

Том 89, Номер 12

ISSN 0320-9725

Декабрь 2024



БИОХИМИЯ



НАУКА
— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 89, № 12, 2024

Тропонины и патологии скелетной мускулатуры (обзор) <i>А.П. Богомолова, И.А. Катруха</i>	2019
Влияние РНК-связывающего белка Sam68 на активность поли(ADP-рибоза)-полимеразы 1 <i>К.Н. Науменко, Е.А. Бережнев, Т.А. Кургина, М.В. Суханова, О.И. Лаврик</i>	2045
Постселекционное конструирование аптамеров: сравнительное исследование аффинности ДНК-аптамеров к рекомбинантному внеклеточному домену рецептора эпидермального фактора роста человека <i>В.Л. Моисеенко, О.М. Антипова, А.А. Рыбина, Л.И. Мухаметова, С.А. Ерёмин, Г.В. Павлова, А.М. Копылов</i>	2058
Характеристика углеводной специфичности моноклональных антител к грибковым антигенным маркерам с использованием биотинилированных олигосахаридов в качестве покрывающих антигенов <i>М.Л. Генинг, А.В. Полянская, А.Н. Кузнецов, А.Д. Титова, В.И. Юдин, Д.В. Яшунский, Ю.Е. Цветков, О.Н. Юдина, В.Б. Крылов, Н.Э. Нифантьев</i>	2070
Новые рамнозосодержащие гликополимеры клеточной стенки <i>Rathayibacter festucae</i> ВКМ Ас-1390 ^Т <i>А.С. Шашков, Н.В. Потехина, Е.М. Тульская, А.С. Дмитренко, С.Н. Сенченкова, Л.В. Дорофеева, Л.И. Евтушенко</i>	2081
Комбинация ингибиторов IX изоформы карбоангидразы и гефитиниба угнетает инвазивный потенциал клеток немелкоклеточного рака легкого <i>А.С. Бунев, А.А. Шетнев, О.С. Шемчук, П.К. Кожухов, Т.В. Шаронова, И.И. Тюрева, М.Г. Хотин, С.В. Агеев, Д.К. Холмуродова, Ж.А. Ризаев, К.Н. Семенов, В.В. Шаройко</i>	2092
Влияние добавки С- и N-концевого полигистидинового тега на агрегацию белка NEP вируса гриппа А <i>О.Н. Королева, Н.В. Кузьмина, А.П. Толстова, Е.В. Дубровин, В.Л. Друца</i>	2105
Роль неканонических стэкинг-взаимодействий гетероциклических оснований РНК в функционировании рибосомы <i>В.Г. Метелев, Е.Ф. Баулин, А.А. Богданов</i>	2120
Влияние производных 8-оксо-1, N ⁶ -этеноаденина на работу РНК-полимераз вируса SARS-CoV-2 и бактерии <i>Escherichia coli</i> <i>И.В. Петушков, А.В. Аралов, И.А. Иванов, М.С. Баранов, Т.С. Зацепин, А.В. Кульбачинский</i>	2132

CONTENTS

Vol. 89, Issue 12, 2024

Troponins and Skeletal Muscle Pathologies (Review)

A. P. Bogomolova and I. A. Katrukha 2019

RNA-Binding Protein Sam68 Effects Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Activity

K. N. Naumenko, E. A. Berezhnev, T. A. Kurgina, M. V. Sukhanova, and O. I. Lavrik 2045

Post-Selection Design of Aptamers: Comparative Study of the DNA Aptamers Affinity to the Recombinant Extracellular Domain of Human Epidermal Growth Factor Receptors

V. L. Moiseenko, O. M. Antipova, A. A. Rybina, L. I. Mukhametova, S. A. Eremin, G. V. Pavlova, and A. M. Kopylov 2058

Characterization of Carbohydrate Specificity of Monoclonal Antibodies to Fungal Antigenic Markers Using Biotinylated Oligosaccharides as Coating Antigens

M. L. Gening, A. V. Polyanskaya, A. N. Kuznetsov, A. D. Titova, V. I. Yudin, D. V. Yashunskiy, Y. E. Tsvetkov, O. N. Yudina, V. B. Krylov, and N. E. Nifantiev 2070

Novel Rhamnose-Containing Glycopolymers from the Cell Wall of *Rathayibacter festucae* VKM Ac-1390^T

A. S. Shashkov, N. V. Potekhina, E. M. Tul'skaya, A. S. Dmitrenok, S. N. Senchenkova, L. V. Dorofeeva, and L. I. Evtushenko 2081

Combination of Carbonic Anhydrase Isoform IX Inhibitors and Gefitinib Suppresses on the Invasive Potential of Non-Small Cell Lung Cancer Cells

A. S. Bunev, A. A. Shetnev, O. S. Shemchuk, P. K. Kozhukhov, T. V. Sharonova, I. I. Tyuryaeva, M. G. Khotin, S. V. Ageev, D. K. Kholmurodova, J. A. Rizaev, K. N. Semenov, and V. V. Sharoyko 2092

The Effect of C- and N-Terminal Polyhistidin Tag on Aggregation of Influenza A Virus Nuclear Export Protein

O. N. Koroleva, N. V. Kuzmina, A. P. Tolstova, E. V. Dubrovin, and V. L. Drutsa 2105

The Role of Noncanonical Stacking Interactions of Heterocyclic RNA Bases in Ribosome Functioning

V. G. Metelev, E. F. Baulin, and A. A. Bogdanov 2120

Effect of 8-oxo-1,*N*⁶-Ethenoadenine Derivatives on the Activity of RNA Polymerases of the SARS-CoV-2 Virus and *Escherichia coli*

I. V. Petushkov, A. V. Aralov, I. A. Ivanov, M. S. Baranov, T. S. Zatsepin, and A. V. Kulbachinskiy 2132

ТРОПОНИНЫ И ПАТОЛОГИИ СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЫ

Обзор

© 2024 А.П. Богомоллова^{1,2*}, И.А. Катруха^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119234 Москва, Россия

² HyTest Ltd., Турку, Финляндия; электронная почта: bogomolova.agnessa@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.05.2024

После доработки 19.11.2024

Принята к публикации 01.12.2024

Скелетная мускулатура составляет ~30–40% от общей массы тела человека и выполняет важнейшие функции, обеспечивая движение, дыхание, производство тепла, а также метаболизм глюкозы и белков. Повреждения скелетной мускулатуры оказывают негативное влияние на функционирование всего организма, приводят к ухудшению качества жизни и, в тяжёлых случаях, к летальному исходу. Ввиду этого своевременная диагностика и терапия нарушений функционирования скелетной мускулатуры является актуальной задачей современной медицины. Данный обзор посвящён скелетным изоформам тропонинов – белков, входящих в состав тонких филаментов мышечных волокон и участвующих в регуляции мышечного сокращения. Описаны биохимические свойства скелетных изоформ тропонинов, а также опыт их использования в качестве белков-маркеров повреждения скелетных мышц. В связи с тем, что удобным и чувствительным методом детекции белков-маркеров является иммунохимическое определение в биологических жидкостях, проанализированы факторы, способные оказывать влияние на иммунохимическую детекцию скелетных изоформ тропонинов, которые необходимо учитывать при разработке диагностических тест-систем. Помимо этого, показано, что некоторые мутации в этих белках могут приводить к развитию заболеваний: данные по известным на сегодняшний день мутациям представлены в обзоре. И, наконец, скелетные изоформы тропонинов рассмотрены как мишени для лекарственных средств, разрабатываемых для терапии заболеваний скелетных мышц.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: скелетная мускулатура, тропонин, старение, миопатия, биомаркер, моноклональные антитела.

DOI: 10.31857/S0320972524120018 EDN: IGIUDM

ВВЕДЕНИЕ

У млекопитающих поперечно-полосатая мускулатура представлена двумя типами ткани – скелетной и сердечной. Скелетные мышцы составляют около 30–40% от общей массы тела и выполняют важнейшие функции, обеспечивая в т.ч. движение, дыхание и производство тепла [1, 2]. На них приходится основная доля метаболизма глюкозы, липидов и белков. Повреждения и патологии скелетной мускулатуры могут

оказывать значительное влияние на различные аспекты функционирования всего организма, приводить к ухудшению качества жизни и, в тяжёлых случаях, к летальному исходу.

Нарушения функционирования скелетных мышц могут быть вызваны механическими повреждениями, рабдомиолизом, миопатиями и другими заболеваниями, сопровождающимися мышечной атрофией. Наиболее частыми причинами механического повреждения скелетных мышц являются различные травмы,

Принятые сокращения: а.о. – аминокислотный остаток; бсТнИ – быстрый скелетный ТнИ; бсТнС – быстрый скелетный ТнС; бсТнТ – быстрый скелетный ТнТ; мсТнИ – медленный скелетный ТнИ; мс/сТнС – медленный скелетный/сердечный ТнС; мсТнТ – медленный скелетный ТнТ; сТнИ – сердечный ТнИ; сТнТ – сердечный ТнТ; ТнИ – тропонин И; ТнС – тропонин С; ТнТ – тропонин Т.

* Адресат для корреспонденции.

в т.ч. синдром длительного сдавления, хирургическое вмешательство, повышенная физическая нагрузка [3]. Термин «миопатия» описывает любые заболевания скелетной мускулатуры различной этиологии. Данные патологии зачастую сопровождаются повреждениями структуры скелетной мышцы и развитием метаболических нарушений в ткани [4]. Миопатии разделяют на врождённые (наследуемые) и приобретённые (вторичные). Наследуемые миопатии включают в себя мышечные дистрофии (связаны с мутациями в генах белков сократительного аппарата, например, мышечная дистрофия Дюшенна и мышечная дистрофия Беккера); конгенитальные миопатии (например, немалиновая и коровая миопатии); метаболические миопатии (связаны с мутациями в генах различных ферментов, участвующих в метаболизме углеводов и липидов); митохондриальные миопатии (связаны с мутациями белков окислительного фосфорилирования митохондрий) и каналопатии [5–8]. Мышечные дистрофии – одни из наиболее распространённых и тяжёлых видов наследуемых миопатий, для некоторых из которых, например, мышечной дистрофии Дюшенна, характерна прогрессирующая мышечная слабость и атрофия, приводящая в итоге к смерти от сердечно-лёгочной недостаточности [9]. Среди приобретённых миопатий выделяют воспалительные миопатии (чаще всего аутоиммунной природы, такие как дерматомиозит и полимиозит); миопатии, ассоциированные с различными инфекциями (вызываемые бактериями, грибами или вирусами); токсические миопатии (вызванные в т.ч. отравлением наркотическими веществами или алкоголем, приёмом миотоксичных лекарственных препаратов, таких как статины, фибраты и др.); миопатии, ассоциированные с различными патологиями (ревматические и эндокринные заболевания, злокачественные опухоли и др.); идиопатические и эндокринные миопатии [10–13].

Ещё одной опасной патологией скелетных мышц является рабдомиолиз – процесс разрушения скелетной мышцы с высвобождением в кровоток внутриклеточных компонентов, в тяжёлых случаях угрожающий жизни. При разрушении более 100 г мышечной ткани концентрация миоглобина в крови достигает критических значений, и значительное количество белка осаждается в почечных канальцах. Данный процесс может спровоцировать острую почечную недостаточность, которая является основной причиной летальных исходов при рабдомиолизе [12, 14]. У детей основными факторами, приводящими к развитию данной патологии, являются вирусные миозиты, травмы, ревматические заболевания, физические упражнения высокой интенсивности и приём лекарственных препаратов [12].

У взрослых возникновение рабдомиолиза наиболее часто обусловлено злоупотреблением алкоголем или наркотическими веществами, приёмом лекарственных препаратов, травмами, злокачественным нейрореплетическим синдромом или обездвиженностью [5, 12].

Миопатии сопровождаются мышечной атрофией – потерей мышечной массы и силы, при которой катаболизм мышечных белков преобладает над анаболизмом. Помимо миопатий, и другие заболевания и патологии могут приводить к развитию мышечной атрофии. К ним относят хроническую сердечную недостаточность, хроническую обструктивную болезнь лёгких, рак, хронические почечные заболевания, болезнь Альцгеймера, инфекционные заболевания [15, 16]. Также к мышечной атрофии приводит обездвиживание и неиспользование мускулатуры, связанное, например, с параличом или длительной госпитализацией [3].

Отдельно стоит отметить саркопению (от греческих слов «sarx» (плоть) и «penia» (нехватка)) – потерю мышечной массы, происходящую при старении. При саркопении происходит уменьшение поперечной площади и числа мышечных волокон и накопление жировой и соединительной ткани в скелетной мышце, это процесс прогрессирующей и генерализованной потери мышечной массы и силы, который влечёт за собой низкую физическую работоспособность и, при длительном развитии, гериатрическую слабость [17]. Для этого состояния характерны повышенный риск болезненности, падений, ограничений в повседневной активности, плохой прогноз после хирургического вмешательства и, в конечном счёте, высокая смертность [16]. Распространённость саркопении достигает 13% среди людей 60–70 лет и 50% среди людей ≥ 80 лет [17]. Наличие диабета повышает риск развития саркопении в 2 раза и дальнейшей гериатрической слабости – в 1,5–4 раза [18]. Таким образом, актуальность этих проблем возрастает в связи с увеличением продолжительности жизни. На сегодняшний день для снижения прогрессирования саркопении используют коррекцию питания и физические упражнения, но при этом разрабатываются стратегии терапии, направленные на предотвращение мышечного повреждения [16–18].

Скелетная мускулатура – основной инсулин-зависимый потребитель глюкозы, поэтому потеря мышечной массы при саркопении может приводить к развитию инсулинорезистентности и, в конечном счёте, сахарному диабету 2 типа. Кроме того, формированию данных заболеваний может способствовать адипоз скелетной мышцы, наблюдаемый при саркопении [17, 19]. При саркопении и при сахарном диабете 2 типа могут развиваться функциональные нарушения,

для которых необходима диагностика и своевременное лечение. Таким образом, важным является мониторинг уменьшения массы скелетных мышц, особенно у людей с диабетом.

У человека выявлены три типа скелетных мышечных волокон: медленные, 1 типа, и быстрые (2А и 2Х типа; у других млекопитающих также есть волокна 2В типа) [20, 21]. Мышечные волокна 2А типа более устойчивы к утомлению, чем волокна 2Х типа, и содержат в своём составе больше ферментов окислительного метаболизма [22]. Состав мышцы зависит от выполняемой ею функции: мышцы, отвечающие за поддержание положения тела, в основном состоят из волокон медленного типа, в то время как мышцы, необходимые для движения, преимущественно состоят из волокон быстрого типа [21].

Развитие некоторых патологий может приводить к повреждению мышечных волокон только определённого типа. Так, при мышечной дистрофии Дюшенна повреждаются преимущественно быстрые мышечные волокна, наиболее сильно – волокна 2Х типа [23]. Мышечные повреждения, индуцированные приёмом статинов, затрагивают преимущественно волокна быстрого типа, в то время как приём фибратов – преимущественно волокна медленного типа [24, 25]. При интенсивных эксцентрических сокращениях также повреждаются волокна преимущественно быстрого типа [26]. Для многих патологических состояний, сопровождающихся мышечной атрофией, характерна не только атрофия определённого типа мышечных волокон, но и смена одних волокон на другие. Так, при денервации или обездвиженности конечности, при травме спинного мозга, при длительном постельном режиме обычно происходит смена медленных волокон на быстрые [27]. Обратный процесс, смена быстрых волокон на медленные, происходит при голодании, приёме глюкокортикоидов, кахексии и саркопении [27]. Помимо этого, для мышечных волокон быстрого и медленного типа показана разная способность к регенерации после повреждения. Так, на крысах было показано, что если мышцы, состоящие преимущественно из волокон быстрого типа (например, *extensor digitorum*, разгибатель пальцев), регенерируют эффективно, то мышцы, состоящие преимущественно из волокон медленного типа (например, *soleus*, камбаловидная мышца), не регенерируют полностью, и на месте мышечной ткани развивается фиброз [28].

Широко применяемыми способами диагностики повреждений скелетной мускулатуры являются различные инструментальные методы: магнитно-резонансная томография, компьютерная томография, двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия [29]. Данные подходы

позволяют неинвазивно детектировать изменения в скелетных мышцах (отёк, замену на жировую и соединительную ткань, мышечную атрофию), определять конкретные участки повреждений и даже проводить количественную оценку изменений в структуре скелетной мускулатуры [30–34]. Однако недостатком инструментальных методов является необходимость наличия дорогостоящего оборудования и специализированных мест для проведения манипуляций. Альтернативой является определение концентрации в крови биомаркеров – белков скелетной мускулатуры, высвобождающихся в кровоток при повреждении мышечных волокон. Наиболее широко используемыми на данный момент маркерами повреждения скелетной мускулатуры, являются креатинкиназа, а также аспаратаминотрансфераза, лактатдегидрогеназа и миоглобин [35]. В то же время необходимо отметить, что все вышеперечисленные белки не обладают специфичностью: помимо скелетной мускулатуры, они экспрессируются и в других тканях, что может снижать точность проводимой диагностики. В исследованиях, направленных на поиск и анализ новых маркеров повреждения скелетных мышц, выделяют такие белки, как связывающий жирные кислоты белок 3, лёгкие цепи миозина 3, ММ-изоформа креатинкиназы, а также скелетные изоформы тропонина И (ТнИ) [36]. Несмотря на то что все вышеперечисленные белки сравнимы или превосходят по чувствительности маркеры, используемые на сегодняшний день, среди них лишь один белок – скелетные изоформы ТнИ – специфичен для скелетной мускулатуры [9, 36, 37]. ТнИ вместе с тропонином Т (ТнТ) и тропонином С (ТнС) образует тропониновый комплекс, который участвует в регуляции мышечного сокращения [38, 39]. Изоформы ТнТ также специфичны для скелетной мускулатуры, однако мы не нашли данных, подтверждающих их использование в качестве маркера повреждения мышц. Возможность его использования как маркера требует дальнейшего изучения.

На протяжении многих лет скелетные тропонины привлекали внимание исследователей с точки зрения изучения регуляции мышечного сокращения. В данном обзоре мы описываем роль этих белков в развитии некоторых заболеваний скелетных мышц и рассматриваем возможность их применения для диагностики и терапии повреждений скелетной мускулатуры.

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРОПОНИНОВ

Тропонин И. ТнИ представлен в организме человека тремя изоформами: сердечной (сТнИ)

Таблица 1. Некоторые свойства скелетных изоформ ТНИ человека

Изоформы	Быстрый скелетный ТНИ (Uniprot P48788)	Медленный скелетный ТНИ (Uniprot P19237)
Ген	<i>TNNI2</i>	<i>TNNI1</i>
Хромосомный локус	11p15.5	1q32.1
Число экзонов	8	9
Число а.о.	182	187
Молекулярная масса (кДа)	21,3	21,7
Изоэлектрическая точка	8,9	9,6
Тканевая специфичность	быстрые скелетные мышечные волокна	медленные скелетные мышечные волокна, эмбриональные кардиомиоциты

и двумя скелетными, быстрой (бсТНИ) и медленной (мсТНИ). бсТНИ и мсТНИ экспрессируются в мышечных волокнах быстрого и медленного типа соответственно (табл. 1) [23, 40]¹. мсТНИ также экспрессируется в сердечной мышце в ходе эмбрионального развития и заменяется сТНИ в постнатальном периоде [41]. сТНИ экспрессируется только в сердечной мускулатуре после рождения [42, 43].

ТНИ препятствует взаимодействию миозина и актина в отсутствие Ca^{2+} . В присутствии Ca^{2+} ингибиторный домен ТНИ диссоциирует с поверхности актина, что способствует образованию актомиозинового комплекса [44, 45]. Основным отличием скелетных изоформ ТНИ и сТНИ является наличие в сердечной изоформе белка уникальной *N*-концевой последовательности длиной в 31 аминокислотный остаток (а.о., 2–32) (рис. 1). Фосфорилирование а.о. Ser23 и Ser24 в составе этого участка считают одним из способов регуляции мышечного сокращения [48]. Среди скелетных изоформ ТНИ структура была расшифрована только для бсТНИ. Наиболее высокое разрешение было получено методом рентгеноструктурного анализа для бсТНИ курицы в комплексе с ТнС и фрагментом ТнТ как в насыщенном Ca^{2+} состоянии (с разрешением в 3,00 Å), так и в отсутствие ионов Ca^{2+} (с разрешением в 7,00 Å) [46]. Структура бсТНИ была расшифрована для всей молекулы белка, за исключением её *C*-концевого участка.

В молекуле ТНИ можно выделить несколько функциональных участков: ИТ-рука, ингибиторный домен, регуляторный домен и *C*-концевой участок. Для медленной скелетной изоформы примерные границы участков определены исходя из сходства последовательности мсТНИ с бсТНИ и сТНИ [46, 47]. ИТ-рука (~2–106 (а.о.) для бсТНИ; ~2–107 для мсТНИ; мсТНИ человека; нумерация может отличаться у различных видов животных) выполняет структурную функцию: она состоит из *N*-концевого участка, связывающего *C*-концевой домен ТнС (~2–40 бсТНИ и мсТНИ), и ТнТ-связывающего участка (~50–106 бсТНИ и ~50–107 мсТНИ). ИТ-рука образована двумя противоположно направленными α -спиралями: Н1 (~12–48 бсТНИ и мсТНИ) и Н2 (~58–103 бсТНИ; ~59–104 мсТНИ), соединённых линкером (~49–57 бсТНИ; ~49–58 мсТНИ). Ингибиторный домен (~107–115 бсТНИ; ~108–116 мсТНИ) в отсутствие ионов Ca^{2+} взаимодействует с актином, в то время как при повышении концентрации Ca^{2+} он диссоциирует от тонкого филамента (при этом также происходит смещение тропомиозина), и актин становится доступным для связывания миозином. Регуляторный домен (~116–131 бсТНИ; ~117–132 мсТНИ), который включает в себя α -спираль Н3 (~118–127 бсТНИ; ~119–128 мсТНИ, сТНИ), при повышении концентрации Ca^{2+} связывается с *N*-концевым доменом ТнС, что приводит к диссоциации ингибиторного домена ТНИ от актина, смещению тропомиозина и взаимодействию миозина с актином.

C-Концевой участок бсТНИ не удалось кристаллизовать в связи с его подвижностью. Согласно некоторым данным, полученным с использованием ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для быстрого скелетного тропонинового комплекса курицы, *C*-концевой участок не имеет вторичной структуры и находится в неупорядоченном состоянии, причём как в отсутствие, так и в присутствии Ca^{2+} [49, 50]. Согласно данным, полученным методом малоуглового нейтронного рассеяния, при низких концентрациях Ca^{2+} *C*-концевой участок бсТНИ представляет из себя удлинённую структуру, которая предположительно может быть суперскрученной спиралью или β -слоями, в то время как в присутствии Ca^{2+} участок приобретает компактную структуру [51]. Ещё одни результаты, полученные методом ЯМР, свидетельствуют о том, что *C*-концевой участок бсТНИ курицы имеет вторичную структуру, состоящую из α -спирали, двух β -слоёв и ещё двух α -спиралей [52–54]. Считается, что *C*-концевой участок взаимодействует с актином в отсутствие Ca^{2+} и таким образом участвует в ингибировании связывания актина и миозина [52, 55, 56].

¹ Для всех белков в этом обзоре нумерация начинается с *N*-концевого метионина.

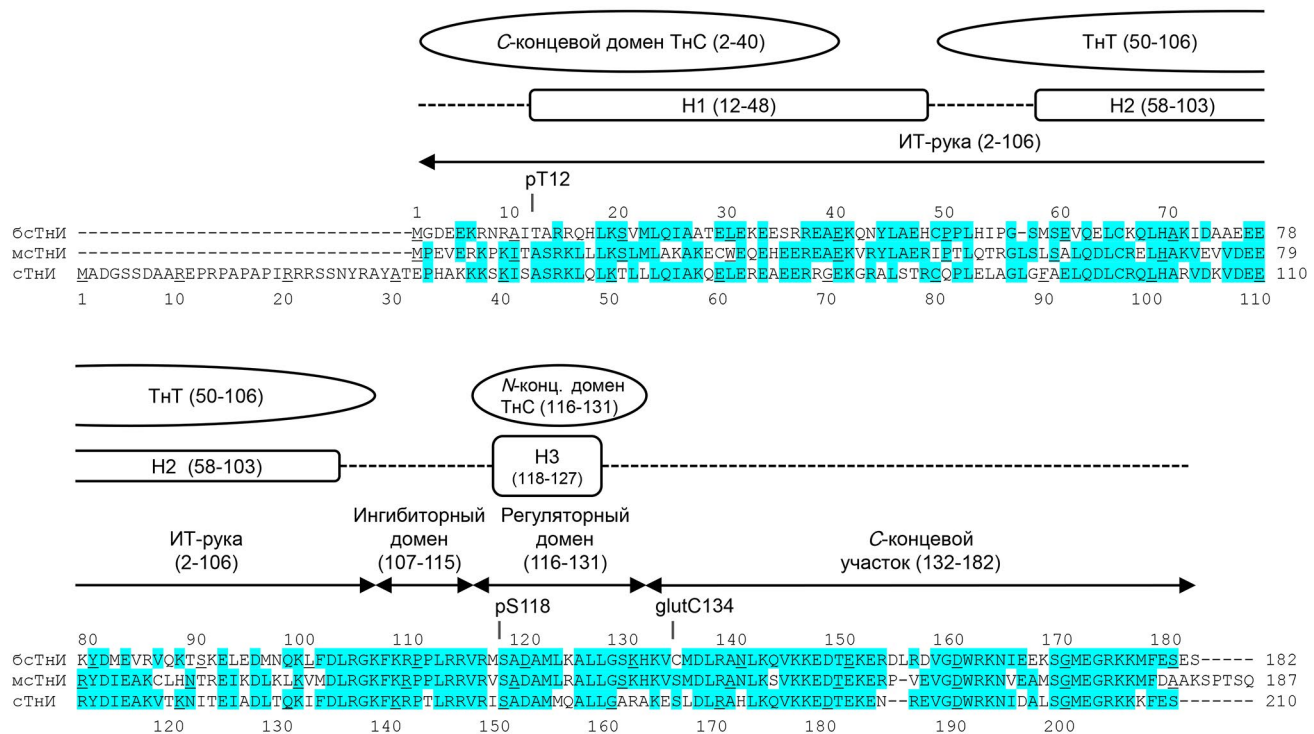


Рис. 1. Выравнивание трёх изоформ ТНИ человека: бсТНИ, мсТНИ и сТНИ. Аминокислотные последовательности белков из базы данных Uniprot: бсТНИ (TNNI2_HUMAN, P48788), мсТНИ (TNNI1_HUMAN, P19237), сТНИ (TNNI3_HUMAN, P19429). Выравнивание произведено в программе Clustal Omega. Голубым цветом отмечены совпадающие а.о. Прямоугольники обозначают границы α-спиралей (нумерация а.о. указана для последовательности бсТНИ). Стрелками отмечены сайты связывания ТnC и ТnТ. Над последовательностями указаны возможные участки фосфорилирования бсТНИ и мсТНИ (p) и глутатионилирования бсТНИ (glut) [44–47]

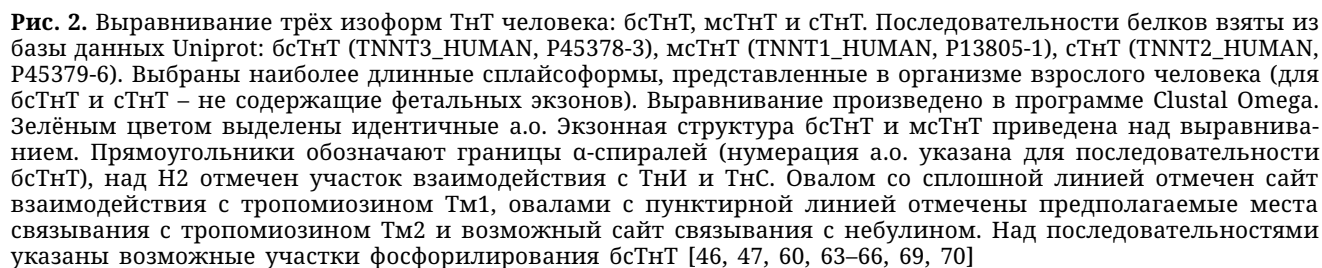
Тропонин Т. ТnТ, как и ТНИ, представлен в организме человека тремя изоформами: сердечной (сТnТ) и двумя скелетными, быстрой (бсТnТ) и медленной (мсТnТ) (табл. 2). бсТnТ и мсТnТ экспрессируются только в скелетных мышцах, в то время как сТnТ экспрессируется не только в сердце, но и в скелетной мускулатуре в ходе эмбрионального развития и в неонатальный период [57, 58].

