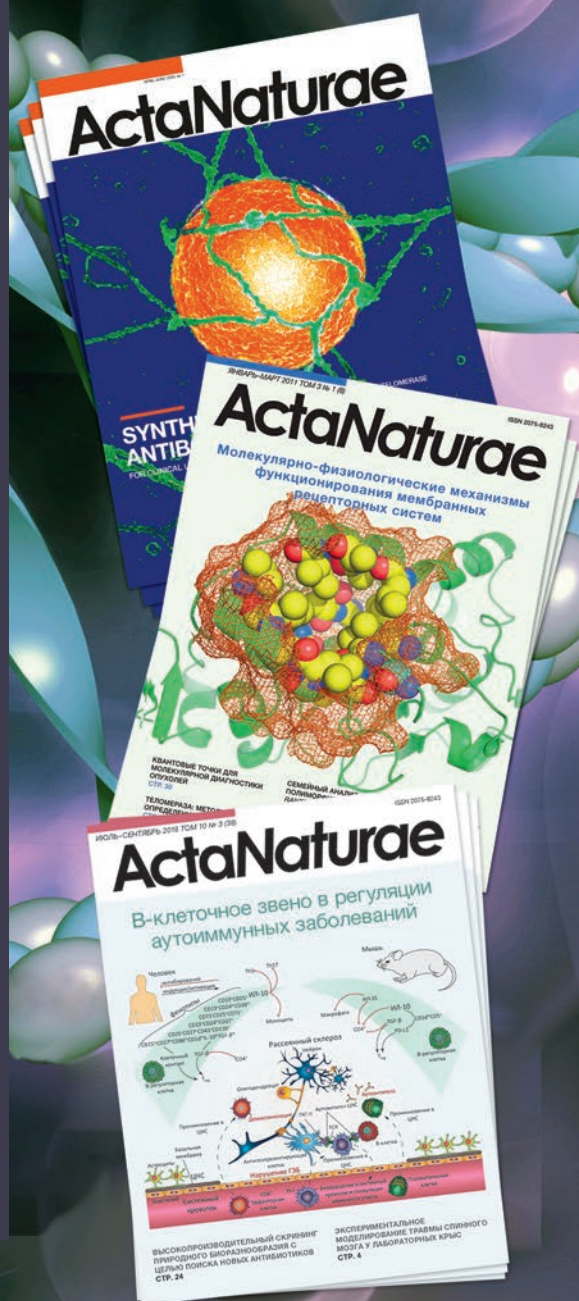
БЕЛОК CG9890 С ДОМЕНАМИ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ – НОВЫЙ КОМПОНЕНТ ENU2-СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСОВ ДРОЗОФИЛЫ
СТР. 110

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С БЕЛКОМ AIF
СТР. 100

Acta Naturae

Журнал *Acta Naturae* уделяет особое внимание междисциплинарному характеру исследований и разработок, которые находятся на стыке различных сфер биологических специальностей – молекулярной биологии, биохимии, молекулярной генетики и биологической медицины.

Журнал *Acta Naturae* выпускается на русском и английском языках, входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России, включен в базы данных РИНЦ, PubMed, Web of Science, Scopus.



ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ:

Если Вы хотите опубликовать свою работу в журнале *Acta Naturae*, пишите на actanaturae@gmail.com и звоните по телефону: 8 (495) 727-38-60