Функция ТnТ заключается в прикреплении тропонинового комплекса к актиновому филаменту и в регуляции взаимодействия тропонинового комплекса с белками тонкого филамента [59]. В состав молекулы ТnТ входит N-концевой вариативный участок и консервативные центральный и С-концевой участки (рис. 2). N-Концевой домен ТnТ вариативен не только по аминокислотному составу, но и по длине, и разнообразие форм является результатом альтернативного сплайсинга. В составе консервативной части расположены две α-спирали, H1 (~162–188 для бсТnТ) и H2 (~196–240 для бсТnТ). H2 ТnТ образует суперскрученную спираль с H2 ТНИ, а своим С-концом взаимодействует с ТnC [46, 47, 60–62]. В состав консервативной части также входят два участка взаимодействия с тропомиозином, Тm1 и Тm2. Расположение Тm1 определено с достаточной точностью (~61–99

для бсТnТ; ~65–103 для мсТnТ), в то время как данные о локализации Тm2 противоречивы. Jin и Chong [60] считают, что Тm2 располагается между а.о. ~161–200 бсТnТ и ~165–204 мсТnТ, при этом в других работах предполагается, что Тm2 сформи-

Таблица 2. Некоторые свойства скелетных изоформ ТnТ человека

Изоформы	Быстрый скелетный ТНИ (Uniprot P45378)	Медленный скелетный ТНИ (Uniprot P13805)
Ген	<i>TNNT3</i>	<i>TNNT1</i>
Хромосомный локус	11p15.5	19q13.42
Число экзонов	19	14
Число а.о.	245–269	251–278
Молекулярная масса (кДа)	29,1–31,8	30–33
Изоэлектрическая точка	5,7–9	5,6–6,1
Тканевая специфичность	скелетные мышцы	скелетные мышцы



с актином по всей его длине. Структура ТнТ и небулина ещё не получена, однако предполагают, что участок R134–R179 бсТнТ мышцы (соответствует R123–R169 бсТнТ человека) содержит в своём составе два сайта связывания с небулином [69].

Ген *TNNT3*, кодирующий бсТНТ, содержит в своём составе 19 экзонов. Из них 8 экзонов кодирующие *N*-концевые участки экзоны 4–8 и фетальный экзон, а также кодирующие *C*-концевой участок экзоны 16 и 17 (они же экзоны α и β) – могут подвергаться альтернативному сплайсингу [71]. Фетальный экзон, расположенный между экзонами 8 и 9, экспрессируется только в эмбриональных скелетных мышцах [70, 72].

Экспрессия экзонов 16 и 17 является взаимоисключающей, экзон 16 экспрессируется преимущественно во взрослом возрасте, в то время как экзон 17 – преимущественно в эмбриональных и неонатальных мышцах [73, 74]. В ходе эмбрионального развития и постнатальный период происходит смена экспрессии сплайсоформ бсТнТ: высокомолекулярные формы сменяются низкомолекулярными, формы с кислой изоэлектрической точкой сменяются щелочными формами [75].

Во взрослых мышцах кролика методом вестерн-блоттинга была показана экспрессия пяти сплайсоформ бсТнТ: доминирующих – ТнТ1f (самая длинная, содержит в своём составе все экзоны, кроме фетального), ТнТ2f, ТнТ3f – и, в меньшей степени, ТнТ2fa, ТнТ4f [72, 76, 77]. При этом важно отметить, что состав сплайсоформ отличался в разных типах мышц. У взрослых крыс методом масс-спектрометрии было идентифицировано шесть сплайсоформ бсТнТ, при этом их состав также отличался в разных мышцах [78]. Тем же методом были детектированы шесть сплайсоформ бсТнТ у макак-резусов [79]. У взрослого человека методом масс-спектрометрии было идентифицировано только три сплайсоформы бсТнТ (fsТнТ III, VI и VII), однако в этом исследовании авторы брали только два типа мышц, *tibialis anterior* и *vastus lateralis*, первая из которых содержит в своём составе преимущественно волокна медленного типа, в связи с чем часть сплайсоформ бсТнТ могла быть не обнаружена [80].

Ген *TNNT1*, кодирующий мсТнТ, состоит из 14 экзонов. В отличие от бсТнТ, разнообразие форм, полученных в результате альтернативного сплайсинга мсТнТ, невелико. Методом вестерн-блоттинга для мышей и овец было показано наличие высокомолекулярной и низкомолекулярной форм мсТнТ [81]. Клонирование геномной кДНК мышцы позволило определить, что низкомолекулярная форма получается в результате делеции 11 а.о., которая образуется в результате альтернативного сплайсинга *N*-концевого экзона 5. Также было показано, что существуют две высокомолекулярные формы, различающиеся делецией одного а.о. в экзоне 6 [81, 82]. Клонирование геномной кДНК человека также выявило три сплайсоформы мсТнТ: полноразмерную форму, форму с *C*-концевой делецией 16 а.о., образованной в результате альтернативного сплайсинга экзона 12, и форму с двумя делециями – вышеупомянутой *C*-концевой и *N*-концевой делецией 11 а.о. (экзон 5) [82–84]. На белковом уровне методом масс-спектрометрии в скелетных мышцах человека (*vastus lateralis* и *tibialis anterior*) были идентифицированы две сплайсоформы мсТнТ – с одной и с двумя делециями [80].

Таблица 3. Некоторые свойства скелетных изоформ ТнС человека

Изоформы	Быстрый скелетный ТнС (Uniprot P02585)	Медленный скелетный/сердечный ТнС (Uniprot P63316)
Ген	<i>TNNC2</i>	<i>TNNC1</i>
Хромосомный локус	20q13.12	3p21.1
Число экзонов	6	6
Число а.о.	160	161
Молекулярная масса (кДа)	18,1	18,4
Изоэлектрическая точка	4,1	4,0
Тканевая специфичность	быстрые скелетные мышечные волокна	медленные скелетные мышечные волокна, кардиомиоциты

Тропонин С. В отличие от ТнИ и ТнТ, ТнС представлен в организме человека двумя изоформами: медленной скелетной/сердечной изоформой мс/сТнС и быстрой скелетной изоформой бсТнС, которые экспрессируются в сердечных/медленных скелетных и быстрых скелетных мышечных волокнах соответственно (табл. 3) [85].

ТнС – белок, обеспечивающий чувствительность тонкого филамента к концентрации ионов Ca^{2+} . При повышении концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в результате распространения нервного импульса по мышечному волокну ТнС связывает Ca^{2+} , что приводит к изменению конформации тропонинового комплекса, смещению молекулы тропомиозина и развитию мышечного сокращения. ТнС состоит из короткого *N*-концевого участка и четырёх EF-рук – Ca^{2+} -связывающих доменов (рис. 3). Четыре EF-руки объединены попарно и образуют *N*-концевой и *C*-концевой домены, соединённые линкером. *N*-Концевые EF-руки (I и II) обладают низким сродством к Ca^{2+} , а *C*-концевые (III и IV) – высоким сродством. *C*-Концевые EF-руки постоянно заполнены ионами Ca^{2+} или Mg^{2+} , в то время как *N*-концевые с высокой селективностью связывают Ca^{2+} при повышении его концентрации во время распространения потенциала действия в мышечном волокне. В бсТнС все четыре EF-руки могут связывать Ca^{2+} , в то время как у мсТнС первая EF-рука утратила такую способность в результате инсерции одного а.о. и замен двух а.о. [47, 62, 86].

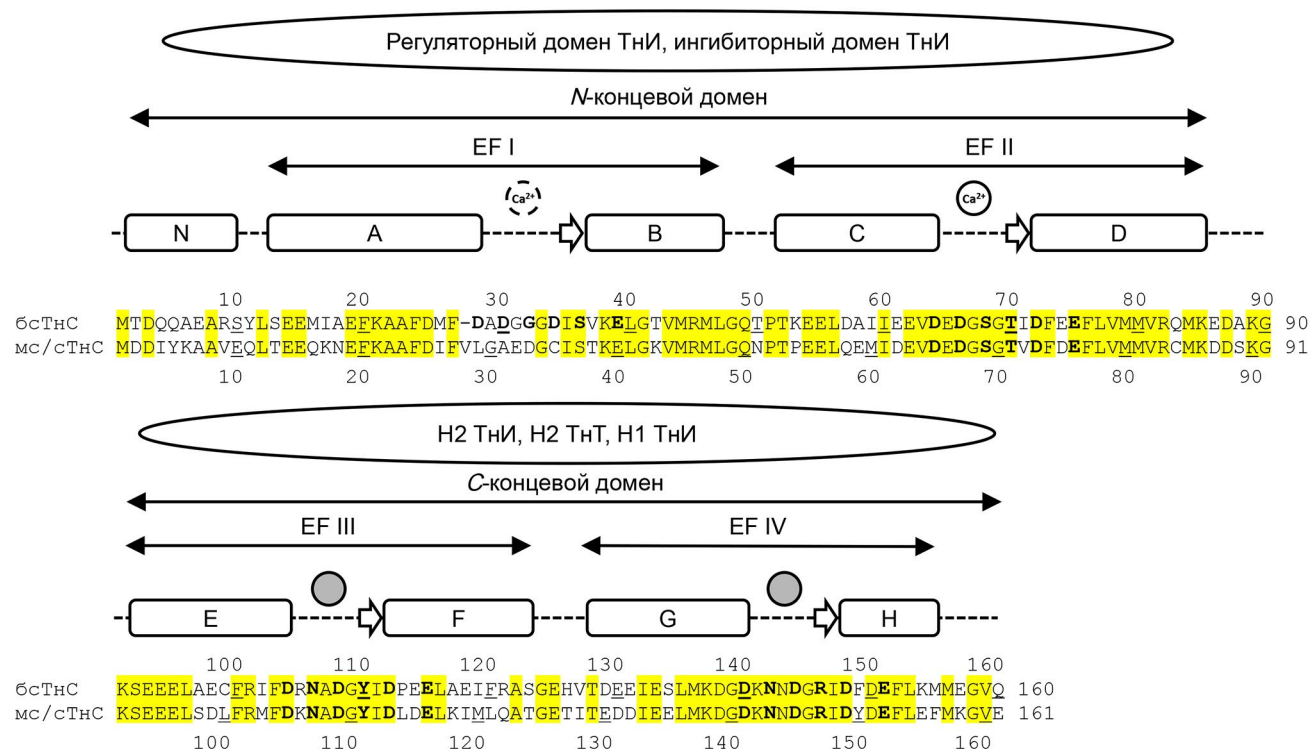


Рис. 3. Выравнивание двух изоформ ТnC человека: бсТnC и мс/сТnC. Последовательности взяты из базы данных Uniprot: бсТnC (TNNC2_HUMAN, P02585), мс/сТnC (TNNC1_HUMAN, P63316). Жёлтым цветом выделены идентичные а.о. Остатки, участвующие в связывании Ca^{2+} и Mg^{2+} , выделены жирным шрифтом. Прямоугольниками отмечены границы α -спиралей (N, A–H). Стрелками указаны N-концевой и C-концевой домены, а также EF-руки. Серыми кружками отмечены сайты связывания Ca^{2+} и Mg^{2+} ; незакрашенный кружок со сплошной линией указывает на сайт, специфичный к Ca^{2+} в обеих изоформах ТnC; кружком с пунктирной линией отмечен сайт, селективно связывающий Ca^{2+} в бсТnC (I EF-рука в мс/сТnC не связывает ионы) [46, 47, 62, 86–89]

Структура бсТnC была расшифрована методом рентгеноструктурного анализа для белка кролика [87], белка цыпленка [46] – как для свободного белка, так и для белка в составе тропонинового комплекса. Несмотря на то что мс/сТnC также экспрессируется в мышечных волокнах медленного типа, большая часть работ посвящена исследованию его структуры и роли в составе тропонинового комплекса сердца человека [47].

C-Концевой домен ТnC входит в состав ИТ-руки, взаимодействуя с другими тропонинами в области суперскрученной спирали (H2 ТнИ и H2 ТнТ) и H1 ТнИ. N-Концевой и C-концевой глобулярные домены ТnC соединены центральным линкером [46, 47]. В то время как C-концевой домен всегда связывает ионы, N-концевой домен может переключаться между двумя состояниями: закрытой конформацией в отсутствие Ca^{2+} или открытой конформацией, которая формируется при связывании Ca^{2+} EF-рукой(ами). Связывание Ca^{2+} приводит к образованию гидрофобного кармана, который взаимодействует с регуляторным доменом ТнИ, что приводит к удалению ингибиторного домена ТнИ от молекулы актина и развитию мышечного сокращения [88, 89].

Функциональные различия изоформ тропонинов. Быстрые скелетные, медленные скелетные и сердечные волокна поперечно-полосатой мускулатуры по-разному реагируют на повышение концентрации Ca^{2+} . Медленные мышечные волокна обладают наибольшей чувствительностью к Ca^{2+} (другими словами, пороговая концентрация Ca^{2+} , необходимая для их сокращения, меньше), быстрые – наименьшей чувствительностью [21, 90, 91]. При этом наибольшая кооперативность сокращения (коэффициент Хилла) наблюдается у мышечных волокон быстрого типа, а минимальная – у медленных. Есть данные, свидетельствующие о том, что эти различия могут быть обусловлены изоформами тропонинов, экспрессирующимися в разных типах волокон. Так, при замене мс/сТnC на бсТnC в сердечных волокнах чувствительность к Ca^{2+} снижается, при этом замена бсТnC на мс/сТnC в быстрых скелетных волокнах приводила к повышению чувствительности к Ca^{2+} [90]. При замене быстрого скелетного тропонинового комплекса на сердечный в волокнах быстрого типа наблюдалось увеличение чувствительности к Ca^{2+} и снижение кооперативности сокращения [92].

Падение внутриклеточного pH (ацидоз) во всех типах поперечной-полосатой мускулатуры приводит к сократительной дисфункции, в том числе к уменьшению чувствительности к Ca^{2+} . В сердце опасное понижение внутриклеточного pH до значений 6,5 и ниже наблюдается при длительной ишемии и обусловлено накоплением продуктов метаболизма, в том числе лактата [93, 94]. В скелетных мышцах понижение pH было выявлено при интенсивных физических нагрузках, но, хотя понижение pH и влияет на мышцы, его эффект не столь существенный, как в сердце. У человека после физической нагрузки высокой интенсивности pH падает до ~6,5, при этом в среднем pH обычно снижается до ~6,8–6,9 [95–97]. Как и в случае чувствительности к Ca^{2+} , степень эффекта от понижения pH варьирует в зависимости от типа мышечных волокон: наиболее ярко он проявляется в сердечной мускулатуре и наименее – в скелетных волокнах медленного типа [98]. Эксперименты на выделенных мышечных волокнах показали, что при снижении pH с 7 до 6,5 наименьшее падение чувствительности к Ca^{2+} наблюдается у медленных мышечных волокон (у быстрых и сердечных падение больше и примерно одинаково по амплитуде) [90]. При этом дальнейшее понижение pH до 6,2 оказывает наиболее сильное действие на сердечные волокна, но не на скелетные.

Чувствительность сократительного аппарата к ацидозу во многом обусловлена тропониновым комплексом, а величина этого эффекта определяется в том числе различными изоформами тропонинов [99]. Так, эксперименты, проведенные на выделенных мышечных волокнах, показали, что замена бсТnC на мс/сТnC в быстрых мышечных волокнах приводит к увеличению чувствительности к pH, и, наоборот, замена мс/сТnC на бсТnC в медленных мышечных волокнах приводит к небольшому уменьшению чувствительности к закислению [100]. Последний эффект ещё более выражен при замене мс/сТnC на бсТnC в сердечных волокнах [99]. Таким образом, мс/сТnC увеличивает зависимость от pH, а бсТnC – уменьшает её. Другие авторы показали, что на чувствительность к pH влияют комбинации ТnC и ТnИ. Авторы выделяли сердечные волокна и заменяли ТnИ и ТnC на другие изоформы белков, вместе или по отдельности. В волокнах, содержащих сТnИ или бсТnИ, мс/сТnC обуславливает повышенную чувствительность к pH в сравнении с бсТnC. При этом замена сТnИ на мсТnИ приводит к снижению чувствительности к pH независимо от того, какая изоформа ТnC присутствует. Это позволило авторам сделать вывод о том, что ТnC в большей степени обуславливает чувствительность к pH в быстрых скелетных или сердечных волокнах, а ТnИ – в медленных ске-

летных волокнах [90]. Последнее хорошо согласуется с тем, что неонатальные кардиомиоциты, в которых экспрессируется мсТnИ, менее чувствительны к ацидозу, чем взрослые кардиомиоциты, экспрессирующие сТnИ [101]. Этот эффект также воспроизводился в трансгенных мышцах: при замене сТnИ на мсТnИ чувствительность к ацидозу снижалась [102]. Более поздние исследования показали, что данный эффект, вероятно, обусловлен наличием остатка His132 в составе мсТnИ (His131 у бсТnИ); в молекуле сТnИ на его месте расположен Ala163. Данный а.о. локализован в регуляторном домене ТnИ и участвует во взаимодействии с ТnC. Было показано, что при понижении pH электростатическое взаимодействие между остатком гистидина и остатками Glu15 и Glu19 в составе молекулы ТnC стабилизирует конформацию тропонинового комплекса, что приводит к сокращению мышцы [103–106].

Три изоформы ТnТ отличаются значениями своих изоэлектрических точек, при этом изоформа бсТnТ, экспрессирующаяся у взрослых, является наиболее щелочной. Помимо этого, в ходе развития наблюдается смена сплайсоформ бсТnТ от более кислых к более щелочным вариантам, что в конечном счёте приводит к экспрессии щелочных сплайсоформ во взрослом возрасте. Данные различия обусловлены вариабельностью N-концевого домена [107]. Однако существует уникальная кислая сплайсоформа бсТnТ, экспрессирующаяся в некоторых типах мышц у взрослых куриц [107]. Было показано, что эти мышцы обладают меньшей чувствительностью к Ca^{2+} , а также большей устойчивостью к ацидозу в сравнении с мышцами, которые экспрессируют щелочные сплайсоформы бсТnТ [108]. Полученные данные согласуются с тем фактом, что при экспрессии бсТnТ в сердце трансгенных мышей снижалась устойчивость сердечной мышцы к ацидозу [109].

СКЕЛЕТНЫЕ ТРОПОНИНЫ КАК МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЫ

Одним из наиболее чувствительных и специфичных подходов для детекции и определения концентрации маркеров, в том числе скелетных изоформ ТnИ, является иммунный анализ типа «сэндвич» [110]. В большинстве случаев метод основан на использовании двух антител, распознающих различные эпитопы на поверхности антигена: антитело подложки и детекторное антитело, которое может быть конъюгировано с различными метками. Насколько нам известно, на сегодняшний день нет зарегистрированных для клинического применения тест-систем, детектирующих скелетные изоформы ТnИ,

и во всех опубликованных работах использовались системы, предназначенные только для научно-исследовательских целей.

В ряде исследований были определены концентрации скелетных изоформ ТнИ у здоровых людей. Средние значения базальных концентраций варьировали от $1,74 \pm 0,27$ нг/мл до $2,5 \pm 0,9$ нг/мл при их определении одним и тем же методом в разных работах [111–114]. В ещё одном исследовании концентрация скелетных изоформ ТнИ у здоровых была ниже предела обнаружения (ПрО), равного 1,2 нг/мл [115]. В работе, где определяли концентрацию бсТнИ, его базальная концентрация оказалась ниже ПрО метода, который составлял 2,4 нг/мл [9, 116]. Необходимы дальнейшие исследования, однако имеющиеся данные позволяют предположить, что средний уровень скелетных изоформ ТнИ в здоровой популяции ниже 1–2 нг/мл.

При повреждении скелетной мускулатуры нарушается целостность мембраны мышечного волокна, и внутриклеточные белки попадают в кровоток. Показано, что уровень скелетных изоформ ТнИ растёт при повреждениях скелетной мускулатуры различной этиологии. Так, их концентрация повышена у больных с рабдомиолизом [117, 118]; после интенсивных физических нагрузок: например, после триатлона [113], бега [119], эксцентрических сокращений [26, 120–122]; при травмах опорно-двигательного аппарата и мягких тканей, в том числе после хирургического вмешательства [114, 119]. Также наблюдается рост концентрации скелетных изоформ ТнИ у больных с воспалительными миопатиями, например, полимиозитом и дерматомиозитом [115, 119, 123]. Концентрация скелетных изоформ ТнИ коррелирует с клинической картиной при мышечных дистрофиях (Дюшенна, Беккера и пояснично-конечностной мышечной дистрофии), и поэтому возможно использование данного параметра для оценки степени тяжести заболевания и мониторинга ответа на терапию [9].

Одним из потенциальных приложений скелетных изоформ ТнИ как биомаркера является определение миотоксичности лекарственных препаратов, при использовании которых происходит разрушение мышечных волокон и высвобождение тропонина в кровоток [36, 37, 124, 125]. Возможность такого применения была показана на крысах, а также с использованием 3D мышечной ткани человека *in vitro* [126, 127].

Наличие изоформ, специфичных для различных типов скелетных волокон, предоставляет дополнительные возможности для диагностики. Как было описано в предыдущем разделе, при ряде повреждений/заболеваний скелетной мускулатуры может затрагиваться определённый тип

мышечных волокон. Например, при эксцентрических сокращениях повреждаются волокна преимущественно быстрого типа, и при этом именно бсТнИ, а не мсТнИ высвобождается в кровоток [26, 121, 122]. Для некоторых мышечных дистрофий также показано повышение концентрации бсТнИ, но не мсТнИ [128].

Максимальные концентрации скелетных изоформ ТнИ достигали 500 нг/мл через 6 ч после прохождения триатлона (4 км плавания, 120 км езды на велосипеде, 30 км бега), при этом средняя концентрация составила $62,2 \pm 139$ нг/мл [113]. Также высокие концентрации детектировали через 6 ч после скоростного спуска: медиана составляла 27,3 нг/мл (интерквартильный размах 8,5–43 нг/мл), в то время как более низкие концентрации были выявлены через 6 ч после бега с увеличением скорости: 6,6 нг/мл (3,7–9 нг/мл), и после эксцентрических сокращений четырёхглавой мышцы бедра: 6,8 нг/мл (3,1–14,9 нг/мл) [26]. Средние концентрации скелетных изоформ ТнИ в пределах 24 ч после травмы составили: $15,3 \pm 2,4$ нг/мл после травмы опорно-двигательного аппарата и $10,4 \pm 1,8$ нг/мл после травмы мягких тканей [114]. Максимальная концентрация скелетных изоформ ТнИ у больных с воспалительными миопатиями составила 516 нг/мл, а медиана – 8,6 нг/мл (интерквартильный размах 3,2–33,5 нг/мл) [115].

Исследований, посвящённых использованию скелетных ТнТ в качестве возможных маркеров мышечного повреждения, пока не опубликовано, но мы предполагаем, что, по аналогии с сердечными тропонинами И и Т, которые являются маркерами повреждения сердечной мускулатуры, скелетные изоформы ТнТ также могут быть потенциальными удобными маркерами для диагностики повреждений скелетной мышцы.

Ряд авторов также предлагает использовать бсТнС в качестве маркера повреждения скелетной мускулатуры [129]. Однако детекция ТнС будет обладать меньшей специфичностью, чем детекция скелетных изоформ ТнИ или ТнТ, так как бсТнС экспрессируется только в мышечных волокнах быстрого типа, а с/мсТнС – в волокнах медленного типа и в сердечной ткани.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ИММУНОХИМИЧЕСКУЮ ДЕТЕКЦИЮ СКЕЛЕТНЫХ ТРОПОНИНОВ

На взаимодействие антител со скелетными изоформами тропонинов могут оказывать влияние различные факторы: гомология с другими изоформами тропонинов, присутствие сплайс-форм, посттрансляционные модификации, протеолиз, связывание аутоантител и экранирование

белками тропонинового комплекса. Подобные воздействия могут значительно искажать результаты проводимых измерений и должны быть учтены как при исследовании свойств данных белков, так и при разработке иммунохимических систем.

Сходство изоформ. Степень сходства изоформ составляет ~60% и для ТнИ, и для ТнТ (при сравнении наиболее длинных сплайсоформ, экспрессирующихся у взрослых людей: P45378-3 для бсТнТ, P13805-1 для мсТнТ и P45379-6 для сТнТ) (рис. 1 и 2), поэтому одна из проблем, возникающая при иммунохимической детекции скелетных тропонинов – перекрёстное взаимодействие антител с сердечной изоформой белка или со второй скелетной изоформой (в случае дифференцированного определения медленной или быстрой скелетной изоформы тропонина), что может снижать специфичность определения целевого маркера. Высокая степень гомологии тропонинов значительно уменьшает количество эпитопов, к которым возможно получить антитела для специфического определения отдельных изоформ белка. Наиболее консервативными как для ТнИ, так и для ТнТ являются С-концевые участки молекул, наиболее вариабельными – N-концевые.

Альтернативный сплайсинг ТнТ. Как уже было описано выше, скелетные изоформы ТнТ, особенно бсТнТ, представлены в мышцах человека несколькими сплайсоформами. Для выявления наибольшего количества форм белка предпочтительнее использовать антитела, специфичные к участкам, кодируемым экзонами 1–3 и 9–15. Для бсТнТ следует избегать использования антител, взаимодействующих с N-концевыми а.о. 11–38, а также с С-концевым участком 232–244 а.о., который может отличаться у разных сплайсоформ (нумерация а.о. указана для последовательности P45378-3). В случае мсТнТ следует избегать использования антител, распознающих а.о. 25–35 и 205–220 (нумерация указана для самой длинной сплайсоформы P13805-1), которые имеют отличия в разных сплайсоформах.

Фосфорилирование ТнИ и ТнТ. Фосфорилирование меняет заряд белка и может оказывать значительное влияние на взаимодействие антител и антигена.

Фосфорилирование ТнИ. Показано, что бсТнИ кролика может быть фосфорилирован *in vitro* киназой фосфоорилазы, 3'5'-сАМР-зависимой протеинкиназой, Ca^{2+} -фосфолипид-зависимой протеинкиназой, а бсТнИ человека – АМР-активируемой протеинкиназой (АМРК) [130–134]. Были определены остатки, которые подвергаются фосфорилированию: Thr12 и Ser118 для бсТнИ кролика и Ser118 для белка человека [131, 132, 134]. Так как в последовательности бсТнИ чело-

века так же, как и в бсТнИ кролика, присутствует остаток Thr12, не исключена возможность фосфорилирования белка человека и по данному остатку. Также было показано, что фосфорилирование *in vitro* ингибируется при взаимодействии с ТнС, что согласуется с данными по структуре тропонинового комплекса: оба выявленных остатка расположены в участках взаимодействия с ТнС [46, 130]. Фосфорилирование мсТнИ *in vitro* не было описано, однако последовательность мсТнИ включает один а.о., гомологичный сайту фосфорилирования бсТнИ: Ser118 (мсТнИ) (рис. 1).

Было показано, что изолированный из скелетных мышц кролика бсТнИ присутствует в частично фосфорилированной форме, причём степень фосфорилирования может зависеть от метода выделения белка [130, 131, 135]. Методом масс-спектрометрии в экстракте мышц человека (*vastus lateralis* и *tibialis anterior*) и экстракте мышц крысы (7 видов мышц) бсТнИ был детектирован в нефосфорилированном виде, при этом мсТнИ присутствовал как в фосфорилированной, так и в нефосфорилированной формах [78, 80]. Методом масс-спектрометрии экстракта мышц макак-резусов фосфорилированных форм скелетных ТнИ обнаружено не было [79]. Учитывая приведённые выше данные, можно предположить, что доля фосфорилированных форм скелетных ТнИ в крови будет незначительной, и, следовательно, данная модификация не окажет значительного влияния на распознавание антигена при помощи антител.

Фосфорилирование ТнТ. *In vitro* было показано, что бсТнТ, выделенный из скелетных мышц кролика, является субстратом для различных киназ: киназы фосфоорилазы, 3'5'-сАМР-зависимой протеинкиназы, казеинкиназы 2, Ca^{2+} -фосфолипид-зависимой протеинкиназы [59, 130, 132, 133, 136–140]. Для бсТнТ кролика были выявлены три участка фосфорилирования: Ser2, Ser152 и Ser159 (они указаны для P45372-3 Uniprot). Ser2 также присутствует в бсТнТ человека, а Ser152 и Ser159 входят в состав последовательности Ala-Leu-Ser-SerP-Met-Gly-Ala-Asn-Tyr-Ser-SerP-Tyr, которая у бсТнТ человека полностью соответствует белку кролика. Исходя из этого, можно предположить возможность фосфорилирования по данным остаткам и для бсТнТ человека [132].

In vivo было показано, что выделенный из скелетных мышц кролика бсТнТ присутствует в фосфорилированной форме [130, 132]. Более того, такой белок фосфорилирован лишь по одному из трёх сайтов, выявленных *in vitro*: Ser2. Эти результаты согласуются с данными масс-спектрометрии белков, экстрагированных из мышечной ткани человека и различных видов животных.

Для бсТнТ человека, крысы, макаки-резуса, выделенных из нескольких типов мышц, идентифицировали нефосфорилированные и монофосфорилированные формы (различных сплайс-форм) бсТнТ [78–80], при этом Ser2 был единственным сайтом фосфорилирования, определённым *in vivo*.

Данные по фосфорилированию мсТнТ *in vitro* отсутствуют. Однако в составе мсТнТ есть остаток Ser2, гомологичный Ser2 в составе бсТнТ и сТнТ, для которых показано фосфорилирование как *in vitro*, так и *in vivo* [141, 142]. Высокая вероятность фосфорилирования Ser2 мсТнТ в мышечной ткани человека подтверждена методом масс-спектрометрии [80]. Аналогичным методом обнаружили, что в скелетных мышцах человека и крысы мсТнТ представлен преимущественно фосфорилированной форме, а в мышцах макаки-резуса – в фосфорилированной и нефосфорилированной формах [78–80].

Таким образом, можно предположить, что бсТнТ и мсТнТ попадают в кровоток в частично фосфорилированной форме. Однако в связи с тем, что сайт фосфорилирования расположен в N-концевой части молекул, он, вероятно, не будет оказывать значительного влияния на распознавание скелетных изоформ ТнТ антителами.

Глутатионилирование ТнИ. Lamb et al. показали на выделенных мышечных волокнах крысы и человека, что бсТнИ, но не мсТнИ, может подвергаться глутатионилированию [143–145]. Данная модификация затрагивает один из остатков цистеина – Cys134. Это согласуется с результатами масс-спектрометрических исследований: для скелетной мускулатуры макаки-резуса и крысы было показано наличие двух протеоформ бсТнИ: с глутатионом и без, что подтверждает наличие базового уровня глутатионилирования именно для бсТнИ [78, 79].

Протеолиз ТнИ и ТнТ. сТнИ может подвергаться N- и C-концевому протеолизу: как в некротической ткани сердца, так и в крови детектируются различные протеолизированные формы сТнИ [146, 147]. Было обнаружено, что сТнИ может быть субстратом для ряда протеаз: металлопротеиназы-2, кальпаина 1 (μ -кальпаина) и кальпаина 2 (m -кальпаина) [148–151]. Исследования протеолиза сТнИ в крови больных с инфарктом миокарда показали наличие до 11 протеолитических фрагментов различной длины [147, 152]. Ввиду высокой гомологии возможен протеолиз и скелетных изоформ ТнИ. Протеолизированные бсТнИ и мсТнИ и их фрагменты были идентифицированы в крови больных, при этом было показано, что при разных типах повреждений/заболеваний количество этих фрагментов в крови варьирует [118]. На основании получен-

ных результатов авторы предполагают, что протеолиз происходит непосредственно в ткани, а в кровоток белки высвобождаются уже в протеолизированной форме. Однако необходимы дальнейшие исследования протеолиза скелетных изоформ ТнИ и локализации участков молекулы, в которых происходит расщепление молекул белка.

сТнТ также подвержен протеолитическому расщеплению. В апоптотических кардиомиоцитах было показано щепление сТнТ по N-концу под действием каспазы-3 с формированием фрагмента размером 25 кДа [153]. Ограниченный N-концевой протеолиз сТнТ под воздействием кальпаина 1 (μ -кальпаина) также наблюдали в ходе ишемии-реперфузии миокарда [148, 154]. В крови больных с инфарктом миокарда обнаружены как минимум 23 фрагмента сТнТ различной длины, и несколько участков протеолиза выявлены в N-концевой, центральной и C-концевой частях молекулы [155]. Для скелетных изоформ ТнТ подобные исследования ещё не были опубликованы. Для бсТнТ есть только данные по протеолитическому щеплению в мышце после сильной физической нагрузки [156]. Необходимо дальнейшее изучение форм скелетных изоформ ТнТ, присутствующих в кровотоке, и определение сайтов протеолиза.

Экранирование эпитопов в составе тропонинового комплекса. сТнИ и сТнТ присутствуют в крови больных с инфарктом миокарда в составе тройного тропонинового комплекса (ТнИ–ТнТ–ТнС), двойного тропонинового комплекса (ТнИ–ТнС) и протеолитических фрагментов ТнТ [152, 157, 158]. Несмотря на то что пока не получено экспериментальных данных о том, в каком виде скелетные тропонины высвобождаются в кровоток, можно предположить, что они будут присутствовать в крови в том числе в виде комплексов. Для иммунохимической детекции важно использовать такие антитела, которые распознают эпитопы, доступные для взаимодействия с антителами в составе всех представленных в крови форм белков. При формировании тройного комплекса C-концевые области скелетных ТнТ, ограниченные примерно 197–241 а.о. для бсТнТ и 202–261 для мсТнТ, могут быть экранированы ТнИ и ТнС. В случае скелетных изоформ ТнИ молекулами ТнТ и ТнС для взаимодействия с антителами может быть блокирована значительная часть последовательности белка: области, ограниченные примерно 2–40, 50–106, 116–131 а.о. для бсТнИ и 2–40, 51–107, 117–132 а.о. для мсТнИ. Таким образом, доступными для антител остаются небольшие участки аминокислотных последовательностей в центральных и C-концевых частях молекул ТнИ. Альтернативным подходом,

позволяющим использовать антитела, специфичные к заблокированным в комплексе участкам молекул ТнИ и ТнТ, является разрушение тропониновых комплексов, присутствующих в образце, под воздействием ЭДТА [115, 116, 157].

Связывание аутоантител. Одним из факторов, оказывающих влияние на иммунохимическую детекцию сердечных тропонинов, является наличие аутоантител, которые взаимодействуют с анализируемым белком в крови. Они могут интерферировать с антителами иммунохимических тест-систем и приводить к возникновению ложноотрицательных результатов. Показано, что примерно у 10% здоровых людей в крови присутствуют аутоантитела к сТнИ [159]. Также было выявлено, что такие аутоантитела обычно специфичны к конформационным эпитопам, которые формируются при связывании ТнИ и ТнТ [160]. Исследований о наличии аутоантител к скелетным изоформам ТнИ нет, однако, учитывая высокую степень гомологии, можно предположить, что подобные иммуноглобулины также могут присутствовать в крови некоторых больных.

Учитывая все описанные выше данные, можно заключить, что антитела, специфичные к С-концевым участкам ТнИ, могут демонстрировать перекрёстное взаимодействие с другими изоформами ТнИ, в то время как центральные участки молекул могут быть экранированы ТнС и ТнТ. Влияние посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование и глутатионилирование, можно считать незначительным, в то время как роль и степень протеолиза, а также влияния аутоантител требует дальнейшего изучения. Таким образом, наиболее перспективными сайтами для иммунохимической детекции скелетных изоформ ТнИ представляются центральные части молекулы, особенно те участки, которые не экранированы другими компонентами тропонинового комплекса.

В случае ТнТ N-концевая (11–38 а.о. для бсТнТ и 25–35 а.о. для мсТнТ) и С-концевая (231–244 а.о. для бсТнТ и 205–220 а.о. для мсТнТ) части молекулы подвергаются альтернативному сплайсингу, С-концевые части (а.о. ~197–241 для бсТнТ и мсТнТ) также могут быть экранированы ТнИ и ТнС. Влияние фосфорилирования можно считать незначительным, а роль и степень N- и С-концевого протеолиза требует дальнейшего изучения. Таким образом, наиболее перспективными для иммунохимического выявления можно считать центральные участки скелетных изоформ ТнТ.

МУТАЦИИ В СКЕЛЕТНЫХ ТРОПОНИНАХ КАК ИСТОЧНИКИ ПАТОЛОГИЙ СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЫ

Тропониновый комплекс играет важную роль в регуляции мышечного сокращения. Мутации в тропонинах могут приводить к изменению структуры и функциональности белка. На сегодняшний день выявлен ряд мутаций, ассоциированных с развитием таких заболеваний скелетных мышц, как артрогрипоз и конгенитальные миопатии.

Мутации в генах скелетных изоформ ТнИ. Показано, что мутации в гене *TNNI2* (бсТнИ) являются одной из причин дистального артрогрипоза. Это наследуемое по аутосомно-доминантному типу заболевание, при котором поражаются суставы и снижается подвижность дистальных отделов конечностей. Все выявленные до настоящего времени мутации *TNNI2* затрагивают только С-концевой участок молекулы: R156X (приводящая к экспрессии укороченной формы бсТнИ (1–156)), R162G, R162K, I165F, E167X, K168E, R174Q, R174W, K175N, K175X, K176X, F178C, F178L [161–172].

Для мсТнИ (*TNNI1*) в настоящий момент выявлены две патогенные мутации [170, 173]. Одна из них, K175X, расположена в той же области, что и у бсТнИ, и приводит к образованию укороченной формы мсТнИ [170]. Данная делеция ассоциирована с развитием проксимального артрогрипоза – также наследуемого по аутосомно-доминантному типу заболевания, при котором затрагиваются проксимальные суставы. Мутация в другой области мсТнИ, R37C, приводит к экспрессии мсТнИ в сердце до двух лет после рождения [173] и увеличивает риск внезапной детской смерти.

Мутации в генах скелетных изоформ ТнТ. Мутации в гене *TNNT3* (бсТнТ), так же как и в *TNNI2* (бсТнИ), приводят к развитию дистального артрогрипоза. Для *TNNT3* было обнаружено несколько замен, затрагивающих один и тот же а.о.: R66C, R66H, R66S [171, 174–177]². Стоит также выделить мутацию в гене *TNNT3* (бсТнТ), которая вызывает сразу два заболевания: дистальный артрогрипоз и немалиновую миопатию, поражающую мышечные волокна быстрого типа [178]. Эта мутация в интроне, приводящая к нарушению сплайсинга и понижению экспрессии бсТнТ, сопровождается компенсаторной гипертрофией мышечных волокон медленного типа.

Делеции в гене *TNNT1* (мсТнТ) ассоциированы с немалиновой миопатией, наследуемой по аутосомно-рецессивному типу. Она проявляется в раннем детстве в виде дыхательной недостаточ-

² Стоит отметить, что при указании этой мутации авторы исследований используют последовательность бсТнТ, соответствующую P45378-2, которая на 3 а.о. короче используемой в этом обзоре последовательности P45378-3. Поэтому в статьях данная замена фигурирует как R63.

ности, атрофии мышечных волокон медленного типа и компенсаторной гипертрофии мышечных волокон быстрого типа. В конечном счёте немалиновая миопатия приводит к смерти в детском возрасте от дыхательной недостаточности. Были обнаружены делеции E180X (экспрессия укороченной формы мсТнТ 1–179) и S108X (экспрессия укороченной формы мсТнТ 1–107), делеция экзонов 8 и 14, а также экспрессия укороченной формы мсТнТ 1–203 [179–182]. Эти делеции затрагивают участки взаимодействия ТнТ с тропомиозином, а также сайты связывания с ТнИ и ТнС.

Было показано, что отсутствие участков связывания тропонинов с тропомиозином при делеции E180X препятствует формированию тропонинового комплекса и его встраиванию в тонкие филаменты [183]. Если мРНК мсТнТ (1–179) ещё детектируется в мышечных волокнах, то белковая молекула мсТнТ (1–179) быстро деградирует и уже не может быть обнаружена [184]. Данный факт объясняет рецессивность мутации: при наличии одной правильной копии гена полноразмерный мсТнТ экспрессируется и встраивается в тропониновый комплекс, а экспрессирующийся мутантный укороченный мсТнТ (1–179) не обладает цитотоксичностью, так как такой вариант мсТнТ сразу подвергается деградации [185].

Мутации в генах ТнС. Мутации в гене *TNNC2* (бсТнС) ассоциированы с конгенитальной миопатией, наследуемой по аутосомно-доминантному типу. Это замены D34Y и M79Y, которые расположены в I EF-руке и рядом со II EF-рукой соответственно. Они влияют на связывание с Ca^{2+} и регуляторным доменом ТнИ, поэтому при наличии данных мутаций происходит снижение чувствительности мышцы к Ca^{2+} [186, 187].

В связи с тем, что мс/сТнС экспрессируется не только в медленной скелетной, но и в сердечной мускулатуре, ряд мутаций в *TNNC1* (мс/сТнС), включая A8V, L29Q, A31S, C84Y, E134D, D145E, Q122AfsX30 (мутация со сдвигом рамки считывания), ассоциирован с кардиомиопатиями и сердечной дисфункцией [188–191]. У некоторых больных с кардиомиопатиями, вызванными данными заменами, также наблюдались патологии скелетной мускулатуры, однако исследований, посвящённых тому, какие именно мутации и каким образом влияют на скелетную мускулатуру, пока недостаточно [187, 192]. В экспериментах *in vitro* было показано, что все вышеперечисленные замены, за исключением C84Y, не оказывают влияния на фенотип и функционирование мышечных волокон медленного типа. C84Y, в свою очередь, повышает чувствительность к Ca^{2+} так же, как и в сердечных волокнах. Описанные различия во влиянии мутации на медленные и сердечные мышечные волокна могут быть обусловлены тем,

что в составе медленных мышечных волокон мс/сТнС образует комплекс с другими, медленными скелетными изоформами ТнТ и ТнИ, а не сердечными белками [193].

ТРОПОНИНЫ КАК МИШЕНИ ДЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Помимо источника патологий, скелетные тропонины могут выступать и в роли мишеней для лекарств, применяемых при лечении заболеваний скелетной мускулатуры. К такого рода заболеваниям относят периферические моторные нейропатии – боковой амиотрофический склероз (БАС), спинальную мышечную атрофию, заболевание Шарко–Мари–Тута – в ходе которых повреждаются моторные нейроны и нарушается передача нервных импульсов, и миастении гравис, при которой разрушаются нервно-мышечные синапсы. Нарушение иннервации скелетных мышц в конечном счёте приводит к мышечной слабости, инвалидности и высокой смертности. Одним из вероятных терапевтических подходов может быть увеличение чувствительности мышечных волокон к Ca^{2+} таким образом, чтобы достаточная активация достигалась даже при меньших концентрациях Ca^{2+} . Молекула из группы первых активаторов быстрого скелетного тропонина, СК-2017357 (тирасемтив), избирательно взаимодействует с быстрым скелетным тропониновым комплексом: связывание происходит в гидрофобном кармане, образованном N-концевым доменом бсТнС и регуляторным доменом бсТнИ [194]. Показано, что связывание тирасемтива увеличивает степень сродства низкоаффинных сайтов связывания бсТнС к Ca^{2+} , тем самым повышая чувствительность мышцы к Ca^{2+} [195]. Тирасемтив проявил себя многообещающе у больных с БАС, больных с миастенией гравис, и исследования даже дошли до третьей фазы клинических испытаний, однако были приостановлены в связи с выявлением побочных эффектов [196–202]. Сейчас разрабатывают и другие лекарственные средства из группы активаторов быстрого скелетного тропонина: СК-2127107, СК-2066260 и релдесемтив [203–206]. Наиболее успешно проявил себя релдесемтив – молекула второго поколения, полученная путём химической оптимизации тирасемтива и обладающая схожим механизмом действия [207, 208]. Релдесемтив дошёл до второй фазы клинических испытаний при терапии спинальной мышечной атрофии и до третьей – при терапии БАС, однако испытания на пациентах с БАС были прекращены в связи с отсутствием терапевтического эффекта [206, 209, 210]. Несмотря на то что мс/сТнС экспрессируется не только

в сердце, но и в мышечных волокнах медленного типа, исследования регуляторов чувствительности мс/сТнС к Ca^{2+} изучались в основном в контексте изучения функций сердца. Эти лекарственные молекулы влияют на чувствительность мышечных волокон Ca^{2+} путём изменения аффинности N-концевого домена мс/сТнС к Ca^{2+} . Один из наиболее широко изученных кальциевых сенситизаторов, левосимендан, связывается с гидрофобным карманом мс/сТнС и регуляторным доменом сТнИ – так же, как и тирасемтив [211]. Левосимендан (лицензирован в некоторых странах) и его аналоги предназначены для лечения тяжёлой хронической сердечной недостаточности.

В отличие от вышеперечисленных лекарственных молекул, ингибитор тропонина W7 уменьшает чувствительность к Ca^{2+} и может быть использован для лечения метаболических кардиомиопатий, вызванных длительным алкалозом, или врождённых кардиомиопатий [212, 213]. W7 также связывается с гидрофобным карманом, образованным N-концевым доменом мс/сТнС и регуляторным доменом сТнИ, однако, в отличие от левосимендана, он сдвигает регуляторный домен сТнИ от его сайта связывания с мс/сТнС, тем самым снижая чувствительность мышцы к Ca^{2+} [213, 214].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патологии скелетной мускулатуры оказывают негативное влияние на функционирование всего организма. Они могут быть вызваны механическими повреждениями мышц, миопатиями и другими заболеваниями, сопровождающимися мышечной атрофией, а также рабдомиолизом. Определение концентрации белков-маркеров, которые высвобождаются в кровоток при повреждении мышечных волокон, является удобным методом диагностики и мониторинга таких патологий. Скелетные тропонины – потенциальные

маркеры дисфункции скелетных мышц, включая различные миопатии, травмы, повреждения, вызванные интенсивной физической нагрузкой, а также могут служить для оценки степени тяжести мышечных дистрофий и определения миотоксичности лекарств.

Структура и свойства тропонинов могут оказывать влияние на их детекцию в крови человека с использованием антител. К основным факторам, способным воздействовать на иммунохимическую детекцию данных белков в клинических образцах, можно отнести сходство аминокислотных последовательностей скелетных и сердечной изоформ ТнИ и ТнТ, альтернативный сплайсинг ТнТ, посттрансляционные модификации (фосфорилирование и глутатионилирование), протеолиз, экранирование эпитопов на поверхности ТнИ и ТнТ в составе тропонинового комплекса, а также связывание аутоантител. В связи с этим необходим тщательный отбор моноклональных антител для разработки иммунных анализов для достоверного количественного измерения уровней скелетных тропонинов.

Определённые мутации в скелетных тропонинах связаны с развитием артрогрипоза и конгенитальных миопатий. Кроме того, данные белки могут быть использованы в качестве мишеней для лечения таких заболеваний, как моторные нейропатии и миастения гравис.

Вклад авторов. А.П. Богомолова, И.А. Катруха – сбор и анализ данных, подготовка иллюстраций, написание основного текста рукописи, редактирование рукописи; И.А. Катруха – разработка концепции и руководство работой.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо проведённых авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yin, L., Li, N., Jia, W., Wang, N., Liang, M., Yang, X., and Du, G. (2021) Skeletal muscle atrophy: from mechanisms to treatments, *Pharmacol. Res.*, **172**, 105807, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105807>.
2. Janssen, I., Heymsfield, S. B., Wang, Z. M., and Ross, R. (2000) Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr, *J. Appl. Physiol.*, **89**, 81-88, <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.1.81>.
3. Kasper, C. E., Talbot, L. A., and Gaines, J. M. (2002) Skeletal muscle damage and recovery, *AACN Clin. Issues*, **13**, 237-247, <https://doi.org/10.1097/00044067-200205000-00009>.
4. Nagy, H., and Veerapaneni, K. D. (2023) Myopathy, in *StatPearls*, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL).
5. Nance, J. R., and Mammen, A. L. (2015) Diagnostic evaluation of rhabdomyolysis, *Muscle Nerve*, **51**, 793-810, <https://doi.org/10.1002/mus.24606>.
6. Cassandrini, D., Trovato, R., Rubegni, A., Lenzi, S., Fiorillo, C., Baldacci, J., Minetti, C., Astrea, G., Bruno, C., and Santorelli, F. M. (2017) Congenital myopathies: clinical phenotypes and new diagnostic tools, *Ital. J. Pediatr.*, **43**, 101, <https://doi.org/10.1186/s13052-017-0419-z>.

7. Ahmed, S. T., Craven, L., Russell, O. M., Turnbull, D. M., and Vincent, A. E. (2018) Diagnosis and treatment of mitochondrial myopathies, *Neurotherapeutics*, **15**, 943-953, <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00674-4>.
8. Cohen, B. H. (2019) Mitochondrial and metabolic myopathies, *Continuum*, **25**, 1732-1766, <https://doi.org/10.1212/con.0000000000000805>.
9. Burch, P. M., Pogoryelova, O., Goldstein, R., Bennett, D., Guglieri, M., Straub, V., Bushby, K., Lochmüller, H., and Morris, C. (2015) Muscle-derived proteins as serum biomarkers for monitoring disease progression in three forms of muscular dystrophy, *J. Neuromuscul. Dis.*, **2**, 241-255, <https://doi.org/10.3233/jnd-140066>.
10. Dalakas, M. C. (2015) Inflammatory muscle diseases, *N. Engl. J. Med.*, **372**, 1734-1747, <https://doi.org/10.1056/NEJMra1402225>.
11. Crum-Cianflone, N. F. (2008) Bacterial, fungal, parasitic, and viral myositis, *Clin. Microbiol. Rev.*, **21**, 473-494, <https://doi.org/10.1128/cmr.00001-08>.
12. Torres, P. A., Helmstetter, J. A., Kaye, A. M., and Kaye, A. D. (2015) Rhabdomyolysis: pathogenesis, diagnosis, and treatment, *Ochsner. J.*, **15**, 58-69.
13. Du Souich, P., Roederer, G., and Dufour, R. (2017) Myotoxicity of statins: Mechanism of action, *Pharmacol Ther.*, **175**, 1-16, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.029>.
14. Khan, F. Y. (2009) Rhabdomyolysis: a review of the literature, *Neth. J. Med.*, **67**, 272-283.
15. Fanzani, A., Conraads, V. M., Penna, F., and Martinet, W. (2012) Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, **3**, 163-179, <https://doi.org/10.1007/s13539-012-0074-6>.
16. Jasuja, R., and LeBrasseur, N. K. (2014) Regenerating skeletal muscle in the face of aging and disease, *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, **93**, S88-96, <https://doi.org/10.1097/phm.0000000000000118>.
17. Sinclair, A. J., Abdelhafiz, A. H., and Rodríguez-Mañas, L. (2017) Frailty and sarcopenia - newly emerging and high impact complications of diabetes, *J. Diabetes Complications*, **31**, 1465-1473, <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2017.05.003>.
18. Jang, H. C. (2019) Diabetes and muscle dysfunction in older adults, *Ann. Geriatr. Med. Res.*, **23**, 160-164, <https://doi.org/10.4235/agmr.19.0038>.
19. Cleasby, M. E., Jamieson, P. M., and Atherton, P. J. (2016) Insulin resistance and sarcopenia: mechanistic links between common co-morbidities, *J. Endocrinol.*, **229**, R67-81, <https://doi.org/10.1530/joe-15-0533>.
20. Schiaffino, S., and Reggiani, C. (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle, *J. Appl. Physiol.*, **77**, 493-501, <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.2.493>.
21. Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles, *Physiol. Rev.*, **91**, 1447-1531, <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>.
22. Murgia, M., Toniolo, L., Nagaraj, N., Ciciliot, S., Vindigni, V., Schiaffino, S., Reggiani, C., and Mann, M. (2017) Single muscle fiber proteomics reveals fiber-type-specific features of human muscle aging, *Cell Rep.*, **19**, 2396-2409, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.054>.
23. Murgia, M., Nogara, L., Baraldo, M., Reggiani, C., Mann, M., and Schiaffino, S. (2021) Protein profile of fiber types in human skeletal muscle: a single-fiber proteomics study, *Skelet. Muscle*, **11**, 24, <https://doi.org/10.1186/s13395-021-00279-0>.
24. Westwood, F. R., Bigley, A., Randall, K., Marsden, A. M., and Scott, R. C. (2005) Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fibre selectivity, *Toxicol. Pathol.*, **33**, 246-257, <https://doi.org/10.1080/01926230590908213>.
25. Bodié, K., Buck, W. R., Pieh, J., Liguori, M. J., and Popp, A. (2016) Biomarker evaluation of skeletal muscle toxicity following clofibrate administration in rats, *Exp. Toxicol. Pathol.*, **68**, 289-299, <https://doi.org/10.1016/j.etp.2016.03.001>.
26. Sorichter, S., Mair, J., Koller, A., Gebert, W., Rama, D., Calzolari, C., Artner-Dworzak, E., and Puschendorf, B. (1997) Skeletal troponin I as a marker of exercise-induced muscle damage, *J. Appl. Physiol.*, **83**, 1076-1082, <https://doi.org/10.1152/jappl.1997.83.4.1076>.
27. Ciciliot, S., Rossi, A. C., Dyar, K. A., Blaauw, B., and Schiaffino, S. (2013) Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **45**, 2191-2199, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.016>.
28. Zimowska, M., Kasprzycka, P., Bocian, K., Delaney, K., Jung, P., Kuchcinska, K., Kaczmarek, K., Gladysz, D., Streminska, W., and Ciemerych, M. A. (2017) Inflammatory response during slow- and fast-twitch muscle regeneration, *Muscle Nerve*, **55**, 400-409, <https://doi.org/10.1002/mus.25246>.
29. Tosato, M., Marzetti, E., Cesari, M., Saveria, G., Miller, R. R., Bernabei, R., Landi, F., and Calvani, R. (2017) Measurement of muscle mass in sarcopenia: from imaging to biochemical markers, *Aging Clin. Exp. Res.*, **29**, 19-27, <https://doi.org/10.1007/s40520-016-0717-0>.
30. Mercuri, E., Clements, E., Offiah, A., Pichiecchio, A., Vasco, G., Bianco, F., Berardinelli, A., Manzur, A., Pane, M., Messina, S., Gualandi, F., Ricci, E., Rutherford, M., and Muntoni, F. (2010) Muscle magnetic resonance imaging

- involvement in muscular dystrophies with rigidity of the spine, *Ann. Neurol.*, **67**, 201-208, <https://doi.org/10.1002/ana.21846>.
31. Van De Vlekkert, J., Maas, M., Hoogendijk, J. E., De Visser, M., and Van Schaik, I. N. (2015) Combining MRI and muscle biopsy improves diagnostic accuracy in subacute-onset idiopathic inflammatory myopathy, *Muscle Nerve*, **51**, 253-258, <https://doi.org/10.1002/mus.24307>.
 32. Willcocks, R. J., Rooney, W. D., Triplett, W. T., Forbes, S. C., Lott, D. J., Senesac, C. R., Daniels, M. J., Wang, D. J., Harrington, A. T., Tennekoon, G. I., Russman, B. S., Finanger, E. L., Byrne, B. J., Finkel, R. S., Walter, G. A., Sweeney, H. L., and Vandenborne, K. (2016) Multicenter prospective longitudinal study of magnetic resonance biomarkers in a large duchenne muscular dystrophy cohort, *Ann. Neurol.*, **79**, 535-547, <https://doi.org/10.1002/ana.24599>.
 33. Burakiewicz, J., Sinclair, C. D. J., Fischer, D., Walter, G. A., Kan, H. E., and Hollingsworth, K. G. (2017) Quantifying fat replacement of muscle by quantitative MRI in muscular dystrophy, *J. Neurol.*, **264**, 2053-2067, <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8547-3>.
 34. Krššák, M., Lindeboom, L., Schrauwen-Hinderling, V., Szczepaniak, L. S., Derave, W., Lundbom, J., Befroy, D., Schick, F., Machann, J., Kreis, R., and Boesch, C. (2021) Proton magnetic resonance spectroscopy in skeletal muscle: experts' consensus recommendations, *NMR Biomed.*, **34**, e4266, <https://doi.org/10.1002/nbm.4266>.
 35. Brancaccio, P., Lippi, G., and Maffulli, N. (2010) Biochemical markers of muscular damage, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **48**, 757-767, <https://doi.org/10.1515/cclm.2010.179>.
 36. Goldstein, R. A. (2017) Skeletal muscle injury biomarkers: assay qualification efforts and translation to the clinic, *Toxicol. Pathol.*, **45**, 943-951, <https://doi.org/10.1177/0192623317738927>.
 37. Burch, P. M., Greg Hall, D., Walker, E. G., Bracken, W., Giovanelli, R., Goldstein, R., Higgs, R. E., King, N. M., Lane, P., Sauer, J. M., Michna, L., Muniappa, N., Pritt, M. L., Vlasakova, K., Watson, D. E., Wescott, D., Zabka, T. S., and Glaab, W. E. (2016) Evaluation of the relative performance of drug-induced skeletal muscle injury biomarkers in rats, *Toxicol. Sci.*, **150**, 247-256, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv328>.
 38. Katrukha, I. A. (2013) Human cardiac troponin complex. Structure and functions, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1447-1465, <https://doi.org/10.1134/S0006297913130063>.
 39. Sheng, J. J., and Jin, J. P. (2016) TNNI1, TNNI2 and TNNI3: evolution, regulation, and protein structure-function relationships, *Gene*, **576**, 385-394, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.052>.
 40. Dhoot, G. K., and Perry, S. V. (1979) Distribution of polymorphic forms of troponin components and tropomyosin in skeletal muscle, *Nature*, **278**, 714-718, <https://doi.org/10.1038/278714a0>.
 41. Sasse, S., Brand, N. J., Kyprianou, P., Dhoot, G. K., Wade, R., Arai, M., Periasamy, M., Yacoub, M. H., and Barton, P. J. (1993) Troponin I gene expression during human cardiac development and in end-stage heart failure, *Circ. Res.*, **72**, 932-938, <https://doi.org/10.1161/01.res.72.5.932>.
 42. Bodor, G. S., Porterfield, D., Voss, E. M., Smith, S., and Apple, F. S. (1995) Cardiac troponin-I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue, *Clin. Chem.*, **41**, 1710-1715.
 43. Dellow, K. A., Bhavsar, P. K., Brand, N. J., and Barton, P. J. (2001) Identification of novel, cardiac-restricted transcription factors binding to a CACC-box within the human cardiac troponin I promoter, *Cardiovasc. Res.*, **50**, 24-33, [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(01\)00204-8](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00204-8).
 44. Filatov, V. L., Katrukha, A. G., Bulargina, T. V., and Gusev, N. B. (1999) Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 969-985.
 45. Gomes, A. V., Potter, J. D., and Szczesna-Cordary, D. (2002) The role of troponins in muscle contraction, *IUBMB Life*, **54**, 323-333, <https://doi.org/10.1080/15216540216037>.
 46. Vinogradova, M. V., Stone, D. B., Malanina, G. G., Karatzaferi, C., Cooke, R., Mendelson, R. A., and Fletterick, R. J. (2005) Ca²⁺-regulated structural changes in troponin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5038-5043, <https://doi.org/10.1073/pnas.0408882102>.
 47. Takeda, S., Yamashita, A., Maeda, K., and Maéda, Y. (2003) Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca²⁺-saturated form, *Nature*, **424**, 35-41, <https://doi.org/10.1038/nature01780>.
 48. Howarth, J. W., Meller, J., Solaro, R. J., Trewhella, J., and Rosevear, P. R. (2007) Phosphorylation-dependent conformational transition of the cardiac specific N-extension of troponin I in cardiac troponin, *J. Mol. Biol.*, **373**, 706-722, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.08.035>.
 49. Blumenschein, T. M., Stone, D. B., Fletterick, R. J., Mendelson, R. A., and Sykes, B. D. (2006) Dynamics of the C-terminal region of TnI in the troponin complex in solution, *Biophys. J.*, **90**, 2436-2444, <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.076216>.
 50. Julien, O., Mercier, P., Allen, C. N., Fisette, O., Ramos, C. H., Lague, P., Blumenschein, T. M., and Sykes, B. D. (2011) Is there nascent structure in the intrinsically disordered region of troponin I? *Proteins*, **79**, 1240-1250, <https://doi.org/10.1002/prot.22959>.

51. King, W. A., Stone, D. B., Timmins, P. A., Narayanan, T., von Brasch, A. A., Mendelson, R. A., and Curmi, P. M. (2005) Solution structure of the chicken skeletal muscle troponin complex via small-angle neutron and X-ray scattering, *J. Mol. Biol.*, **45**, 797-815, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.090>.
52. Murakami, K., Yumoto, F., Ohki, S. Y., Yasunaga, T., Tanokura, M., and Wakabayashi, T. (2005) Structural basis for Ca^{2+} -regulated muscle relaxation at interaction sites of troponin with actin and tropomyosin, *J. Mol. Biol.*, **352**, 178-201, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.067>.
53. Wang, H., Chalovich, J. M., and Marriott, G. (2012) Structural dynamics of troponin I during Ca^{2+} -activation of cardiac thin filaments: a multi-site Förster resonance energy transfer study, *PLoS One*, **7**, e50420, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050420>.
54. Zhou, Z., Li, K. L., Rieck, D., Ouyang, Y., Chandra, M., and Dong, W. J. (2012) Structural dynamics of C-domain of cardiac troponin I protein in reconstituted thin filament, *J. Biol. Chem.*, **87**, 7661-7674, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.281600>.
55. Galinska-Rakoczy, A., Engel, P., Xu, C., Jung, H., Craig, R., Tobacman, L. S., and Lehman, W. (2008) Structural basis for the regulation of muscle contraction by troponin and tropomyosin, *J. Mol. Biol.*, **379**, 929-935, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.04.062>.
56. Galinska, A., Hatch, V., Craig, R., Murphy, A. M., Van Eyk, J. E., Wang, C. L., Lehman, W., and Foster, D. B. (2010) The C terminus of cardiac troponin I stabilizes the Ca^{2+} -activated state of tropomyosin on actin filaments, *Circ. Res.*, **106**, 705-711, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.210047>.
57. Saggin, L., Gorza, L., Ausoni, S., and Schiaffino, S. (1990) Cardiac troponin T in developing, regenerating and denervated rat skeletal muscle, *Development*, **110**, 547-554, <https://doi.org/10.1242/dev.110.2.547>.
58. Anderson, P. A., Malouf, N. N., Oakeley, A. E., Pagani, E. D., and Allen, P. D. (1991) Troponin T isoform expression in humans. A comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle, *Circ. Res.*, **69**, 1226-1233, <https://doi.org/10.1161/01.res.69.5.1226>.
59. Perry, S. V. (1998) Troponin T: genetics, properties and function, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **19**, 575-602, <https://doi.org/10.1023/a:1005397501968>.
60. Jin, J. P., and Chong, S. M. (2010) Localization of the two tropomyosin-binding sites of troponin T, *Arch. Biochem. Biophys.*, **500**, 144-150, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.001>.
61. Wei, B., and Jin, J. P. (2016) TNNT1, TNNT2, and TNNT3: isoform genes, regulation, and structure-function relationships, *Gene*, **582**, 1-13, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.01.006>.
62. Marston, S., and Zamora, J. E. (2020) Troponin structure and function: a view of recent progress, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **41**, 71-89, <https://doi.org/10.1007/s10974-019-09513-1>.
63. Morris, E. P., and Lehrer, S. S. (1984) Troponin-tropomyosin interactions. Fluorescence studies of the binding of troponin, troponin T, and chymotryptic troponin T fragments to specifically labeled tropomyosin, *Biochemistry*, **23**, 2214-2220, <https://doi.org/10.1021/bi00305a018>.
64. Tanokura, M., Tawada, Y., Ono, A., and Ohtsuki, I. (1983) Chymotryptic subfragments of troponin T from rabbit skeletal muscle. Interaction with tropomyosin, troponin I and troponin C, *J. Biochem.*, **93**, 331-337, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134185>.
65. Franklin, A. J., Baxley, T., Kobayashi, T., and Chalovich, J. M. (2012) The C-terminus of troponin T is essential for maintaining the inactive state of regulated actin, *Biophys. J.*, **102**, 2536-2544, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.037>.
66. Oda, T., Yanagisawa, H., and Wakabayashi, T. (2020) Cryo-EM structures of cardiac thin filaments reveal the 3D architecture of troponin, *J. Struct. Biol.*, **209**, 107450, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107450>.
67. Yamada, Y., Namba, K., and Fujii, T. (2020) Cardiac muscle thin filament structures reveal calcium regulatory mechanism, *Nat. Commun.*, **11**, 153, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14008-1>.
68. Risi, C. M., Pepper, I., Belknap, B., Landim-Vieira, M., White, H. D., Dryden, K., Pinto, J. R., Chase, P. B., and Galkin, V. E. (2021) The structure of the native cardiac thin filament at systolic Ca^{2+} levels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, <https://doi.org/10.1073/pnas.2024288118>.
69. Wang, Z., Grange, M., Pospich, S., Wagner, T., Kho, A. L., Gautel, M., and Raunser, S. (2022) Structures from intact myofibrils reveal mechanism of thin filament regulation through nebulin, *Science*, **375**, eabn1934, <https://doi.org/10.1126/science.abn1934>.
70. Briggs, M. M., Maready, M., Schmidt, J. M., and Schachat, F. (1994) Identification of a fetal exon in the human fast troponin T gene, *FEBS Lett.*, **350**, 37-40, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00729-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00729-2).
71. Wilkinson, J. M., Moir, A. J., and Waterfield, M. D. (1984) The expression of multiple forms of troponin T in chicken-fast-skeletal muscle may result from differential splicing of a single gene, *Eur. J. Biochem.*, **143**, 47-56, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08337.x>.
72. Briggs, M. M., and Schachat, F. (1993) Origin of fetal troponin T: developmentally regulated splicing of a new exon in the fast troponin T gene, *Dev. Biol.*, **158**, 503-509, <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1208>.

73. Medford, R. M., Nguyen, H. T., Destree, A. T., Summers, E., and Nadal-Ginard, B. (1984) A novel mechanism of alternative RNA splicing for the developmentally regulated generation of troponin T isoforms from a single gene, *Cell*, **38**, 409-421, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90496-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90496-3).
74. Wang, J., and Jin, J. P. (1997) Primary structure and developmental acidic to basic transition of 13 alternatively spliced mouse fast skeletal muscle troponin T isoforms, *Gene*, **193**, 105-114, [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00100-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00100-5).
75. Wang, J., and Jin, J. P. (1998) Conformational modulation of troponin T by configuration of the NH₂-terminal variable region and functional effects, *Biochemistry*, **37**, 14519-14528, <https://doi.org/10.1021/bi9812322>.
76. Moore, G. E., Briggs, M. M., and Schachat, F. H. (1987) Patterns of troponin T expression in mammalian fast, slow and promiscuous muscle fibres, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **8**, 13-22, <https://doi.org/10.1007/BF01767260>.
77. Briggs, M. M., McGinnis, H. D., and Schachat, F. (1990) Transitions from fetal to fast troponin T isoforms are coordinated with changes in tropomyosin and alpha-actinin isoforms in developing rabbit skeletal muscle, *Dev. Biol.*, **140**, 253-260, [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(90\)90075-t](https://doi.org/10.1016/0012-1606(90)90075-t).
78. Melby, J. A., Jin, Y., Lin, Z., Tucholski, T., Wu, Z., Gregorich, Z. R., Diffey, G. M., and Ge, Y. (2020) Top-down proteomics reveals myofilament proteoform heterogeneity among various rat skeletal muscle tissues, *J. Proteome Res.*, **19**, 446-454, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00623>.
79. Jin, Y., Diffey, G. M., Colman, R. J., Anderson, R. M., and Ge, Y. (2019) Top-down mass spectrometry of sarcomeric protein post-translational modifications from non-human primate skeletal muscle, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **30**, 2460-2469, <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02139-0>.
80. Chen, Y. C., Sumandea, M. P., Larsson, L., Moss, R. L., and Ge, Y. (2015) Dissecting human skeletal muscle troponin proteoforms by top-down mass spectrometry, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **36**, 169-181, <https://doi.org/10.1007/s10974-015-9404-6>.
81. Jin, J. P., Chen, A., and Huang, Q. Q. (1998) Three alternatively spliced mouse slow skeletal muscle troponin T isoforms: conserved primary structure and regulated expression during postnatal development, *Gene*, **214**, 121-129, [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00214-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00214-5).
82. Huang, Q. Q., Chen, A., and Jin, J. P. (1999) Genomic sequence and structural organization of mouse slow skeletal muscle troponin T gene, *Gene*, **229**, 1-10, [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00051-7](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00051-7).
83. Gahlmann, R., Troutt, A. B., Wade, R. P., Gunning, P., and Kedes, L. (1987) Alternative splicing generates variants in important functional domains of human slow skeletal troponin T, *J. Biol. Chem.*, **262**, 16122-16126.
84. Samson, F., Mesnard, L., Mihovilovic, M., Potter, T. G., Mercadier, J. J., Roses, A. D., and Gilbert, J. R. (1994) A new human slow skeletal troponin T (TnTs) mRNA isoform derived from alternative splicing of a single gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 841-847, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994>.
85. Gahlmann, R., Wade, R., Gunning, P., and Kedes, L. (1988) Differential expression of slow and fast skeletal muscle troponin C. Slow skeletal muscle troponin C is expressed in human fibroblasts, *J. Mol. Biol.*, **201**, 379-391, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90145-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90145-3).
86. Houdusse, A., Love, M. L., Dominguez, R., Grabarek, Z., and Cohen, C. (1997) Structures of four Ca²⁺-bound troponin C at 2.0 Å resolution: further insights into the Ca²⁺-switch in the calmodulin superfamily, *Structure*, **5**, 1695-1711, [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(97\)00315-8](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(97)00315-8).
87. Mercier, P., Ferguson, R. E., Irving, M., Corrie, J. E., Trentham, D. R., and Sykes, B. D. (2003) NMR structure of a bifunctional rhodamine labeled N-domain of troponin C complexed with the regulatory "switch" peptide from troponin I: implications for in situ fluorescence studies in muscle fibers, *Biochemistry*, **42**, 4333-4348, <https://doi.org/10.1021/bi027041n>.
88. Potter, J. D., and Gergely, J. (1974) Troponin, tropomyosin, and actin interactions in the Ca²⁺ regulation of muscle contraction, *Biochemistry*, **13**, 2697-2703, <https://doi.org/10.1021/bi00710a007>.
89. Sia, S. K., Li, M. X., Spyropoulos, L., Gagné, S. M., Liu, W., Putkey, J. A., and Sykes, B. D. (1997) Structure of cardiac muscle troponin C unexpectedly reveals a closed regulatory domain, *J. Biol. Chem.*, **272**, 18216-18221, <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.18216>.
90. Morimoto, S., Harada, K., and Ohtsuki, I. (1999) Roles of troponin isoforms in pH dependence of contraction in rabbit fast and slow skeletal and cardiac muscles, *J. Biochem.*, **126**, 121-129, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022412>.
91. Brotto, M. A., Biesiadecki, B. J., Brotto, L. S., Nosek, T. M., and Jin, J. P. (2006) Coupled expression of troponin T and troponin I isoforms in single skeletal muscle fibers correlates with contractility, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **290**, C567-576, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00422.2005>.
92. Piroddi, N., Tesi, C., Pellegrino, M. A., Tobacman, L. S., Homsher, E., and Poggesi, C. (2003) Contractile effects of the exchange of cardiac troponin for fast skeletal troponin in rabbit psoas single myofibrils, *J. Physiol.*, **552**, 917-931, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.051615>.

93. Yan, G. X., and Kleber, A. G. (1992) Changes in extracellular and intracellular pH in ischemic rabbit papillary muscle, *Circ. Res.*, **71**, 460-470, <https://doi.org/10.1161/01.res.71.2.460>.
94. Jennings, R. B., and Reimer, K. A. (1991) The cell biology of acute myocardial ischemia, *Annu. Rev. Med.*, **42**, 225-246, <https://doi.org/10.1146/annurev.me.42.020191.001301>.
95. Sahlin, K., Harris, R. C., Nylinde, B., and Hultman, E. (1976) Lactate content and pH in muscle obtained after dynamic exercise, *Pflugers Arch.*, **367**, 143-149, <https://doi.org/10.1007/bf00585150>.
96. Bangsbo, J., Madsen, K., Kiens, B., and Richter, E. A. (1996) Effect of muscle acidity on muscle metabolism and fatigue during intense exercise in man, *J. Physiol.*, **495 (Pt 2)**, 587-596, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021618>.
97. Allen, D. G., Lamb, G. D., and Westerblad, H. (2008) Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms, *Physiol. Rev.*, **88**, 287-332, <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2007>.
98. Donaldson, S. K., Hermansen, L., and Bolles, L. (1978) Differential, direct effects of H⁺ on Ca²⁺-activated force of skinned fibers from the soleus, cardiac and adductor magnus muscles of rabbits, *Pflugers Arch.*, **376**, 55-65, <https://doi.org/10.1007/bf00585248>.
99. Metzger, J. M., Parmacek, M. S., Barr, E., Pasyk, K., Lin, W. I., Cochrane, K. L., Field, L. J., and Leiden, J. M. (1993) Skeletal troponin C reduces contractile sensitivity to acidosis in cardiac myocytes from transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9036-9040, <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.9036>.
100. Metzger, J. M. (1996) Effects of troponin C isoforms on pH sensitivity of contraction in mammalian fast and slow skeletal muscle fibres, *J. Physiol.*, **492 (Pt 1)**, 163-172, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021298>.
101. Solaro, R. J., Kumar, P., Blanchard, E. M., and Martin, A. F. (1986) Differential effects of pH on calcium activation of myofilaments of adult and perinatal dog hearts. Evidence for developmental differences in thin filament regulation, *Circ. Res.*, **58**, 721-729, <https://doi.org/10.1161/01.res.58.5.721>.
102. Wolska, B. M., Vijayan, K., Arteaga, G. M., Konhilas, J. P., Phillips, R. M., Kim, R., Naya, T., Leiden, J. M., Martin, A. F., de Tombe, P. P., and Solaro, R. J. (2001) Expression of slow skeletal troponin I in adult transgenic mouse heart muscle reduces the force decline observed during acidic conditions, *J. Physiol.*, **536**, 863-870, <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00863.x>.
103. Robertson, I. M., Holmes, P. C., Li, M. X., Pineda-Sanabria, S. E., Baryshnikova, O. K., and Sykes, B. D. (2012) Elucidation of isoform-dependent pH sensitivity of troponin i by NMR spectroscopy, *J. Biol. Chem.*, **287**, 4996-5007, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.301499>.
104. Pineda-Sanabria, S. E., Robertson, I. M., Li, M. X., and Sykes, B. D. (2013) Interaction between the regulatory domain of cardiac troponin C and the acidosis-resistant cardiac troponin I A162H, *Cardiovasc. Res.*, **97**, 481-489, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs348>.
105. Robertson, I. M., Pineda-Sanabria, S. E., Holmes, P. C., and Sykes, B. D. (2014) Conformation of the critical pH sensitive region of troponin depends upon a single residue in troponin I, *Arch. Biochem. Biophys.*, **552-553**, 40-49, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.12.003>.
106. Pineda-Sanabria, S. E., Robertson, I. M., and Sykes, B. D. (2015) Structure and dynamics of the acidosis-resistant A162H mutant of the switch region of troponin I bound to the regulatory domain of troponin C, *Biochemistry*, **54**, 3583-3593, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00178>.
107. Ogut, O., and Jin, J. P. (1998) Developmentally regulated, alternative RNA splicing-generated pectoral muscle-specific troponin T isoforms and role of the NH2-terminal hypervariable region in the tolerance to acidosis, *J. Biol. Chem.*, **273**, 27858-27866, <https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.27858>.
108. Ogut, O., Granzier, H., and Jin, J. P. (1999) Acidic and basic troponin T isoforms in mature fast-twitch skeletal muscle and effect on contractility, *Am. J. Physiol.*, **276**, C1162-1170, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.5.C1162>.
109. Nosek, T. M., Brotto, M. A., and Jin, J. P. (2004) Troponin T isoforms alter the tolerance of transgenic mouse cardiac muscle to acidosis, *Arch. Biochem. Biophys.*, **430**, 178-184, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.07.014>.
110. Shen, J., Li, Y., Gu, H., Xia, F., and Zuo, X. (2014) Recent development of sandwich assay based on the nanobiotechnologies for proteins, nucleic acids, small molecules, and ions, *Chem. Rev.*, **114**, 7631-7677, <https://doi.org/10.1021/cr300248x>.
111. Larue, C., Defacque-Lacquement, H., Calzolari, C., Le Nguyen, D., and Pau, B. (1992) New monoclonal antibodies as probes for human cardiac troponin I: epitopic analysis with synthetic peptides, *Mol. Immunol.*, **29**, 271-278, [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(92\)90109-b](https://doi.org/10.1016/0161-5890(92)90109-b).
112. Larue, C., Calzolari, C., Bertinchant, J. P., Leclercq, F., Grolleau, R., and Pau, B. (1993) Cardiac-specific immunoassay of troponin I in the early phase of acute myocardial infarction, *Clin. Chem.*, **39**, 972-979.
113. Rama, D., Margaritis, I., Orsetti, A., Marconnet, P., Gros, P., Larue, C., Trinquier, S., Pau, B., and Calzolari, C. (1996) Troponin I immunoassays for detection of muscle damage applied to monitoring a triathlon, *Clin. Chem.*, **42**, 2033-2035.

114. Onuoha, G. N., Alpar, E. K., Dean, B., Tidman, J., Rama, D., Laprade, M., and Pau, B. (2001) Skeletal troponin-I release in orthopedic and soft tissue injuries, *J. Orthop. Sci.*, **6**, 11-15, <https://doi.org/10.1007/s007760170018>.
115. Bamberg, K., Mehtälä, L., Arola, O., Laitinen, S., Nordling, P., Strandberg, M., Strandberg, N., Paltta, J., Mali, M., Espinosa-Ortega, F., Pirilä, L., Lundberg, I. E., Savukoski, T., and Pettersson, K. (2020) Evaluation of a new skeletal troponin I assay in patients with idiopathic inflammatory myopathies, *J. Appl. Lab. Med.*, **5**, 320-331, <https://doi.org/10.1093/jalm/jfz016>.
116. Sun, D., Hamlin, D., Butterfield, A., Watson, D. E., and Smith, H. W. (2010) Electrochemiluminescent immunoassay for rat skeletal troponin I (Tnni2) in serum, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **61**, 52-58, <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2009.09.002>.
117. Simpson, J. A., Labugger, R., Hesketh, G. G., D'Arsigny, C., O'Donnell, D., Matsumoto, N., Collier, C. P., Iscoe, S., and Van Eyk, J. E. (2002) Differential detection of skeletal troponin I isoforms in serum of a patient with rhabdomyolysis: markers of muscle injury? *Clin. Chem.*, **48**, 1112-1114.
118. Simpson, J. A., Labugger, R., Collier, C., Brison, R. J., Iscoe, S., and Van Eyk, J. E. (2005) Fast and slow skeletal troponin I in serum from patients with various skeletal muscle disorders: a pilot study, *Clin. Chem.*, **51**, 966-972, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.042671>.
119. Takahashi, M., Lee, L., Shi, Q., Gawad, Y., and Jackowski, G. (1996) Use of enzyme immunoassay for measurement of skeletal troponin-I utilizing isoform-specific monoclonal antibodies, *Clin. Biochem.*, **29**, 301-308, [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(96\)00016-1](https://doi.org/10.1016/0009-9120(96)00016-1).
120. Sorichter, S., Mair, J., Koller, A., Calzolari, C., Huonker, M., Pau, B., and Puschendorf, B. (2001) Release of muscle proteins after downhill running in male and female subjects, *Scand. J. Med. Sci. Sports*, **11**, 28-32, <https://doi.org/10.1034/j.1600-0838.2001.011001028.x>.
121. Chapman, D. W., Simpson, J. A., Iscoe, S., Robins, T., and Nosaka, K. (2013) Changes in serum fast and slow skeletal troponin I concentration following maximal eccentric contractions, *J. Sci. Med. Sport*, **16**, 82-85, <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2012.05.006>.
122. Chen, T. C., Liu, H. W., Russell, A., Barthel, B. L., Tseng, K. W., Huang, M. J., Chou, T. Y., and Nosaka, K. (2020) Large increases in plasma fast skeletal muscle troponin I after whole-body eccentric exercises, *J. Sci. Med. Sport*, **23**, 776-781, <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2020.01.011>.
123. Kiely, P. D., Bruckner, F. E., Nisbet, J. A., and Daghir, A. (2000) Serum skeletal troponin I in inflammatory muscle disease: relation to creatine kinase, CKMB and cardiac troponin I, *Ann. Rheum. Dis.*, **59**, 750-751, <https://doi.org/10.1136/ard.59.9.750>.
124. Vassallo, J. D., Janovitz, E. B., Wescott, D. M., Chadwick, C., Lowe-Krentz, L. J., and Lehman-McKeeman, L. D. (2009) Biomarkers of drug-induced skeletal muscle injury in the rat: troponin I and myoglobin, *Toxicol. Sci.*, **111**, 402-412, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp166>.
125. Tonomura, Y., Matsushima, S., Kashiwagi, E., Fujisawa, K., Takagi, S., Nishimura, Y., Fukushima, R., Torii, M., and Matsubara, M. (2012) Biomarker panel of cardiac and skeletal muscle troponins, fatty acid binding protein 3 and myosin light chain 3 for the accurate diagnosis of cardiotoxicity and musculoskeletal toxicity in rats, *Toxicology*, **302**, 179-189, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.07.012>.
126. Madden, L., Juhas, M., Kraus, W. E., Truskey, G. A., and Bursac, N. (2015) Bioengineered human myobundles mimic clinical responses of skeletal muscle to drugs, *Elife*, **4**, e04885, <https://doi.org/10.7554/eLife.04885>.
127. Khodabukus, A., Kaza, A., Wang, J., Prabhu, N., Goldstein, R., Vaidya, V. S., and Bursac, N. (2020) Tissue-engineered human myobundle system as a platform for evaluation of skeletal muscle injury biomarkers, *Toxicol. Sci.*, **176**, 124-136, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa049>.
128. Barthel, B. L., Cox, D., Barbieri, M., Ziemba, M., Straub, V., Hoffman, E. P., and Russell, A. J. (2021) Elevation of fast but not slow troponin I in the circulation of patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy, *Muscle Nerve*, **64**, 43-49, <https://doi.org/10.1002/mus.27222>.
129. Traa, W. A., Strijkers, G. J., Bader, D. L., and Oomens, C. W. J. (2019) Myoglobin and troponin concentrations are increased in early stage deep tissue injury, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **92**, 50-57, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.12.026>.
130. Perry, S. V., and Cole, H. A. (1974) Phosphorylation of troponin and the effects of interactions between the components of the complex, *Biochem. J.*, **141**, 733-743, <https://doi.org/10.1042/bj1410733>.
131. Moir, A. J., Wilkinson, J. M., and Perry, S. V. (1974) The phosphorylation sites of troponin I from white skeletal muscle of the rabbit, *FEBS Lett.*, **42**, 253-256, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)80739-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80739-8).
132. Moir, A. J., Cole, H. A., and Perry, S. V. (1977) The phosphorylation sites of troponin T from white skeletal muscle and the effects of interaction with troponin C on their phosphorylation by phosphorylase kinase, *Biochem. J.*, **161**, 371-382, <https://doi.org/10.1042/bj1610371>.

133. Mazzei, G. J., and Kuo, J. F. (1984) Phosphorylation of skeletal-muscle troponin I and troponin T by phospholipid-sensitive Ca^{2+} -dependent protein kinase and its inhibition by troponin C and tropomyosin, *Biochem. J.*, **218**, 361-369, <https://doi.org/10.1042/bj2180361>.
134. Sancho Solis, R., Ge, Y., and Walker, J. W. (2011) A preferred AMPK phosphorylation site adjacent to the inhibitory loop of cardiac and skeletal troponin I, *Protein Sci.*, **20**, 894-907, <https://doi.org/10.1002/pro.623>.
135. Cole, H. A., and Perry, S. V. (1975) The phosphorylation of troponin I from cardiac muscle, *Biochem. J.*, **149**, 525-533, <https://doi.org/10.1042/bj1490525>.
136. Gusev, N. B., Dobrovolskii, A. B., and Severin, S. E. (1978) Skeletal muscle troponin and phosphorylation: a site of troponin T, that is phosphorylated by specific protein kinase [in Russian], *Biokhimiia*, **43**, 365-372.
137. Risnik, V. V., Dobrovolskii, A. B., Gusev, N. B., and Severin, S. E. (1980) Phosphorylase kinase phosphorylation of skeletal-muscle troponin T, *Biochem. J.*, **191**, 851-854, <https://doi.org/10.1042/bj1910851>.
138. Gusev, N. B., Dobrovolskii, A. B., and Severin, S. E. (1980) Isolation and some properties of troponin T kinase from rabbit skeletal muscle, *Biochem J.*, **189**, 219-226, <https://doi.org/10.1042/bj1890219>.
139. Zemskova, M. A., Shur, S. A., Skolysheva, L. K., and Vul'fson, P. L. (1991) Interaction of phosphorylase kinase with thin filament proteins of rabbit skeletal muscles [in Russian], *Biokhimiia*, **56**, 100-108.
140. Katrukha, I. A., and Gusev, N. B. (2013) Enigmas of cardiac troponin T phosphorylation, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **65**, 156-158, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.09.017>.
141. Gusev, N. B., Barskaya, N. V., Verin, A. D., Duzhenkova, I. V., Khuchua, Z. A., and Zheltova, A. O. (1983) Some properties of cardiac troponin T structure, *Biochem. J.*, **213**, 123-129, <https://doi.org/10.1042/bj2130123>.
142. Zhang, J., Guy, M. J., Norman, H. S., Chen, Y. C., Xu, Q., Dong, X., Guner, H., Wang, S., Kohmoto, T., Young, K. H., Moss, R. L., and Ge, Y. (2011) Top-down quantitative proteomics identified phosphorylation of cardiac troponin I as a candidate biomarker for chronic heart failure, *J. Proteome Res.*, **10**, 4054-4065, <https://doi.org/10.1021/pr200258m>.
143. Lamb, G. D., and Westerblad, H. (2011) Acute effects of reactive oxygen and nitrogen species on the contractile function of skeletal muscle, *J. Physiol.*, **589**, 2119-2127, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.199059>.
144. Mollica, J. P., Dutka, T. L., Merry, T. L., Lamboley, C. R., McConell, G. K., McKenna, M. J., Murphy, R. M., and Lamb, G. D. (2012) S-glutathionylation of troponin I (fast) increases contractile apparatus Ca^{2+} sensitivity in fast-twitch muscle fibres of rats and humans, *J. Physiol.*, **590**, 1443-1463, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224535>.
145. Dutka, T. L., Mollica, J. P., Lamboley, C. R., Weerakkody, V. C., Greening, D. W., Posterino, G. S., Murphy, R. M., and Lamb, G. D. (2017) S-nitrosylation and S-glutathionylation of Cys134 on troponin I have opposing competitive actions on Ca^{2+} sensitivity in rat fast-twitch muscle fibers, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **312**, C316-C327, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00334.2016>.
146. Katrukha, A. G., Bereznikova, A. V., Filatov, V. L., Esakova, T. V., Kolosova, O. V., Pettersson, K., Lovgren, T., Bulargina, T. V., Trifonov, I. R., Gratsiansky, N. A., Pulkki, K., Voipio-Pulkki, L. M., and Gusev, N. B. (1998) Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection, *Clin. Chem.*, **44**, 2433-2440.
147. Katrukha, I. A., Kogan, A. E., Vylegzhanina, A. V., Kharitonov, A. V., Tamm, N. N., Filatov, V. L., Bereznikova, A. V., Koshkina, E. V., and Katrukha, A. G. (2018) Full-size cardiac troponin I and its proteolytic fragments in blood of patients with acute myocardial infarction: antibody selection for assay development, *Clin. Chem.*, **64**, 1104-1112, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.286211>.
148. Di Lisa, F., De Tullio, R., Salamino, F., Barbato, R., Melloni, E., Siliprandi, N., Schiaffino, S., and Pontremoli, S. (1995) Specific degradation of troponin T and I by mu-calpain and its modulation by substrate phosphorylation, *Biochem. J.*, **308** (Pt 1), 57-61, <https://doi.org/10.1042/bj3080057>.
149. Wang, W., Schulze, C. J., Suarez-Pinzon, W. L., Dyck, J. R., Sawicki, G., and Schulz, R. (2002) Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury, *Circulation*, **106**, 1543-1549, <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000028818.33488.7b>.
150. Gao, W. D., Atar, D., Liu, Y., Perez, N. G., Murphy, A. M., and Marban, E. (1997) Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium, *Circ. Res.*, **80**, 393-399.
151. Mahmud, Z., Zahran, S., Liu, P. B., Reiz, B., Chan, B. Y. H., Roczkowsky, A., McCartney, C. E., Davies, P. L., Li, L., Schulz, R., and Hwang, P. M. (2019) Structure and proteolytic susceptibility of the inhibitory C-terminal tail of cardiac troponin I, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1863**, 661-671, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.01.008>.
152. Katrukha, I. A., and Katrukha, A. G. (2021) Myocardial injury and the release of troponins I and T in the blood of patients, *Clin. Chem.*, **67**, 124-130, <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa281>.
153. Communal, C., Sumandea, M., de Tombe, P., Narula, J., Solaro, R. J., and Hajjar, R. J. (2002) Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6252-6256, <https://doi.org/10.1073/pnas.092022999>.
154. Zhang, Z., Biesiadecki, B. J., and Jin, J. P. (2006) Selective deletion of the NH2-terminal variable region of cardiac troponin T in ischemia reperfusion by myofibril-associated mu-calpain cleavage, *Biochemistry*, **45**, 11681-11694, <https://doi.org/10.1021/bi060273s>.

155. Katrukha, I. A., Riabkova, N. S., Kogan, A. E., Vylegzhanina, A. V., Mukharyamova, K. S., Bogomolova, A. P., Zabolotskii, A. I., Koshkina, E. V., Bereznikova, A. V., and Katrukha, A. G. (2023) Fragmentation of human cardiac troponin T after acute myocardial infarction, *Clin. Chim. Acta*, **542**, 117281, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117281>.
156. Feng, H. Z., Wang, Q., Reiter, R. S., Lin, J. L., Lin, J. J., and Jin, J. P. (2013) Localization and function of Xina in mouse skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **304**, C1002-1012, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00005.2013>.
157. Katrukha, A. G., Bereznikova, A. V., Esakova, T. V., Pettersson, K., Lovgren, T., Severina, M. E., Pulkki, K., Vuopio-Pulkki, L. M., and Gusev, N. B. (1997) Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex, *Clin. Chem.*, **43**, 1379-1385.
158. Vylegzhanina, A. V., Kogan, A. E., Katrukha, I. A., Koshkina, E. V., Bereznikova, A. V., Filatov, V. L., Bloshchitsyna, M. N., Bogomolova, A. P., and Katrukha, A. G. (2019) Full-size and partially truncated cardiac troponin complexes in the blood of patients with acute myocardial infarction, *Clin. Chem.*, **65**, 882-892, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.301127>.
159. Adamczyk, M., Brashear, R. J., and Mattingly, P. G. (2009) Circulating cardiac troponin-I autoantibodies in human plasma and serum, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1173**, 67-74, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04617.x>.
160. Vylegzhanina, A. V., Kogan, A. E., Katrukha, I. A., Antipova, O. V., Kara, A. N., Bereznikova, A. V., Koshkina, E. V., and Katrukha, A. G. (2017) Anti-cardiac troponin autoantibodies are specific to the conformational epitopes formed by cardiac troponin I and troponin T in the ternary troponin complex, *Clin. Chem.*, **63**, 343-350, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.261602>.
161. Sung, S. S., Brassington, A. M., Grannatt, K., Rutherford, A., Whitby, F. G., Krakowiak, P. A., Jorde, L. B., Carey, J. C., and Bamshad, M. (2003) Mutations in genes encoding fast-twitch contractile proteins cause distal arthrogryposis syndromes, *Am. J. Hum. Genet.*, **72**, 681-690, <https://doi.org/10.1086/368294>.
162. Kimber, E., Tajsharghi, H., Kroksmark, A. K., Oldfors, A., and Tulinius, M. (2006) A mutation in the fast skeletal muscle troponin I gene causes myopathy and distal arthrogryposis, *Neurology*, **67**, 597-601, <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000230168.05328.f4>.
163. Jiang, M., Zhao, X., Han, W., Bian, C., Li, X., Wang, G., Ao, Y., Li, Y., Yi, D., Zhe, Y., Lo, W. H., Zhang, X., and Li, J. (2006) A novel deletion in TNNI2 causes distal arthrogryposis in a large Chinese family with marked variability of expression, *Hum. Genet.*, **120**, 238-242, <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0183-4>.
164. Shrimpton, A. E., and Hoo, J. J. (2006) A TNNI2 mutation in a family with distal arthrogryposis type 2B, *Eur. J. Med. Genet.*, **49**, 201-206, <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2005.06.003>.
165. Li, X., Jiang, M., Han, W., Zhao, N., Liu, W., Sui, Y., Lu, Y., and Li, J. (2013) A novel TNNI2 mutation causes Freeman-Sheldon syndrome in a Chinese family with an affected adult with only facial contractures, *Gene*, **527**, 630-635, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.06.082>.
166. Li, Y., Nong, T., Li, X., Li, Z., Lv, H., Xu, H., Li, J., and Zhu, M. (2022) A TNNI2 variant c.525G>T causes distal arthrogryposis in a Chinese family, *Mol. Genet. Genomic Med.*, **10**, e2042, <https://doi.org/10.1002/mgg3.2042>.
167. Čulić, V., Miyake, N., Janković, S., Petrović, D., Šimunović, M., Đapić, T., Shiina, M., Ogata, K., and Matsumoto, N. (2016) Distal arthrogryposis with variable clinical expression caused by TNNI2 mutation, *Hum. Genome Var.*, **3**, 16035, <https://doi.org/10.1038/hgv.2016.35>.
168. Wang, B., Zheng, Z., Wang, Z., Zhang, X., Yang, H., Cai, H., and Fu, Q. (2016) A novel missense mutation of TNNI2 in a Chinese family cause distal arthrogryposis type 1, *Am. J. Med. Genet. A*, **170a**, 135-141, <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37391>.
169. Seyama, R., Uchiyama, Y., Kaneshi, Y., Hamanaka, K., Fujita, A., Tsuchida, N., Koshimizu, E., Misawa, K., Miyatake, S., Mizuguchi, T., Makino, S., Itakura, A., Okamoto, N., and Matsumoto, N. (2023) Distal arthrogryposis in a girl arising from a novel TNNI2 variant inherited from paternal somatic mosaicism, *J. Hum. Genet.*, **68**, 363-367, <https://doi.org/10.1038/s10038-022-01117-x>.
170. Nishimori, Y., Iida, A., Ogasawara, M., Okubo, M., Yonenobu, Y., Kinoshita, M., Sugie, K., Noguchi, S., and Nishino, I. (2022) TNNI1 mutated in autosomal dominant proximal arthrogryposis, *Neurol. Genet.*, **8**, e649, <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000000649>.
171. Beck, A. E., McMillin, M. J., Gildersleeve, H. I., Kezele, P. R., Shively, K. M., Carey, J. C., Regnier, M., and Bamshad, M. J. (2013) Spectrum of mutations that cause distal arthrogryposis types 1 and 2B, *Am. J. Med. Genet. A*, **161**, 550-555, <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35809>.
172. Desai, D., Stiene, D., Song, T., and Sadayappan, S. (2020) Distal arthrogryposis and lethal congenital contracture syndrome – an overview, *Front. Physiol.*, **11**, 689, <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00689>.
173. Shafaattalab, S., Li, A. Y., Lin, E., Stevens, C. M., Dewar, L. J., Lynn, F. C., Sanatani, S., Laksman, Z., Morin, R. D., van Petegem, F., Hove-Madsen, L., Tieleman, D. P., Davis, J. P., and Tibbits, G. F. (2019) *In vitro* analyses of suspected arrhythmogenic thin filament variants as a cause of sudden cardiac death in infants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 6969-6974, <https://doi.org/10.1073/pnas.1819023116>.

174. Sung, S. S., Brassington, A. M., Krakowiak, P. A., Carey, J. C., Jorde, L. B., and Bamshad, M. (2003) Mutations in TNNT3 cause multiple congenital contractures: a second locus for distal arthrogryposis type 2B, *Am. J. Hum. Genet.*, 212-214, <https://doi.org/10.1086/376418>.
175. Daly, S. B., Shah, H., O'Sullivan, J., Anderson, B., Bhaskar, S., Williams, S., Al-Sheqaih, N., Mueed Bidchol, A., Banka, S., Newman, W. G., and Girisha, K. M. (2014) Exome sequencing identifies a dominant TNNT3 mutation in a large family with distal arthrogryposis, *Mol. Syndromol.*, 5, 218-228, <https://doi.org/10.1159/000365057>.
176. Zhao, N., Jiang, M., Han, W., Bian, C., Li, X., Huang, F., Kong, Q., and Li, J. (2011) A novel mutation in TNNT3 associated with Sheldon-Hall syndrome in a Chinese family with vertical talus, *Eur. J. Med. Genet.*, 54, 351-353, <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2011.03.002>.
177. Lu, J., Li, H., Zhang, H., Lin, Z., Xu, C., Xu, X., Hu, L., Luan, Z., Lou, Y., and Tang, S. (2021) The distal arthrogryposis-linked p.R63C variant promotes the stability and nuclear accumulation of TNNT3, *J. Clin. Lab. Anal.*, 35, e24089, <https://doi.org/10.1002/jcla.24089>.
178. Sandaradura, S. A., Bournazos, A., Mallawaarachchi, A., Cummings, B. B., Waddell, L. B., Jones, K. J., Troedson, C., Sudarsanam, A., Nash, B. M., Peters, G. B., Algar, E. M., MacArthur, D. G., North, K. N., Brammah, S., Charlton, A., Laing, N. G., Wilson, M. J., Davis, M. R., and Cooper, S. T. (2018) Nemaline myopathy and distal arthrogryposis associated with an autosomal recessive TNNT3 splice variant, *Hum. Mutat.*, 39, 383-388, <https://doi.org/10.1002/humu.23385>.
179. Johnston, J. J., Kelley, R. I., Crawford, T. O., Morton, D. H., Agarwala, R., Koch, T., Schaffer, A. A., Francomano, C. A., and Biesecker, L. G. (2000) A novel nemaline myopathy in the Amish caused by a mutation in troponin T1, *Am. J. Hum. Genet.*, 67, 814-821, <https://doi.org/10.1086/303089>.
180. Marra, J. D., Engelstad, K. E., Ankala, A., Tanji, K., Dastgir, J., De Vivo, D. C., Coffee, B., and Chiriboga, C. A. (2015) Identification of a novel nemaline myopathy-causing mutation in the troponin T1 (TNNT1) gene: a case outside of the old order Amish, *Muscle Nerve*, 51, 767-772, <https://doi.org/10.1002/mus.24528>.
181. Van der Pol, W. L., Leijenaar, J. F., Spliet, W. G., Lavrijsen, S. W., Jansen, N. J., Braun, K. P., Mulder, M., Timmers-Raaijmakers, B., Ratsma, K., Dooijes, D., and van Haelst, M. M. (2014) Nemaline myopathy caused by TNNT1 mutations in a Dutch pedigree, *Mol. Genet. Genomic Med.*, 2, 134-137, <https://doi.org/10.1002/mgg3.52>.
182. Abdulhaq, U. N., Daana, M., Dor, T., Fellig, Y., Eylon, S., Schuelke, M., Shaag, A., Elpeleg, O., and Edvardson, S. (2016) Nemaline body myopathy caused by a novel mutation in troponin T1 (TNNT1), *Muscle Nerve*, 53, 564-569, <https://doi.org/10.1002/mus.24885>.
183. Jin, J. P., Brotto, M. A., Hossain, M. M., Huang, Q. Q., Brotto, L. S., Nosek, T. M., Morton, D. H., and Crawford, T. O. (2003) Truncation by Glu180 nonsense mutation results in complete loss of slow skeletal muscle troponin T in a lethal nemaline myopathy, *J. Biol. Chem.*, 278, 26159-26165, <https://doi.org/10.1074/jbc.M303469200>.
184. Wang, X., Huang, Q. Q., Breckenridge, M. T., Chen, A., Crawford, T. O., Morton, D. H., and Jin, J. P. (2005) Cellular fate of truncated slow skeletal muscle troponin T produced by Glu180 nonsense mutation in amish nemaline myopathy, *J. Biol. Chem.*, 280, 13241-13249, <https://doi.org/10.1074/jbc.M413696200>.
185. Mondal, A., and Jin, J. P. (2016) Protein structure-function relationship at work: learning from myopathy mutations of the slow skeletal muscle isoform of troponin T, *Front. Physiol.*, 7, 449, <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00449>.
186. Van de Locht, M., Donkervoort, S., de Winter, J. M., Conijn, S., Begthel, L., Kusters, B., Mohassel, P., Hu, Y., Medne, L., Quinn, C., Moore, S. A., Foley, A. R., Seo, G., Hwee, D. T., Malik, F. I., Irving, T., Ma, W., Granzier, H. L., Kamsteeg, E. J., Immadisetty, K., et al. (2021) Pathogenic variants in TNNC2 cause congenital myopathy due to an impaired force response to calcium, *J. Clin. Invest.*, 131, <https://doi.org/10.1172/jci145700>.
187. Van de Locht, M., Borsboom, T. C., Winter, J. M., and Ottenheijm, C. A. C. (2021) Troponin variants in congenital myopathies: how they affect skeletal muscle mechanics, *Int. J. Mol. Sci.*, 22, <https://doi.org/10.3390/ijms22179187>.
188. Hoffmann, B., Schmidt-Traub, H., Perrot, A., Osterziel, K. J., and Gessner, R. (2001) First mutation in cardiac troponin C, L29Q, in a patient with hypertrophic cardiomyopathy, *Hum. Mutat.*, 17, 524, <https://doi.org/10.1002/humu.1143>.
189. Landstrom, A. P., Parvatiyar, M. S., Pinto, J. R., Marquardt, M. L., Bos, J. M., Tester, D. J., Ommen, S. R., Potter, J. D., and Ackerman, M. J. (2008) Molecular and functional characterization of novel hypertrophic cardiomyopathy susceptibility mutations in TNNC1-encoded troponin C, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 45, 281-288, <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2008.05.003>.
190. Chung, W. K., Kitner, C., and Maron, B. J. (2011) Novel frameshift mutation in Troponin C (TNNC1) associated with hypertrophic cardiomyopathy and sudden death, *Cardiol. Young*, 21, 345-348, <https://doi.org/10.1017/S1047951110001927>.
191. Parvatiyar, M. S., Landstrom, A. P., Figueiredo-Freitas, C., Potter, J. D., Ackerman, M. J., and Pinto, J. R. (2012) A mutation in TNNC1-encoded cardiac troponin C, TNNC1-A31S, predisposes to hypertrophic cardiomyopathy and ventricular fibrillation, *J. Biol. Chem.*, 287, 31845-31855, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.377713>.

192. Caforio, A. L., Rossi, B., Risaliti, R., Siciliano, G., Marchetti, A., Angelini, C., Crea, F., Mariani, M., and Muratorio, A. (1989) Type 1 fiber abnormalities in skeletal muscle of patients with hypertrophic and dilated cardiomyopathy: evidence of subclinical myogenic myopathy, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **14**, 1464-1473, [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(89\)90383-5](https://doi.org/10.1016/0735-1097(89)90383-5).
193. Veltri, T., Landim-Vieira, M., Parvatiyar, M. S., Gonzalez-Martinez, D., Dieseldorff Jones, K. M., Michell, C. A., Dweck, D., Landstrom, A. P., Chase, P. B., and Pinto, J. R. (2017) Hypertrophic cardiomyopathy cardiac troponin C mutations differentially affect slow skeletal and cardiac muscle regulation, *Front. Physiol.*, **8**, 221, <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00221>.
194. Li, M. X., Mercier, P., Hartman, J. J., and Sykes, B. D. (2021) Structural basis of tirasemtiv activation of fast skeletal muscle, *J. Med. Chem.*, **64**, 3026-3034, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01412>.
195. Russell, A. J., Hartman, J. J., Hinken, A. C., Muci, A. R., Kawas, R., Driscoll, L., Godinez, G., Lee, K. H., Marquez, D., Browne, W. F. 4th, Chen, M. M., Clarke, D., Collibee, S. E., Garard, M., Hansen, R., Jia, Z., Lu, P. P., Rodriguez, H., Saikali, K. G., Schaletzky, J., et al. (2012) Activation of fast skeletal muscle troponin as a potential therapeutic approach for treating neuromuscular diseases, *Nat. Med.*, **18**, 452-455, <https://doi.org/10.1038/nm.2618>.
196. Shefner, J., Cedarbaum, J. M., Cudkowicz, M. E., Maragakis, N., Lee, J., Jones, D., Watson, M. L., Mahoney, K., Chen, M., Saikali, K., Mao, J., Russell, A. J., Hansen, R. L., Malik, F., and Wolff, A. A. (2012) Safety, tolerability and pharmacodynamics of a skeletal muscle activator in amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotroph. Lateral Scler.*, **13**, 430-438, <https://doi.org/10.3109/17482968.2012.684214>.
197. Shefner, J. M., Watson, M. L., Meng, L., and Wolff, A. A. (2013) A study to evaluate safety and tolerability of repeated doses of tirasemtiv in patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **14**, 574-581, <https://doi.org/10.3109/21678421.2013.822517>.
198. Shefner, J. M., Wolff, A. A., and Meng, L. (2013) The relationship between tirasemtiv serum concentration and functional outcomes in patients with ALS, *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **14**, 582-585, <https://doi.org/10.3109/21678421.2013.817587>.
199. Shefner, J. M., Wolff, A. A., Meng, L., Bian, A., Lee, J., Barragan, D., and Andrews, J. A. (2016) A randomized, placebo-controlled, double-blind phase IIb trial evaluating the safety and efficacy of tirasemtiv in patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **17**, 426-435, <https://doi.org/10.3109/21678421.2016.1148169>.
200. Sanders, D. B., Rosenfeld, J., Dimachkie, M. M., Meng, L., and Malik, F. I. (2015) A double-blinded, randomized, placebo-controlled trial to evaluate efficacy, safety, and tolerability of single doses of tirasemtiv in patients with acetylcholine receptor-binding antibody-positive myasthenia gravis, *Neurotherapeutics*, **12**, 455-460, <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0345-y>.
201. Andrews, J. A., Cudkowicz, M. E., Hardiman, O., Meng, L., Bian, A., Lee, J., Wolff, A. A., Malik, F. I., and Shefner, J. M. (2018) VITALITY-ALS, a phase III trial of tirasemtiv, a selective fast skeletal muscle troponin activator, as a potential treatment for patients with amyotrophic lateral sclerosis: study design and baseline characteristics, *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **19**, 259-266, <https://doi.org/10.1080/21678421.2018.1426770>.
202. Shefner, J. M., Cudkowicz, M. E., Hardiman, O., Cockcroft, B. M., Lee, J. H., Malik, F. I., Meng, L., Rudnicki, S. A., Wolff, A. A., and Andrews, J. A. (2019) A phase III trial of tirasemtiv as a potential treatment for amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **0**, 1-11, <https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1612922>.
203. Hwee, D. T., Kennedy, A. R., Hartman, J. J., Ryans, J., Durham, N., Malik, F. I., and Jasper, J. R. (2015) The small-molecule fast skeletal troponin activator, CK-2127107, improves exercise tolerance in a rat model of heart failure, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **353**, 159-168, <https://doi.org/10.1124/jpet.114.222224>.
204. Andrews, J. A., Miller, T. M., Vijayakumar, V., Stoltz, R., James, J. K., Meng, L., Wolff, A. A., and Malik, F. I. (2018) CK-2127107 amplifies skeletal muscle response to nerve activation in humans, *Muscle Nerve*, **57**, 729-734, <https://doi.org/10.1002/mus.26017>.
205. Cheng, A. J., Hwee, D. T., Kim, L. H., Durham, N., Yang, H. T., Hinken, A. C., Kennedy, A. R., Terjung, R. L., Jasper, J. R., Malik, F. I., and Westerblad, H. (2019) Fast skeletal muscle troponin activator CK-2066260 increases fatigue resistance by reducing the energetic cost of muscle contraction, *J. Physiol.*, **597**, 4615-4625, <https://doi.org/10.1113/jp278235>.
206. Shefner, J. M., Andrews, J. A., Genge, A., Jackson, C., Lechtzin, N., Miller, T. M., Cockcroft, B. M., Meng, L., Wei, J., Wolff, A. A., Malik, F. I., Bodkin, C., Brooks, B. R., Caress, J., Dionne, A., Fee, D., Goutman, S. A., Goyal, N. A., Hardiman, O., Hayat, G., et al. (2021) A phase 2, double-blind, randomized, dose-ranging trial of reldesemtiv in patients with ALS, *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **22**, 287-299, <https://doi.org/10.1080/21678421.2020.1822410>.
207. Collibee, S. E., Bergnes, G., Chuang, C., Ashcraft, L., Gardina, J., Garard, M., Jamison, C. R., Lu, K., Lu, P. P., Muci, A., Romero, A., Valkevich, E., Wang, W., Warrington, J., Yao, B., Durham, N., Hartman, J., Marquez, A.,

- Hinken, A., Schaletzky, J., et al. (2021) Discovery of reldesemtiv, a fast skeletal muscle troponin activator for the treatment of impaired muscle function, *J. Med. Chem.*, **64**, 14930-14941, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01067>.
208. Issahaku, A. R., Ibrahim, M. A. A., Mukelabai, N., and Soliman, M. E. S. (2023) Intermolecular and dynamic investigation of the mechanism of action of reldesemtiv on fast skeletal muscle troponin complex toward the treatment of impaired muscle function, *Protein J.*, **42**, 263-275, <https://doi.org/10.1007/s10930-023-10091-y>.
209. Rudnicki, S. A., Andrews, J. A., Duong, T., Cockcroft, B. M., Malik, F. I., Meng, L., Wei, J., Wolff, A. A., Genge, A., Johnson, N. E., Tesi-Rocha, C., Connolly, A. M., Darras, B. T., Felice, K., Finkel, R. S., Shieh, P. B., Mah, J. K., Statland, J., Campbell, C., Habib, A. A., et al. (2021) Reldesemtiv in patients with spinal muscular atrophy: a phase 2 hypothesis-generating study, *Neurotherapeutics*, **18**, 1127-1136, <https://doi.org/10.1007/s13311-020-01004-3>.
210. Shefner, J. M., Al-Chalabi, A., Andrews, J. A., Chio, A., De Carvalho, M., Cockcroft, B. M., Corcia, P., Couratier, P., Cudkowicz, M. E., Genge, A., Hardiman, O., Heiman-Patterson, T., Henderson, R. D., Ingre, C., Jackson, C. E., Johnston, W., Lechtzin, N., Ludolph, A., Maragakis, N. J., Miller, T. M., et al. (2023) COURAGE-ALS: a randomized, double-blind phase 3 study designed to improve participant experience and increase the probability of success, *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **24**, 523-534, <https://doi.org/10.1080/21678421.2023.2216223>.
211. Robertson, I. M., Baryshnikova, O. K., Li, M. X., and Sykes, B. D. (2008) Defining the binding site of levosimendan and its analogues in a regulatory cardiac troponin C-troponin I complex, *Biochemistry*, **47**, 7485-7495, <https://doi.org/10.1021/bi800438k>.
212. Thompson, B. R., Martindale, J., and Metzger, J. M. (2016) Sarcomere neutralization in inherited cardiomyopathy: small-molecule proof-of-concept to correct hyper-Ca²⁺-sensitive myofilaments, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **311**, H36-43, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00981.2015>.
213. Cai, F., Hwang, P. M., and Sykes, B. D. (2018) Structural changes induced by the binding of the calcium desensitizer w7 to cardiac troponin, *Biochemistry*, **57**, 6461-6469, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00882>.
214. Adhikari, B. B., and Wang, K. (2004) Interplay of troponin- and myosin-based pathways of calcium activation in skeletal and cardiac muscle: the use of W7 as an inhibitor of thin filament activation, *Biophys. J.*, **86**, 359-370, [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(04\)74112-0](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(04)74112-0).

TROPONINS AND SKELETAL MUSCLE PATHOLOGIES

Review

A. P. Bogomolova^{1,2*} and I. A. Katrukha^{1,2}

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

² Hytest Ltd., Turku, Finland; e-mail: bogomolova.agnessa@yandex.ru

Skeletal muscles account for ~30-40% of the total weight of human body and are responsible for its most important functions, including movement, respiration, thermogenesis, and glucose and protein metabolism. Skeletal muscle damage negatively impacts the whole-body functioning, leading to deterioration of the quality of life and, in severe cases, death. Therefore, timely diagnosis and therapy for skeletal muscle dysfunction are important goals of modern medicine. In this review, we focused on the skeletal troponins that are proteins in the thin filaments of muscle fibers. Skeletal troponins play a key role in regulation of muscle contraction. Biochemical properties of these proteins and their use as biomarkers of skeletal muscle damage are described in this review. One of the most convenient and sensitive methods of protein biomarker measurement in biological liquids is immunochemical analysis; hence, we examined the factors that influence immunochemical detection of skeletal troponins and should be considered when developing diagnostic test systems. Also, we reviewed the available data on the skeletal troponin mutations that are considered to be associated with pathologies leading to the development of diseases and discussed utilization of troponins as drug targets for treatment of the skeletal muscle disorders.

Keywords: skeletal muscle, troponin, ageing, myopathy, biomarker, monoclonal antibodies

ВЛИЯНИЕ РНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА Sam68 НА АКТИВНОСТЬ ПОЛИ(ADP-РИБОЗА)-ПОЛИМЕРАЗЫ 1

© 2024 К.Н. Науменко, Е.А. Бережнев, Т.А. Кургина,
М.В. Суханова, О.И. Лаврик*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: lavrik@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 14.08.2024

После доработки 10.10.2024

Принята к публикации 15.10.2024

Принимая во внимание участие РНК-связывающих белков в регуляции активности поли(ADP-рибоза)-полимеразы 1 (PARP1), ключевого фактора репарации ДНК, было проведено исследование влияния внутренне неупорядоченного белка Sam68 на каталитическую активность этого фермента. Для проведения исследования была получена плазмидная конструкция, содержащая в своем составе кодирующую последовательность белка Sam68, проведена оптимизация условий экспрессии Sam68 в клетках *Escherichia coli*, отработана методика его выделения и подобраны условия для рефолдинга этого белка из телец включения. Наши исследования в реконструированной системе показали, что Sam68 способен регулировать каталитическую активность PARP1, стимулируя ее авто-поли(ADP-рибозил)ирование. Определено сродство Sam68 к поврежденной ДНК и очищенной поли(ADP-рибозе) (PAR). На основании полученных экспериментальных данных была предложена гипотеза, объясняющая механизм стимуляции активности PARP1 белком Sam68. Согласно этой гипотезе, Sam68 взаимодействует с PAR, ковалентно присоединенной к PARP1, экранирует отрицательный заряд PAR и тем самым увеличивает время жизни активного комплекса авто-поли(ADP-рибозил)ированной PARP1 с поврежденной ДНК. Это приводит к возрастанию уровня PAR, синтезируемой этим ферментом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: репарация ДНК, PARP1, РНК-связывающие белки, Sam68, поли(ADP-рибозил)ирование.

DOI: 10.31857/S0320972524120023 EDN: IFXQEC

ВВЕДЕНИЕ

Поддержание стабильности генетической информации живых организмов во многом обусловлено эффективностью функционирования систем репарации ДНК [1]. Одной из немедленных реакций в клетке в ответ на генотоксический стресс, приводящий к повреждению ДНК, является синтез поли(ADP-рибозы) (PAR) в ядре [2]. Данная реакция катализируется поли(ADP-рибоза)-полимеразой (PARP1 и PARP2), использующими в качестве субстрата никотинамидадениндинуклеотид (NAD⁺). Полимер PAR ковалентно присоединяется к белкам, в том числе к PARP1, PARP2 и гистонам [3]. Такая модификация играет важную роль в структурной организации хроматина

и в регуляции функциональной активности белков, участвующих в репарации ДНК и других процессах. Поли(ADP-рибозил)ирование (PAR-илирование) приводит к эффективной диссоциации PAR-илированных белков из их комплексов с ДНК в хроматине. Кроме того, синтез PAR можно рассматривать как сигнал, привлекающий белки-партнеры к месту повреждения ДНК. PARP1 является наиболее изученным ферментом семейства поли(ADP-рибоза)-полимераз. PARP1 синтезирует до 90% всей клеточной поли(ADP-рибозы) в ответ на повреждение ДНК и считается одним из ключевых регуляторов процесса репарации ДНК, а также других процессов, определяющих стабильность генома [4]. Изучение белков, участвующих в модуляции активности PARP1, является

Принятые сокращения: ТМАО – триметиламинооксид; PAR – поли(ADP-рибоза); PAR-илирование – поли(ADP-рибозил)ирование; PARP1 – поли(ADP-рибоза)-полимераза 1; Sam68 – РНК-связывающий белок 1, содержащий домен KH и ассоциированный с сигнальной трансдукцией; YB-1 – Y-бокс-связывающий белок 1.

* Адресат для корреспонденции.

важным направлением молекулярной биологии, поскольку установление детального механизма регуляции активности поли(ADP-рибоза)-полимераз и процессов репарации ДНК является важным для понимания причин развития онкологических и нейродегенеративных заболеваний [5].

В настоящее время РНК-связывающие белки рассматриваются как участники процессов поддержания стабильности генома. Было показано, что многие РНК-связывающие белки могут быть PAR-илированы или взаимодействовать с PAR в условиях генотоксического стресса [6]. Ключевую роль в распознавании PAR играют внутренние неупорядоченные области (IDR; Intrinsically Disordered Region) РНК-связывающих белков, содержащие в своем составе повторы аргинина/серина (R/S-box), аргинина/глицина (RGG-box), а также участки, богатые остатками аргинина/лизина (R/K-богатые домены), глицина (G-богатые домены), глутамина/глицина/серина/тирозина (QGSY-богатые домены) [7]. В системе *in vitro* было показано, что многие РНК-связывающие белки, содержащие неупорядоченные области, склонны к самоассоциации и агрегации. Эксперименты с использованием культур клеток показали, что локализация отдельных РНК-связывающих белков в сайтах геномных повреждений индуцируется синтезом PAR [8]. Высокая локальная концентрация РНК-связывающих белков в местах повреждения ДНК приводит к организации немембранных компартментов. Предполагается, что компартментализация поврежденной ДНК способствует привлечению ферментов репарации к месту повреждения и более эффективному протеканию процесса репарации [9]. В большинстве современных работ описывается компартментализация процесса репарации ДНК с участием РНК-связывающих белков, индуцируемая синтезом PAR в месте повреждения ДНК [10]. Кроме того, РНК-связывающие белки способны регулировать активность PARP1, как это было установлено для Y-бокс-связывающего белка 1 (YB-1). Было обнаружено, что YB-1 способен регулировать активность PARP1 посредством формирования тройного комплекса YB-1•PARP1•ДНК или через взаимодействие YB-1 с авто-PAR-илированной формой PARP1. Выступая в качестве эффективного акцептора в реакции PAR-илирования, YB-1 повышает число оборотов реакции, катализируемой PARP1, и увеличивает общий выход реакции PAR-илирования. Неструктурированный C-концевой домен YB-1 определяет сродство YB-1 к поврежденной ДНК и PAR и играет ключевую роль в регуляции активности PARP1 [11–14]. Механизмы стимуляции PARP1, обнаруженные для YB-1, могут иметь место и в случае других РНК-связывающих белков, для которых уже установлена воз-

можность их PAR-илирования и/или взаимодействия с PAR.

В недавних исследованиях было показано, что внутренне неупорядоченный РНК-связывающий белок Sam68, содержащий домен KH и ассоциированный с сигнальной трансдукцией (Src-associated substrate during mitosis of 68 kDa) способен регулировать синтез PAR ферментом PARP1, модулируя уровень синтеза этого полимера как в системе *in vitro*, так и в системе *ex vivo* [15]. Было показано, что в клетках, нокаутных по гену *Sam68*, наблюдался более низкий уровень синтеза PAR после повреждения клеток γ -облучением [15]. Масс-спектрометрическими методами Sam68 был идентифицирован как мишень PAR-илирования в клетке [16]. Однако, несмотря на то что для Sam68 была показана важная роль в регуляции активности PARP1 при генотоксическом стрессе, детальный механизм влияния Sam68 на синтез PAR не был установлен.

В данной работе был сконструирован вектор для наработки белка Sam68 в системе экспрессии *Escherichia coli*. С использованием полученной плазмидной конструкции была проведена наработка рекомбинантного Sam68 в препаративных количествах и подобраны оптимальные концентрации хаотропных агентов (мочевина) и осмолитов (аргинина) для повышения растворимости этого белка в водных растворах. В системе *in vitro* впервые показано, что Sam68 является мишенью PAR-илирования и стимулирует аутомодификацию PARP1. Впервые оценена эффективность комплексообразования Sam68 с поврежденной ДНК и PAR и предложен механизм стимуляции активности PARP1 РНК-связывающим белком Sam68.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие материалы и реактивы: N,N'-метиленабисакриламид, трис(гидроксиметил)аминометан (Tris) («Amresco», США); акриламид, бисакриламид («AppliChem», Германия); мочевина, персульфат аммония (ПСА) («PanReac», Испания); додецилсульфат натрия (Ds-Na) («Fluka», Швейцария); смесь фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25/24/1), никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+), среда LB Broth («Sigma-Aldrich», США); наборы для проведения ПЦР («Биолабмикс», Россия); эндонуклеазы рестрикции KpnI, SalI, SfoI («Сибэнзим», Россия); клетки *E. coli* штаммов BL21(DE3), BL21(DE3) GeneX, BL21(DE3)pLysS, Rosetta(DE3), Rosetta(DE3)pLysS («Merck», США); ДНКаза I («New England Biolabs», США); [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP с удельной активностью 1000 Ки/ммоль (Лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН, Россия). Остальные использован-

Таблица 1. Последовательности олигодезоксирибонуклеотидов, использованных в работе

Обозначение	Последовательность (5'→3')
An1*	GGAAGACCCTGACGTTTCCCAACTTT-ATCGCCF
An2	GGCGATAAAGTTGGG
An3**	рAAACGTCAGGGTCTTCC
pQE30-Sam68-KpnI	AGATCTGGTACCATGCAGCGCCGGGACGACC
pQE30-Sam68-SalI	AGATCTGTGACATAACGTCCATATGGGTGC
pBADM41-Sam68-For	ATGCAGCGCCGGGACGACC
pBADM41-Sam68-Rev	ATAACGTCCATATGGGTGCTCTCTG

Примечание. * F – 5(6)-карбоксифлуоресцеин (FAM);
** р – фосфат.

ные реактивы и компоненты буферов были отечественного производства и имели квалификацию о.с.ч. и ч.д.а.

В работе были использованы синтетические олигодезоксирибонуклеотиды (табл. 1) производства Лаборатории медицинской химии (ИХБФМ СО РАН, Россия) или «Биоссет» (Россия).

Обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей Молони (OT-MMLV) и ДНК-лигаза фага T4 были любезно предоставлены д.б.н. Ходыревой С.Н. (ИХБФМ СО РАН). Плазмиды pQE30 и pBADM41 были любезно предоставлены к.б.н. Оскорбинным И.П. (ИХБФМ СО РАН). Никотинамиднуклеотид-аденилилтрансфераза (NMNAT) была любезно предоставлена к.х.н. С.И. Шрамм (Институт молекулярной генетики РАН).

Секвенирование плазмидных ДНК по методу Сэнгера проводили в ЦКП Геномика ИХБФМ СО РАН, Россия.

Получение ДНК-субстратов. ДНК-дуплекс (FAM-Nick) получали гибридизацией олигонуклеотида An1, содержащего остаток 5(6)-карбокси-флуоресцеин (FAM) с олигонуклеотидами An2, An3 в молярном соотношении 1,5/1/1. Реакционную смесь инкубировали в течение 5 мин при 95 °С, а затем медленно охлаждали до комнатной температуры.

Выделение суммарной РНК из клеток HeLa. Культуру клеток HeLa вели на чашке диаметром 10 см до состояния монослоя в среде DMEM («Thermo Fisher Scientific», США). Полученную культуру клеток промывали 5 мл PBS («Thermo Fisher Scientific»), ресуспендировали в 1 мл TriZol («Thermo Fisher Scientific»), добавляли

200 мкл хлороформа, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и центрифугировали 15 мин (16 000 g при 4 °С). После центрифугирования отбирали верхнюю водную фазу и переосаждали РНК изопропиловым спиртом. Осажденную РНК растворяли в 200 мкл воды и добавляли равный объем смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25/24/1). После центрифугирования отбирали водную фазу и переосаждали РНК этанолом.

Получение кДНК Sam68 из суммарной РНК клеток HeLa. Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 4 мкг суммарной РНК из клеток HeLa и 100 нмоль oligo dT, инкубировали 2 мин при 70 °С. Затем, к данной смеси добавляли буфер для обратной транскрипции («Биолабмикс») и 1 мкл ОТ-MMLV (100 ед. активности/мкл). Реакцию проводили в течение 1 ч при 42 °С. Полученный препарат суммарной кДНК клеток HeLa был использован для наработки препаративного количества кДНК белка Sam68 методом ПЦР.

Получение плазмид pQE30-Sam68 и pBADM41-Sam68. Целевую плазмиду получали лигированием в 10 мкл смеси, содержащей 5 ед. акт. ДНК-лигазы фага T4 и лигазный буфер (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP), 50 нг вектора pQE30, гидролизованного эндонуклеазами рестрикции KpnI и SalI, или pBADM41, гидролизованного SfoI (эндонуклеазы, генерирующей фрагменты ДНК с тупыми концами), и 75 нг ПЦР-продукта Sam68, полученного с праймерами pQE30-Sam68-KpnI/pQE30-Sam68-SalI или pBADM41-Sam68-For/pBADM41-Sam68-Rev. ПЦР-продукт Sam68, полученный с праймерами pQE30-Sam68-KpnI/pQE30-Sam68-SalI, предварительно гидролизовали эндонуклеазами рестрикции KpnI и SalI. Смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Методом секвенирования по Сэнгеру анализировали полученные плазмидные ДНК на наличие ошибок. Проверка последовательностей целевой вставки не выявила ошибок в нуклеотидной последовательности.

Культивирование клеток в системе автоиндукции по Штудьеру. В питательную среду, содержащую 1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM KH₂PO₄, 25 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,5% глицерина, 0,05% глюкозы, 0,2% лактозы и селективирующий антибиотик, добавляли трансформированные плазмидой pQE30-Sam68 клетки *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3) GeneX, BL21(DE3)pLysS, Rosetta(DE3), Rosetta(DE3)pLysS с последующим наращиванием (18 ч, 37 °С) при перемешивании (200 об./мин) до стационарной плотности клеточной культуры [17].

Вестерн-блот анализ. Анализируемые образцы, полученные после лизиса клеток *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)GeneX, BL21(DE3)pLysS, Rosetta(DE3), Rosetta(DE3)pLysS, в буфере Laemmli,

содержащем 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 100 mM 2-меркаптоэтанола, 1% Ds-Na, 10% глицерина, 0,01% бромфенолового синего, разделяли с помощью электрофореза в 10%-ном Ds-Na-ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) в системе TurboBlot («Thermo Fisher Scientific») в течение 20 мин при силе тока 1,3 мА/см² геля и напряжении 25 В. После этого нитроцеллюлозную мембрану выдерживали в 5%-ном обезжиренном сухом молоке, растворенном в буфере TBS, содержащем 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, в течение 1 ч и затем инкубировали в течение ночи при 4 °C со специфичными антителами против гексагистидиновой (His₆) последовательности («Abcam», США), разбавленными до титра 1 : 1000 в буфере TBS. Мембрану отмывали 3 раза по 5 мин буфером TBST, содержащим 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с конъюгатами антител против IgG мыши с пероксидазой хрена («Abcam») (разбавленными в TBS до титра 1 : 50 000). Мембрану отмывали 3 раза по 5 мин буфером TBST, затем – 3 раза по 5 мин в буфере TBS и инкубировали с хемолуминесцентным субстратом пероксидазы хрена SuperSignal West Pico Substrate («Thermo Fisher Scientific»). Положение анализируемых полос определяли экспозицией нитроцеллюлозной мембраны с использованием системы гель-документирования Amersham Imager 600 («GE», США).

Выделение белка Sam68. Клетки *E. coli*, трансформированные плазмидой pQE30-Sam68, ресуспендировали в 50 мл буферного раствора, содержащего 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10% глицерина, 7 mM 2-меркаптоэтанола, 1 mM PMSE, 1 mM бензамидина. После инкубации на льду в течение 20 мин к смеси добавляли 50 мл буферного раствора для лизиса клеток, содержащего 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 M NaCl, 2% NP-40, 10% глицерина, 7 mM 2-меркаптоэтанола. Полученную суспензию обрабатывали в ультразвуковом дезинтеграторе («Bandelin», Германия) при 40 кГц в течение 30 мин с циклом работы: пауза – 45 с; обработка – 15 с, с охлаждением до 4 °C. Полученный лизат центрифугировали 30 мин при 30 000 g и 4 °C («Beckman Coulter Inc.», США). Осадок ресуспендировали в 50 мл буфера, содержащего 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 M мочевины, 0,2 M NaCl, 10% глицерина, 0,1% NP-40, 7 mM 2-меркаптоэтанола, и инкубировали в течение 1 ч при 4 °C при постоянном перемешивании. После инкубации полученный раствор центрифугировали (30 мин, 30 000 g при 4 °C). Осадок растворяли в 50 мл буфера, содержащего 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 8 M мочевины, 0,2 M NaCl, 10% глицерина, 0,1% NP-40, 7 mM 2-меркаптоэтанола, добавляли протамин сульфат до конечной

концентрации 1 г/литр и инкубировали в течение 30 мин при 4 °C при постоянном перемешивании. Полученный раствор центрифугировали (30 мин, 30 000 g при 4 °C). Супернатант наносили на колонку (1 мл), содержащую в качестве сорбента Ni-NTA («Bio toolomics», Великобритания).

Колонку уравнивали буфером А, содержащим 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 8 M мочевины, 0,2 M NaCl, 10% глицерина, 0,1% NP-40, 2 mM 2-меркаптоэтанола, 20 mM имидазола. Элюцию белка проводили градиентом 20–500 mM имидазола в буфере А. Полученные фракции анализировали с помощью электрофореза в 10%-ном Ds-Na-ПААГ.

Фракции целевого белка, содержащие наименьшее количество примесей, концентрировали с использованием фильтров Vivaspin 10K MWCO («Sartorius», Германия). Проводили частичную замену буфера в получившемся препарате путем разбавления белка буфером, содержащим 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 8 M мочевины, 0,5 M NaCl, 0,1% NP-40, 1 mM ДТТ, с последующей ультрафильтрацией.

Полученный препарат белка Sam68 последовательно диализовали против буферных растворов, содержащих 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 M NaCl, 0,1% NP-40, 7 mM 2-меркаптоэтанола, 4 или 2, или 1, или 0,5 M мочевины, в течение 4 ч при 4 °C при постоянном перемешивании.

Синтез радиоактивного NAD⁺ и полимера ADP-рибозы. Синтез [³²P]-меченого NAD⁺ проводили в реакционной смеси, содержащей 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 20 mM MgCl₂, 2 mM β-никотинамидмононуклеотида, 1 mM АТР, 0,5 мКи [α-³²P]АТР и 5 мг/мл никотинамидмононуклеотид-аденилилтрансферазы (NMNAT), в течение 1 ч при 37 °C. Фермент NMNAT инактивировали в течение 10 мин при 65 °C, денатурированный фермент осаждали центрифугированием (12 000 g, 10 мин при 4 °C). Синтез [³²P]-меченой поли(ADP-рибозы) ([³²P]PAR) проводили в реакционной смеси, содержащей 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 40 mM NaCl, 1 mM ДТТ, 5 mM MgCl₂, 100 нМ ДНК (FAM-Nick), 200 нМ PARP1 и 10 мкМ NAD⁺ (0,4 мКи [³²P]-меченого NAD⁺). Реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. Далее, реакционную смесь обрабатывали ДНКазой I (0,1 ед./мкл) в течение 10 мин при 37 °C. Реакцию щелочного гидролиза PAR, ковалентно связанной с PARP1, инициировали добавлением NaOH до концентрации 0,1 M с последующей инкубацией смеси при 37 °C в течение 40 мин. Реакцию останавливали добавлением равного объема 0,1 M HCl.

Белки удаляли фенольной экстракцией, используя смесь фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25/24/1), PAR осаждали добавлением этанола с последующей инкубацией в течение 1 ч при –20 °C. Осадок растворяли в воде.

Препарат радиоактивно меченной PAR анализировали гель-электрофорезом в денатурирующем 20%-ном ПААГ с последующей радиоавтографией. Концентрацию [32 P]-меченого PAR оценивали по количеству включенной [32 P]ADP-рибозы с учетом интенсивности сигнала и концентрации [32 P]NAD $^{+}$.

Анализ активности PARP1. Начальную скорость синтеза PAR в реакции, катализируемой PARP1 в присутствии или при отсутствии Sam68, определяли, исходя из кинетики включения [32 P]NAD $^{+}$ в синтезируемый полимер ADP-рибозы. Реакционные смеси содержали 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 40 mM NaCl, 1 mM ДТТ, 100 мкг/мл БСА, 0,5 M мочевины, 10 mM ЭДТА, 100 нМ PARP1, 0,5–3 мкМ Sam68 и 0,5 OD $_{260}$ /мл активированной ДНКазой I ДНК тимуса теленка (ДНК $_{акт}$) («Sigma-Aldrich»). Реакцию синтеза PAR инициировали добавлением NAD $^{+}$ до конечной концентрации 20 мкМ (0,4 мкКи [32 P]-меченого NAD $^{+}$) и проводили в течение 20 мин при температуре 30 °C, отбирая аликвоты через 1, 5, 10 и 20 мин. Реакцию останавливали перенесением аликвот реакционной смеси на бумажный фильтр Whatman (1 см × 1 см), пропитанный 10%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Неизрасходованный NAD $^{+}$ удаляли путем промывки фильтров 3 раза по 5 мин в 5%-ной ТХУ, затем – однократно в 90%-ном этаноле для удаления остатков ТХУ. Перед определением радиоактивности образцов фильтры высушивали на воздухе.

Количественную оценку интенсивности синтеза PAR определяли по суммарной радиоактивности продуктов реакции радиоавтографией с последующим анализом в программе Quantity One. На основании полученных данных строили график зависимости времени реакции PAR-илирования (t) от количества синтезированной поли(ADP-рибозы) в программе Origin с использованием уравнений (1)–(3):

$$[P] = [P_{max}] \times (1 - e^{-kt}), \quad (1)$$

$$V = d[P] / dt = k \times [P_{max}] \times e^{-kt}, \quad (2)$$

$$V_0 = d[P] / dt = k \times [P_{max}]; t = 0, \quad (3)$$

где P_{max} – максимальная концентрация продукта синтеза при $t \infty$, t – время, k – константа скорости первого порядка. Рассчитанные кинетические параметры $[P_{max}]$ и k были использованы для определения начальной скорости реакции (уравнение (3)).

Анализ уровня модификации PARP1 и Sam68 проводили с помощью гель-электрофореза в 10%-ном Ds-Na-ПААГ по Laemmli [18].

Исследование взаимодействия Sam68 с ДНК и PAR. Связывание белков с поврежденной ДНК детектировали по изменению анизо-

тропии флуоресценции FAM-меченой ДНК (FAM-Nick), содержащей одноцепочечный разрыв [19]. Реакционные смеси, содержащие 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 40 mM NaCl, 1 mM ДТТ, 100 мкг/мл БСА, 0,5 M мочевины, 0–5 мкМ Sam68, 100 нМ PARP1 и 10 нМ ДНК (FAM-Nick), инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Измерения интенсивности флуоресценции образцов проводили в 384-луночном планшете («Corning», США) с использованием микропланшетного флуориметра CLARIOstar («GMB Labtech GmbH», Германия). Количественную обработку экспериментальных данных выполняли в программе MARS Data analysis («GMB Labtech GmbH», Германия) [19]. Зависимость изменения анизотропии флуоресценции от концентрации белка была обработана с использованием уравнения (4):

$$F = F_0 + (F_{\infty} - F_0) / [1 + (EC_{50} / C)^n], \quad (4)$$

где F_0 , F и F_{∞} – интенсивность флуоресценции раствора ДНК (FAM-Nick) при отсутствии белка, в присутствии белка в данной (C) и насыщающей концентрации соответственно; EC_{50} – концентрация белка, при которой $F - F_0 = (F_{\infty} - F_0) / 2$; n – коэффициент Хилла.

Связывание Sam68 с PAR анализировали методом задержки в геле. Реакционные смеси, содержащие 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 40 mM NaCl, 1 mM ДТТ, 100 мкг/мл БСА, 500 mM мочевины, 10 нМ [32 P]-меченой PAR, 0–5 мкМ Sam68, инкубировали при 37 °C в течение 5 мин. Затем в реакционные смеси добавляли буфер нанесения, содержащий 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 25% глицерина, 0,01% бромфенолового синего, и проводили электрофорез в неденатурирующих условиях в 5%-ном ПААГ при 4 °C с последующей радиоавтографией.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение рекомбинантного белка Sam68. Последовательность Sam68 была клонирована в вектор pQE30 для прокариотической системы экспрессии. Выбранная конструкция содержит в своем составе гексагистидиновую последовательность (His-tag), расположенную в N-концевой части относительно клонируемой белковой последовательности, и кодирует рекомбинантный His-tag-Sam68 [20]. Для анализа уровня экспрессии использовали несколько штаммов *E. coli*: BL21(DE3) (базовый штамм для наработки белка), BL21(DE3)GeneX (штамм со сниженной наработкой фоновых белков), BL21(DE3)plysS (штамм с контролем экспрессии целевого гена), Rosetta(DE3) (штамм, содержащий плазмиду с генами некоторых tРНК человека), Rosetta(DE3)plysS (штамм,

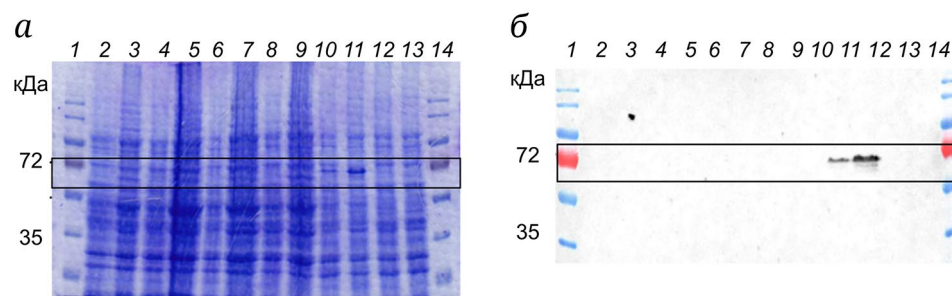


Рис. 1. Анализ экспрессии His-tag-Sam68 в лизате различных штаммов-продуцентов методом денатурирующего гель-электрофореза в 10%-ном Ds-Na-ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси R-250 (а) или методом вестерн-блота (б). Дорожки: 1 и 14 – маркер молекулярных масс («Bio-Rad», США); 2 и 3 – штамм BL21(DE3) до и после индукции; 4 и 5 – штамм BL21(DE3)GeneX до и после индукции; 6 и 7 – штамм BL21(DE3)pLysS до и после индукции; 8 и 9 – штамм Rosetta(DE3) до и после индукции; 10 и 11 – штамм Rosetta(DE3)pLysS до и после индукции; 12 и 13 – штамм Rosetta(DE3)GamiB до и после индукции

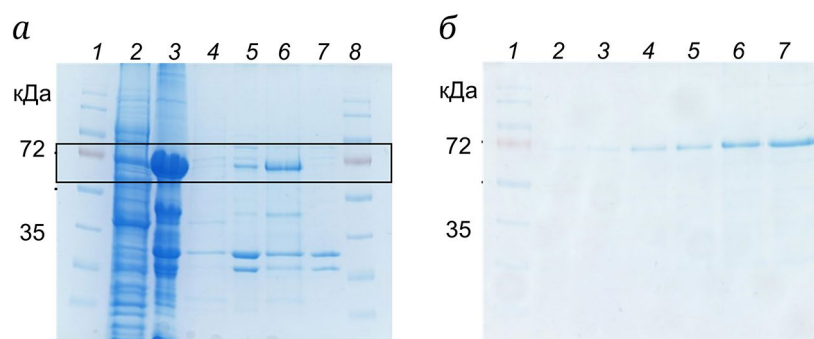


Рис. 2. При экспрессии в клетках *E. coli* Sam68 накапливается в виде телец включения. а – Анализ содержания His-tag-Sam68 в растворимой и нерастворимой фракциях методом денатурирующего гель-электрофореза в 10%-ном Ds-Na-ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси R-250. Дорожки: 1 и 8 – маркер молекулярных масс («Bio-Rad»); 2 – растворимая фракция после центрифугирования лизированных клеток; 3 – лизат штамма продуцента Rosetta(DE3)pLysS; 4 – растворимая фракция в 1 М мочеvine после центрифугирования лизированных клеток; 5 – нерастворимая фракция; 6 – растворимая фракция в 8 М мочеvine; 7 – нерастворимая фракция после обработки лизата клеток 8 М мочеvine. б – Анализ содержания белка после хроматографии на колонке с Ni-NTA. Дорожки: 1 – маркер молекулярных масс; 2 – 0,1 мкг; 3 – 0,2 мкг; 4 – 0,3 мкг; 5 – 0,4 мкг; 6 – 0,5 мкг; 7 – 1 мкг белка, полученные после элюции с Ni-NTA

содержащий плазмиду с генами некоторых тРНК человека и контролем экспрессии целевого гена), Rosetta(DE3)GamiB (штамм, содержащий плазмиду с геном тиоредуктазы), и проводили подбор условий экспрессии Sam68. Экспрессия целевого белка в клетках была визуально обнаружена при использовании штамма Rosetta(DE3)pLysS. Дополнительно был проведен анализ присутствия белка Sam68 в бактериальных лизатах методом вестерн-блот-анализа с использованием антител, специфичных к последовательности His-tag (рис. 1).

Штамм *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS и условия культивирования, оптимизированные в ходе выполнения предыдущего эксперимента, были использованы для наработки препаративного количества биомассы и последующего выделения рекомбинантного белка (рис. 2). Однако данный белок при экспрессии накапливался в клетках в форме телец включения. Включение в состав белка аффинных меток, таких как глутатион S-трансфераза (GST), мальтоза-связывающий белок (MBP) или малый

убиквитин-подобный белок (SUMO), часто способствует повышению растворимости рекомбинантных белков в водных растворах [20]. Поэтому последовательность гена Sam68 клонировали в вектор pBADM, кодирующий GST-Sam68. Согласно анализу количества белка GST-Sam68, содержащегося в растворимой и нерастворимой фракциях после лизиса клеток Rosetta(DE3)pLysS (рис. П1 в Приложении), основная масса белка GST-Sam68, так же как и в случае с His-tag-Sam68, находилась в тельцах включения. Поэтому для дальнейшего исследования был выбран His-tag-Sam68.

Оценка растворимости белка Sam68. Для изучения функциональной активности Sam68, в частности, его взаимодействие с PAR, ДНК или влияние на активность PARP1, необходимо было подобрать условия рефолдинга, то есть перевод Sam68 из нерастворимой в растворимую форму. В состав белка Sam68 входит структурированный домен STAR и многочисленные неструктурированные области, состоящие из повторяющихся моти-

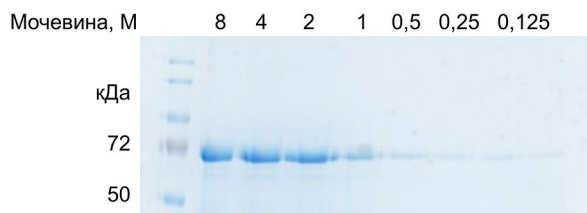


Рис. 3. Анализ растворимости Sam68 в мочеви-не методом денатурирующего гель-электрофореза в 10%-ном Ds-Na-ПААГ с последующим окрашива-нием Кумасси R-250. Реакционные смеси содержа-ли 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl, 0,1% NP-40, 7 мМ 2-меркаптоэтанола, 1 мкМ Sam68 и мочеви-ну в соответствующей концентрации (125 мМ–8 М)

вов, богатых пролином (P0–P5), аргинином/глици-ном (ди-RGG, ди-RG и три-RG) [21], поэтому Sam68, как и многие РНК-связывающие белки, содержа-щие неупорядоченные домены, склонен к агрега-ции [22]. Для поддержания неструктурированных белков в растворимом состоянии используются соединения, которые препятствуют агрегации бел-ков. Эти соединения можно объединить в следую-щие классы: хаотропные агенты (мочевина, NaI), космотропы (NaCl, KCl, MgSO₄) и осмолиты (глице-рин, триметиламиноксид (ТМАО), аргинин) [23]. Наиболее часто используемым реагентом для работы с внутренне неупорядоченными белками является мочевина, которая препятствует образо-ванию межмолекулярных водородных связей [23]. Была проведена оценка растворимости Sam68 в зависимости от концентрации мочевины в рас-творе. Видно, что Sam68 слабо растворим в бу-ферных растворах с концентрацией мочевины ниже 2 М (рис. 3).

Другими соединениями, которые широко ис-пользуются для ингибирования агрегации белков, являются аминокислота аргинин и ТМАО, отно-сящиеся к классу осмолитов [23]. Аргинин взаи-модействует с ароматическими и заряженными аминокислотными остатками в составе неупо-рядоченных участков белка за счет π-катионных взаимодействий и образования солевых мостиков соответственно. Взаимодействия между молекула-ми аргинина приводят к образованию кластеров, которые стерически ингибируют белок-белковые взаимодействия [24]. ТМАО применяется при ис-следованиях фолдинга белков для уменьшения денатурирующего эффекта мочевины. ТМАО обра-зует комплекс с мочевиной за счет гидрофобных взаимодействий и множественные ионные взаи-модействия между пептидным остовом и боко-выми аминокислотными радикалами белка, тем самым исключая молекулы мочевины из взаимо-действия с белком [25].

Оценка совместного влияния мочевины и ар-гинина или мочевины и ТМАО на растворимость белка Sam68 показала, что присутствие аргинина в концентрации больше 100 мМ в реакционной смеси значительно увеличивает растворимость Sam68, а при концентрации аргинина 300 мМ практически полностью восстанавливается рас-творимость Sam68 в водных растворах с низкой концентрацией мочевины (150 мМ) (рис. 4).

Влияние мочевины и аргинина на катали-тическую активность PARP1. Для исследования влияния Sam68 на активность PARP1 необходимо подобрать подходящие условия реакции. В анало-гичных работах, посвященных РНК-связывающе-му белку FUS, реакцию PAR-илирования про-

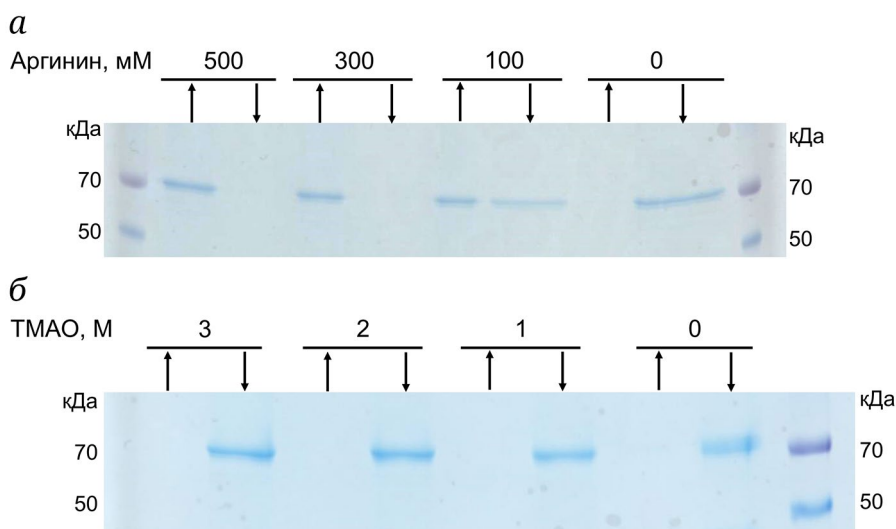


Рис. 4. Анализ растворимости Sam68 при низкой концентрации мочевины (150 мМ) в присутствии аргини-на (а) или ТМАО (б) методом денатурирующего гель-электрофореза в 10%-ном Ds-Na-ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси R-250. Реакционная смесь содержала 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 100 мМ NaCl, 0,1% NP-40, 1 мМ ДТТ, 150 мМ мочевины, 1 мкМ Sam68 и аргинин/ТМАО в указанной концентрации. Анализировали рас-творимую фракцию (↑) и осадок (↓)

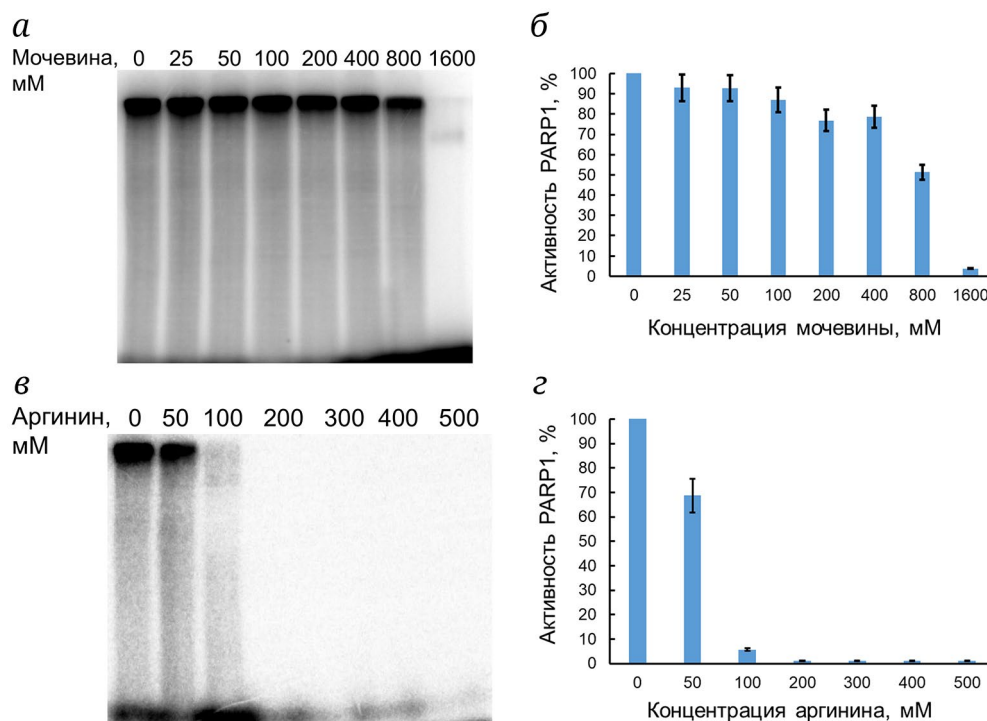


Рис. 5. Влияние мочевины (а и б) и аргинина (в и г) на каталитическую активность PARP1. а – Радиоавтограф 10%-ного Ds-Na-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции PAR-илирования в присутствии мочевины. б – Диаграмма, построенная после анализа распределения радиоактивности в геле, представленном на панели (а). Активность PARP1 при отсутствии мочевины принята за 100%. в – Радиоавтограф 10%-ного Ds-Na-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции PAR-илирования в присутствии аргинина. г – Диаграмма, построенная после анализа распределения радиоактивности в геле, представленном на панели (в). Активность PARP1 при отсутствии аргинина принята за 100%

водили в присутствии 300 мМ мочевины. Такая концентрация мочевины обеспечивала растворимость FUS в растворе и не ингибировала активность PARP1 [9, 26]. Аргинин увеличивает растворимость белков в водных растворах и, кроме того, не является денатурирующим агентом [27]. Поскольку Sam68 хорошо растворяется в водных растворах, содержащих мочевину и аргинин (рис. 3 и 4), необходимо было проанализировать влияние этих соединений на активность PARP1 (рис. 5).

Было установлено, что последовательное увеличение концентрации мочевины от 250 до 1600 мМ в реакционной смеси приводит к ингибированию реакции PAR-илирования. В случае использования концентрации мочевины в диапазоне 100–400 мМ наблюдалось незначительное снижение активности PARP1, тогда как при концентрации мочевины выше 800 мМ активность PARP1 была практически полностью подавлена. При концентрации аргинина больше 50 мМ в реакционной смеси наблюдается значительное ингибирование активности PARP1, тогда как эффект аргинина на растворимость Sam68 наблюдался при концентрации больше 100 мМ. Таким образом, аргинин оказывает сильное ингибирующее

действие на активность PARP1 в условиях поддержания Sam68 в растворимом состоянии. Поэтому для дальнейшего изучения влияния Sam68 на реакцию PAR-илирования были выбраны условия проведения реакции только в присутствии 500 мМ мочевины. При такой концентрации мочевины наблюдается лишь слабое ингибирование активности PARP1 при сохранении Sam68 в растворимой форме (рис. 3 и 5).

Влияние белка Sam68 на реакцию поли(ADP-рибозил)ирования. Ранее было показано, что Sam68 способен регулировать синтез PAR в клетке в ответ на повреждение ДНК, индуцируемое лазерной микрорадиацией, и способен стимулировать активность PARP1 *in vitro* [15]. В данной работе было проведено сравнение продуктов PAR-илирования белков, которые накапливаются в реакционной смеси при отсутствии и в присутствии Sam68. Влияние Sam68 на активность PARP1 было исследовано в кинетическом режиме реакции при различных соотношениях концентраций этих белков. Была оценена скорость реакции PAR-илирования в зависимости от концентрации Sam68. Из рис. 6, а видно, что в присутствии Sam68 происходит повышение уровня синтеза PAR. При отсутствии Sam68 реакция выходит на плато через

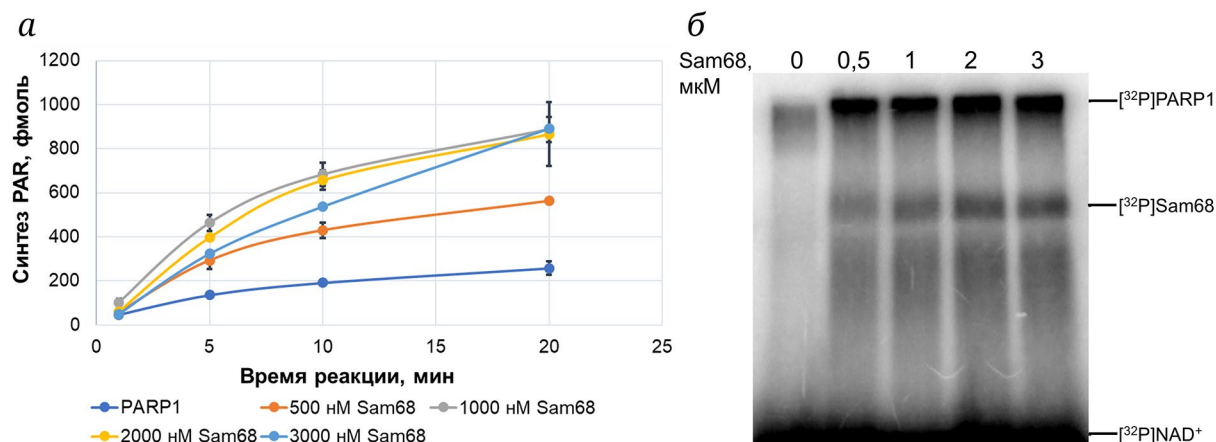


Рис. 6. Sam68 стимулирует активность PARP1. *а* – Кинетика уровня синтеза PAR в присутствии различных концентраций Sam68. Реакцию синтеза PAR проводили с использованием $[^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$ и останавливали перенесением аликвот реакционной смеси на бумажный фильтр Whatman, пропитанный ТХУ. На графиках приведены средние значения \pm стандартные отклонения для трех независимых экспериментов. *б* – Анализ авто-PAR-илирования PARP1 и транс-PAR-илирования Sam68 методом денатурирующего геле-электрофореза. Радиоавтограф 10%-ного Ds-Na-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции PAR-илирования белков

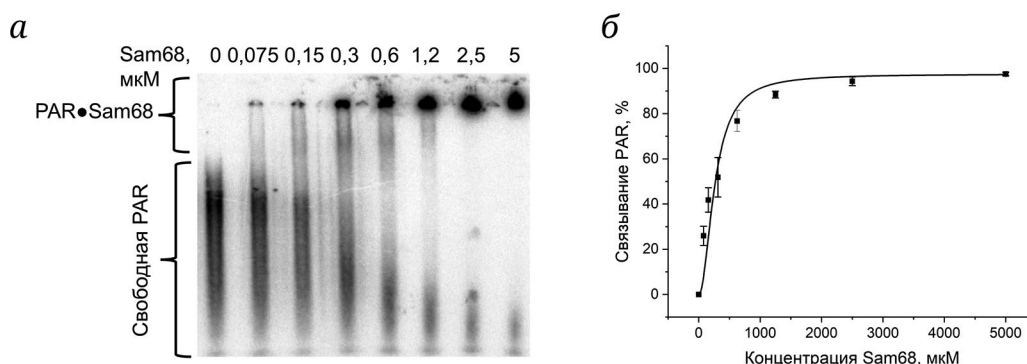


Рис. 7. Связывание PAR белком Sam68. *а* – Радиоавтограф нативного 5%-ного ПААГ, в котором проводилось разделение комплексов Sam68•PAR. *б* – Относительный уровень связывания Sam68 с PAR, оцененный по данным анализа электрофореграммы, представленной на панели (а). Сродство (EC_{50}) Sam68 к PAR определяли как концентрацию Sam68, при которой 50% PAR находится в комплексе. Реакционные смеси содержали 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 500 мМ мочевины, 100 мкг/мл БСА, 10 нМ $[^{32}\text{P}]$ -меченой PAR и Sam68 в указанных концентрациях (75 нМ–5 мкМ)

10 мин, а в присутствии Sam68 накопление PAR происходит и после 10 мин реакции. Кроме того, Sam68 подвергается PAR-илированию и стимулирует авто-модификацию PARP1 (рис. 6, б). Стоит отметить, что при увеличении концентрации Sam68 не наблюдалось значительного увеличения транс-PAR-илирования Sam68 (рис. 6, б). Кроме того, Sam68 не оказывает заметного влияния на начальную скорость синтеза PAR (табл. 2).

Таким образом, Sam68, подобно другим РНК-связывающим белкам, таким как YB-1 и FUS, PAR-илируется и увеличивает суммарный выход синтеза PAR.

Определение сродства Sam68 к нуклеиновым кислотам. Взаимодействие Sam68 с ДНК или PAR, формирующейся в процессе авто-модификации PARP1, может играть ключевую

роль в Sam68-зависимой регуляции активности PARP1 [28]. Эксперименты по анализу взаимодействия Sam68 с PAR проводили методом задержки в геле (рис. 7, а).

Согласно полученным данным, величина EC_{50} , кажущаяся константа диссоциации комплекса Sam68•PAR, составила 300 нМ. Методом анизотропии флуоресценции также была проведена оценка сродства Sam68 к ДНК (FAM-Nick), содержащей одноцепочечный разрыв, и величина EC_{50} для комплекса Sam68•ДНК составила 500 нМ (рис. 8). Таким образом, Sam68 проявляет специфическое сродство к PAR и поврежденной ДНК.

Таким образом, способность Sam68 стимулировать активность PARP1 может зависеть от эффективности его взаимодействия с поврежденной ДНК и/или PAR.

Таблица 2. Начальные скорости реакции (фмоль/мин)* синтеза PAR в присутствии различных концентраций Sam68

PARP1 (без Sam68)	500 нМ Sam68	1000 нМ Sam68	2000 нМ Sam68	3000 нМ Sam68
45 ± 5	60 ± 10	100 ± 15	60 ± 10	50 ± 10

Приложение. * – Начальные скорости реакции синтеза PAR (фмоль/мин) были получены в результате обработки индивидуальных кривых (рис. 6, а), описываемых уравнением (3), и представлены как средние значения ± стандартное отклонение для трех независимых экспериментов.

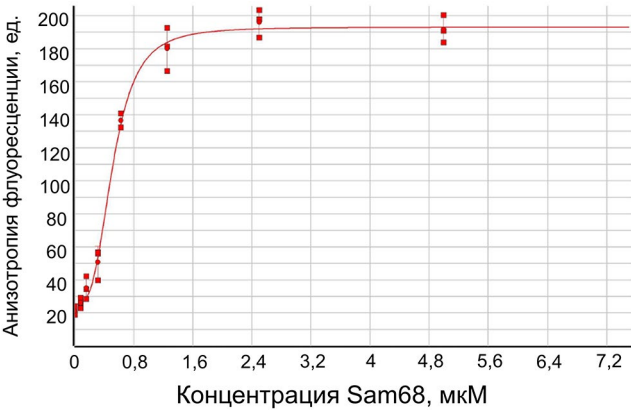


Рис. 8. Сродство Sam68 к поврежденной ДНК. Изменение анизотропии флуоресценции ДНК (FAM-Nick) в присутствии различных концентраций Sam68. Реакционные смеси содержали 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 мкг/мл БСА, 500 мМ мочевины, 10 нМ ДНК (FAM-Nick) и Sam68 в указанных концентрациях

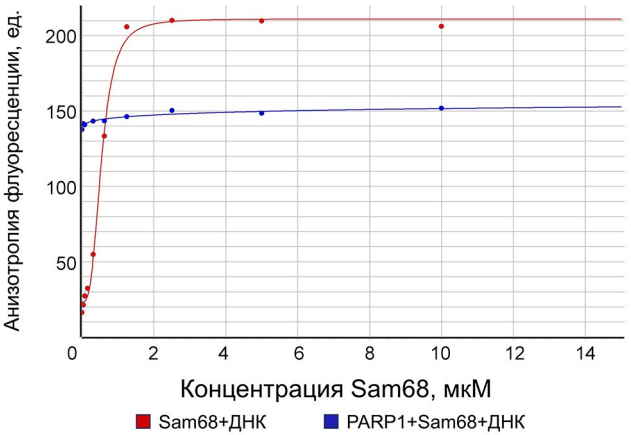


Рис. 9. Исследование комплексообразования PARP1 и Sam68 с ДНК (FAM-Nick) методом анизотропии флуоресценции. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 500 мМ мочевины, 10 нМ ДНК (FAM-Nick), 0–10 мкМ Sam68 и 100 нМ PARP1

Методом флуоресцентного титрования была изучена возможность формирования комплекса Sam68•PARP1 на поврежденной ДНК (FAM-Nick) (рис. 9).

При последовательном увеличении концентрации Sam68 при отсутствии PARP1 наблюдается увеличение уровня анизотропии флуоресценции (рис. 9, красная линия), что свидетельствует

о том, что происходит формирование комплекса Sam68 с поврежденной ДНК. При добавлении Sam68 к предварительно сформированному комплексу PARP1•ДНК не наблюдалось значительного увеличения уровня анизотропии флуоресценции (рис. 9, синяя линия), что указывает на то, что формирования тройного комплекса Sam68•PARP1•ДНК не происходит.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время поиск ингибиторов ключевых ферментов и факторов репарации ДНК является одним из перспективных направлений в создании эффективной терапии для лечения онкологических заболеваний. Фермент PARP1 является ключевым регулятором процессов репарации ДНК в клетке. Накапливается все больше данных о том, что в репарацию ДНК могут быть вовлечены РНК-связывающие белки, необходимые для ее регуляции [8]. Sam68 – это мультифункциональный белок, участвующий во многих клеточных процессах, как например, транспорт мРНК из ядра в цитоплазму, стабилизация мРНК, альтернативный сплайсинг [29, 30]. Sam68 является регулятором экспрессии генов и взаимодействует со многими транскрипционными факторами [29]. Кроме того, в недавнем исследовании [15] была описана роль Sam68 как возможного регулятора синтеза PAR в клетке. Однако, несмотря на установленную функцию Sam68 как кофактора PARP1, детального механизма влияния этого белка на реакцию PAR-илирования не было предложено.

В данной работе был разработан простой и эффективный метод получения и очистки рекомбинантного белка Sam68 из биомассы клеток *E. coli*, что предполагает выделение Sam68 из телец включения с последующей хроматографией на Ni-NTA.

Sam68 обладает мультидоменной организацией из N- и C-концевых неупорядоченных участков и центрального упорядоченного РНК-связывающего домена. Благодаря своей конформационной лабильности неупорядоченные участки образуют множественные обратимые взаимодействия с белками-партнерами, обеспечивая вовлеченность

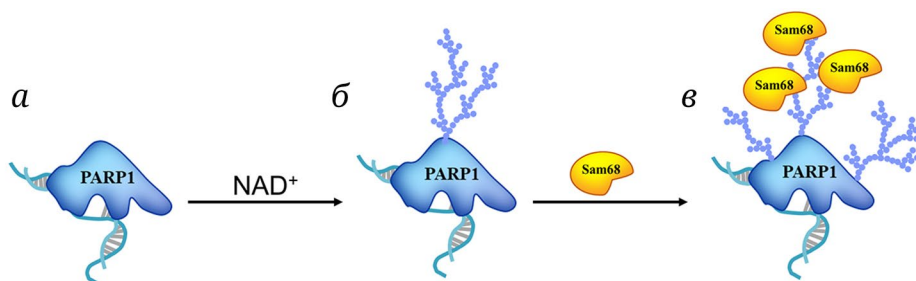


Рис. 10. Гипотетический механизм регуляции активности PARP1 белком Sam68. *а* – Образование комплекса PARP1 с поврежденной ДНК. *б* – Авто-поли(ADP-рибозил)ирование PARP1. *в* – Образование комплекса Sam68 с PAR, ковалентно присоединенной к PARP1. Связываясь с PAR, ковалентно присоединенной к PARP1, Sam68 экранирует отрицательный заряд этого полимера, стабилизируя комплекс PARP1 с поврежденной ДНК, и тем самым стимулирует синтез поли(ADP-рибозы)

Sam68 практически во все клеточные процессы [21]. Однако вследствие такой доменной организации Sam68 склонен к агрегации в водных растворах, что затрудняет изучение его биохимических свойств. Для изучения роли Sam68 в регуляции активности PARP1 в качестве соединений, которые могли бы повлиять на растворимость Sam68 в водных растворах, были проанализированы мочевины, аргинин и ТМАО. Для дальнейшей работы в качестве вспомогательного соединения для улучшения растворимости Sam68 была выбрана мочевины в концентрации 500 мМ. С использованием подобранных условий для растворимости Sam68 была изучена его роль как белка-регулятора реакции PAR-илирования.

Было оценено влияние рекомбинантного Sam68 на каталитическую активность PARP1 при различных соотношениях концентраций этих белков. Впервые показано, что Sam68 является мишенью PAR-илирования *in vitro*. Sam68 стимулирует активность PARP1, увеличивая суммарный уровень синтеза PAR, но оказывает слабое влияние на начальную скорость реакции PAR-илирования. Возможно, что стимуляция активности PARP1 РНК-связывающими белками происходит в тройном комплексе на поврежденной ДНК или на PAR, как было нами показано для YB-1 [13, 14]. Несмотря на то что Sam68 подробно охарактеризован как РНК-связывающий белок [29, 31], информация о взаимодействии Sam68 с ДНК или PAR в литературе отсутствует. Впервые была проведена количественная оценка комплексообразования Sam68 с поврежденной ДНК и с PAR. Методом анизотропии флуоресценции было показано, что Sam68 не образует тройной комплекс с PARP1 на поврежден-

ной ДНК (Sam68•PARP1•ДНК). Поэтому наиболее вероятным является предположение о том, что регуляция активности PARP1 осуществляется за счет взаимодействия Sam68 с полимером ADP-рибозы, ковалентно присоединенным к PARP1 в процессе активации. Sam68, образуя комплекс с синтезируемым полимером ADP-рибозы, способен стабилизировать комплекс PAR-илированной PARP1 с ДНК, продлевая время пребывания PARP1 в активном состоянии и тем самым стимулируя синтез PAR (рис. 10).

Вклад авторов. О.И. Лаврик, М.В. Суханова – концепция и руководство работой; Е.А. Бережнев, К.Н. Науменко, Т.А. Кургина – проведение экспериментов; К.Н. Науменко, Е.А. Бережнев, М.В. Суханова, О.И. Лаврик – обсуждение результатов исследования; К.Н. Науменко, Е.А. Бережнев, М.В. Суханова, О.И. Лаврик – написание текста; М.В. Суханова, О.И. Лаврик – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00112) и в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300041-4 (использование оборудования и инфраструктуры).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vermeij, W. P., Hoeijmakers, J. H., and Pothof, J. (2016) Genome integrity in aging: human syndromes, mouse models, and therapeutic options, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **56**, 427-445, <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124316>.

2. Althaus, F. R., Kleczkowska, H. E., Malanga, M., Müntener, C. R., Pleschke, J. M., et al. (1999) Poly ADP-ribosylation: a DNA break signal mechanism. *Mol. Cell. Biochem.*, **193**, 5-11, https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8740-2_1.
3. D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G. G. (1999) Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions, *Biochem. J.*, **342** (Pt 2), 249-268, <https://doi.org/10.1042/bj3420249>.
4. Huang, D., and Kraus, W. L. (2022) The expanding universe of PARP1-mediated molecular and therapeutic mechanisms, *Mol. Cell*, **82**, 2315-2334, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.02.021>.
5. Alemasova, E. E., and Lavrik, O. I. (2019) Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3811-3827, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz120>.
6. Ayyappan, V., Wat, R., Barber, C., Vivel, C. A., Gauch, K., Visanpattanasin, P., Cook, G., Sazeides, C., and Leung, A. K. L. (2021) ADPriboDB 2.0: an updated database of ADP-ribosylated proteins, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D261-D265, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa941>.
7. Corley, M., Burns, M. C., and Yeo, G. W. (2020) How RNA-binding proteins interact with RNA: molecules and mechanisms, *Mol. Cell*, **78**, 9-29, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.011>.
8. Altmeyer, M., Neelsen, K. J., Teloni, F., Pozdnyakova, I., Pellegrino, S., Gröfte, M., Rask, M. D., Streicher, W., Jungmichel, S., Nielsen, M. L., and Lukas, J. (2015) Liquid demixing of intrinsically disordered proteins is seeded by poly(ADP-ribose), *Nat. Commun.*, **6**, 8088, <https://doi.org/10.1038/ncomms9088>.
9. Singatulina, A. S., Hamon, L., Sukhanova, M. V., Desforges, B., Joshi, V., Bouhss, A., Lavrik, O. I., and Pastré, D. (2019) PARP-1 activation directs FUS to DNA damage sites to form PARG-reversible compartments enriched in damaged DNA, *Cell Rep.*, **27**, 1809-1821.e5, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.031>.
10. Neelamraju, Y., Hashemikhabir, S., and Janga, S. C. (2015) The human RBPome: from genes and proteins to human disease, *J. Proteomics*, **127** (Pt A), 61-70, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.04.031>.
11. Alemasova, E. E., Naumenko, K. N., Pestryakov, P. E., and Lavrik, O. I. (2017) Production, purification of the recombinant analog of Y-box-binding protein 1 and its interaction with poly(ADP-ribose), RNA, single- and double-stranded DNAs, *Biopolym. Cell*, **33**, 214-220, <https://doi.org/10.7124/bc.000954>.
12. Alemasova, E. E., Naumenko, K. N., Kurgina, T. A., Anarbaev, R. O., and Lavrik, O. I. (2018) The multifunctional protein YB-1 potentiates PARP1 activity and decreases the efficiency of PARP1 inhibitors, *Oncotarget*, **9**, 23349-23365, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25158>.
13. Naumenko, K. N., Sukhanova, M. V., Hamon, L., Kurgina, T. A., Alemasova, E. E., Kutuzov, M. M., Pastré, D., and Lavrik, O. I. (2020) Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity by Y-box-binding protein 1, *Biomolecules*, **10**, 1325, <https://doi.org/10.3390/biom10091325>.
14. Naumenko, K. N., Sukhanova, M. V., Hamon, L., Kurgina, T. A., Anarbaev, R. O., Mangerich, A., Pastré, D., and Lavrik, O. I. (2022) The C-terminal domain of Y-box binding protein 1 exhibits structure-specific binding to poly(ADP-ribose), which regulates PARP1 activity, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **10**, 831741, <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.831741>.
15. Sun, X., Fu, K., Hodgson, A., Wier, E. M., Wen, M. G., Kamenyeva, O., Xia, X., Koo, L. Y., and Wan, F. (2016) Sam68 is required for DNA damage responses via regulating poly(ADP-ribosyl)ation, *PLoS Biol.*, **14**, e1002543, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002543>.
16. Gagné, J. P., Pic, E., Isabelle, M., Krietsch, J., Ethier, C., Paquet, E., Kelly, I., Boutin, M., Moon, K. M., Foster, L. J., and Poirier, G. G. (2012) Quantitative proteomics profiling of the poly(ADP-ribose)-related response to genotoxic stress, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 7788-7805, <https://doi.org/10.1093/nar/gks486>.
17. Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures, *Protein expr. purif.*, **41**, 207-234, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>.
18. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
19. Kurgina, T. A., Anarbaev, R. O., Sukhanova, M. V., and Lavrik, O. I. (2018) A rapid fluorescent method for the real-time measurement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity, *Anal. Biochem.*, **545**, 91-97, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.12.033>.
20. Costa, S., Almeida, A., Castro, A., and Domingues, L. (2014) Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system, *Front. Microbiol.*, **5**, 63, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00063>.
21. Lukong, K. E., and Richard, S. (2003) Sam68, the KH domain-containing superSTAR. *Biochim. Biophys. Acta*, **1653**, 73-86, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2003.09.001>.
22. Duan, Y., Du, A., Gu, J., Duan, G., Wang, C., Gui, X., Ma, Z., Qian, B., Deng, X., Zhang, K., Sun, L., Tian, K., Zhang, Y., Jiang, H., Liu, C., and Fang, Y. (2019) PARylation regulates stress granule dynamics, phase separation, and neurotoxicity of disease-related RNA-binding proteins, *Cell Res.*, **29**, 233-247, <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0141-z>.
23. Churion, K. A., and Bondos, S. E. (2012) Identifying solubility-promoting buffers for intrinsically disordered proteins prior to purification, *Methods Mol. Biol.*, **896**, 415-427, https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3704-8_28.

24. Shukla, D., and Trout, B. L. (2010) Interaction of arginine with proteins and the mechanism by which it inhibits aggregation, *J. Phys. Chem. B*, **114**, 13426-13438, <https://doi.org/10.1021/jp108399g>.
25. Sarma, R., and Paul, S. (2013) Exploring the molecular mechanism of trimethylamine-N-oxide's ability to counteract the protein denaturing effects of urea, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 5691-5704, <https://doi.org/10.1021/jp401750v>.
26. Mamontova, E. M., Clément, M. J., Sukhanova, M. V., Joshi, V., Bouhss, A., Rengifo-Gonzalez, J. C., Desforges, B., Hamon, L., Lavrik, O. I., and Pastré, D. (2023) FUS RRM regulates poly(ADP-ribose) levels after transcriptional arrest and PARP-1 activation on DNA damage, *Cell Rep.*, **42**, 113199, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113199>.
27. Arakawa, J., Uegaki, M., and Ishimizu, T. (2011) Effects of L-arginine on solubilization and purification of plant membrane proteins, *Protein Expr. Purif.*, **80**, 91-96, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.05.014>.
28. Teloni, F., and Altmeyer, M. (2016) Readers of poly(ADP-ribose): designed to be fit for purpose, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 993-1006, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1383>.
29. Lin, Q., Taylor, S. J., and Shalloway, D. (1997) Specificity and determinants of Sam68 RNA binding. Implications for the biological function of K homology domains, *J. Biol. Chem.*, **272**, 27274-27280, <https://doi.org/10.1074/jbc.272.43.27274>.
30. Gibson, T. J., Thompson, J. D., and Heringa, J. (1993) The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid, *FEBS Lett.*, **324**, 361-366, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80152-k](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80152-k).
31. Chen, T., Damaj, B. B., Herrera, C., Lasko, P., and Richard, S. (1997) Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain, *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 5707-5718, <https://doi.org/10.1128/MCB.17.10.5707>.

RNA-BINDING PROTEIN Sam68 EFFECTS POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE 1 ACTIVITY

K. N. Naumenko, E. A. Berezhnev, T. A. Kurgina, M. V. Sukhanova, and O. I. Lavrik*

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru*

Taking into account the involvement of RNA-binding proteins in the regulation of the activity of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), a key factor of DNA repair, the effect of the intrinsically disordered protein Sam68 (Src-associated substrate during mitosis of 68 kDa) on the catalytic activity of this enzyme was studied. Plasmid containing the coding sequence of the Sam68 protein was obtained. Using the obtained construct, the conditions for Sam68 expression in *Escherichia coli* cells were optimized and a procedure for protein purification was developed. It was found that Sam68 is able to regulate the catalytic activity of PARP1, stimulating auto-poly(ADP-ribosylation) of PARP1, interacting with damaged DNA and purified poly(ADP-ribose) (PAR). Based on the experimental data, a hypothesis on the mechanism of the PARP1 activity stimulation by the Sam68 protein was proposed, which consists in the formation of a complex of Sam68 with poly(ADP-ribosylated) PARP1. Sam68 interacts with PAR, shielding its negative charge, which increases the time of PARP1 in the complex with damaged DNA and the overall yield of PAR synthesized by this enzyme.

Keywords: DNA repair, PARP1, RNA-binding proteins, Sam68, ADP-ribosylation

ПОСТСЕЛЕКЦИОННОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ АПТАМЕРОВ: СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АФФИННОСТИ ДНК-АПТАМЕРОВ К РЕКОМБИНАНТНОМУ ВНЕКЛЕТОЧНОМУ ДОМЕНУ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА

© 2024 В.Л. Моисеенко^{1,2*}, О.М. Антипова^{1,3}, А.А. Рыбина¹, Л.И. Мухаметова¹,
С.А. Ерёмин¹, Г.В. Павлова^{2,3}, А.М. Копылов^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: valerian.moiseenko@gmail.com

² Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии
имени академика Н.Н. Бурденко Минздрава России, 125047 Москва, Россия

³ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.09.2024

После доработки 15.10.2024

Принята к публикации 16.10.2024

В работе дана сравнительная оценка аффинности сконструированных ДНК-аптамеров к внеклеточному домену рецептора эпидермального фактора роста человека (EGFR*). Суммированы данные по аффинности 20 аптамеров, опубликованные ранее. Разнообразие способов селекции аптамеров и методов измерения аффинности требует унификации алгоритмов сравнения. Это необходимо и для следующего важного этапа – конструирования аптамеров для постселекционной подгонки к белку-мишени EGFR*. В данной работе сравнили аффинность ДНК-аптамеров из двух семейств, U31 и U2, полученных ранее Wu et al. из одной селекции [Wu et al. (2014) *PLoS One*, 9, e90752], и их производных аптамерных конструкций GR20, U2s и Gol1, полученных нами рациональным дизайном. Аффинность к EGFR* измеряли двумя разными методами: равновесным в растворе – поляризацией флуоресценции FAM-меченых аптамеров, и кинетическим на поверхности – интерферометрией биослоёв с иммобилизованными аптамерами. В отличие от значений равновесных констант, полученных титрованием аптамера белком и выраженных в единицах концентрации последнего, более информативным оказался анализ профилей самого титрования, а также кинетики взаимодействия, которые позволили определить влияние на аффинность даже субтильных изменений в аптамерах и их конструкциях. Сформулированы гипотезы о соотношениях «структура–функция» и механизмах узнавания. Данные, полученные для набора аптамерных конструкций, критичны для перехода к изучению взаимодействия аптамеров с мишенями рецептора эпидермального фактора роста в составе клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аптамер, EGFR, аффинность, интерферометрия биослоёв, поляризация флуоресценции.

DOI: 10.31857/S0320972524120032 **EDN:** IFWHNZ

ВВЕДЕНИЕ

Целевое взаимодействие молекул в живых клетках обеспечивается молекулярным узнаванием. Простым классическим примером узнавания являются Уотсон-Криковские комплементарные

взаимодействия оснований в нуклеиновых кислотах. Пространственные узнающие элементы, будь то молекулы или супрамолекулярные комплексы и их конструкции, назовём МУЗЭли – Молекулярные Узнающие Элементы. Молекулярное узнавание используют и для целевого воздействия на

Принятые сокращения: ИБС – интерферометрия биослоёв; K_d – кажущаяся равновесная константа диссоциации; ПФ – поляризация флуоресценции; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; EGFR* – рекомбинантный внеклеточный домен рецептора эпидермального фактора роста человека.

* Адресат для корреспонденции.

мишени в диапазоне от молекул до целого организма. Типичные природные МУЗЭли – это антигены или рецепторы; путём их имитации создают искусственные МУЗЭли на полипептидной основе: различные варианты антител, пептиды, скаффолды. На принципиально иной химической основе, полинуклеотидной, создаются так называемые аптамеры – «химические антитела» [1, 2].

Создание аптамеров происходит в два этапа: сначала получают первичные аптамеры путём селекции к мишени, затем их подгоняют к мишени путём конструирования для выполнения конкретных задач [3, 4]. Основные характеристики МУЗЭлей – аффинность и специфичность, для определения которых существует много методов [5]. Все методы можно условно разбить на две группы: изучение взаимодействия в растворе и использование сенсорных поверхностей.

Данная работа посвящена изучению аффинности ДНК-аптамеров к рекомбинантному внеклеточному домену рецептора эпидермального фактора роста человека (EGFR*). При взаимодействии внеклеточного домена трансмембранного рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) с эпидермальным фактором роста (EGF) рецептор димеризуется, автофосфорилируется и запускает каскад процессов, активирующих транскрипционные факторы, что изменяет экспрессию генов и определяет деление клеток [6, 7]. EGFR рекомендован ВОЗ как значимый молекулярный онкомаркер для классификации опухолей головного мозга. В данной работе полученные ранее 20 известных анти-EGFR-аптамеров объединены в 5 групп: РНК-аптамеры [8–14]; ДНК-аптамеры серии TuTu [15]; ДНК-аптамеры серии U, в том числе производные (аптамеры GR20 и GR200) [16–17]; ДНК-аптамеры 2369 [18] и аптамеры, полученные Damase et al. [19] (LINN2 и KM4) (табл. 1). Аптамеры были получены разными методами селекции, аффинность аптамеров измерена разными методами, что делает невозможным их сравнение. В работе выбраны ДНК-аптамеры двух семейств, U31 и U2. Сконструированы их производные и определена аффинность к белку EGFR* двумя методами: в растворе – поляризацией флуоресценции (ПФ), и на поверхности сенсора с иммобилизованными аптамерами – интерферометрией биослоёв (ИБС). Использованный сравнительный серийный подход создал условия для дальнейшего изучения аффинности анти-EGFR ДНК-аптамеров к белку EGFR в составе клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Олигонуклеотиды. Меченные по 5'-концу 5(6)-карбоксифлуоресцеином (FAM) или биотином

анти-EGFR ДНК-аптамеры (табл. 2) синтезированы, очищены и лиофилизированы («ГенТерра», Россия).

Моделирование вторичной структуры анти-EGFR ДНК-аптамеров. Моделирование вторичной структуры ДНК-аптамеров проводили с помощью сервера RNAfold web server, пакета ViennaRNA Web Services, с энергетическими параметрами для ДНК, разработанными на основе метода ближайших соседей для оценки стабильности вторичных структур нуклеиновых кислот [22, 23]. Параметры для ДНК выводятся на основе экспериментальных данных и используются в компьютерных программах для предсказания вторичных структур на основе минимума свободной энергии [23–25].

Определение кажущихся констант диссоциации (K_d) методом ПФ. Бычий сывороточный альбумин (БСА, $M \sim 66$ кДа) получен от «Компании Хеликон» (Россия). Рекомбинантный внеклеточный домен рецептора эпидермального фактора роста человека (EGFR*, кат. номер 1095-ER-002, лот номер ACJ0818021) куплен у «R&D Systems» (США). Растворы аптамеров (0,5 мкМ) готовили в буфере 1 (5 мМ Tris-HCl (pH 7), 140 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$). Раствор EGFR* (29 нМ) готовили в буфере 1, содержащем 0,05% (v/v) Tween 20 и 1 мг/мл БСА.

К 510 мкл раствора (9,8 нМ) флуоресцентно меченного аптамера добавляли 1–50 мкл раствора белка (шаг изменения концентрации EGFR* в растворе – 0,4–0,6 нМ), выдерживали при комнатной температуре 2–3 мин и проводили измерение на приборе SENTRY 200 («Ellie», США). Титрование проводили путём изменения концентрации белка, значения флуоресценции (I) и поляризации флуоресценции (mP) измеряли трижды, результаты представляли в виде средних значений \pm SD. В контрольном опыте титровали буферным раствором с БСА без EGFR*. Расчёт K_d проводили с использованием программы OriginPro на основе уравнения Хилла [26, 27]:

$$f_b = \frac{B_{\max} \cdot [Protein]^n}{K_d^n + [Protein]^n}, \quad (1)$$

где f_b – доля связанного аптамера; B_{\max} – максимальный сигнал специфического связывания; n – коэффициент Хилла; $[Protein]$ – концентрация белка-мишени; K_d – константа диссоциации комплекса аптамер-белок.

Определение кинетических констант ассоциации и диссоциации, а также K_d методом ИБС. Растворы EGFR* готовили последовательным разбавлением в калий-фосфатном буфере (буфер 2), содержащем 8 мМ Na_2HPO_4 , 1,5 мМ KH_2PO_4 , 137 мМ NaCl, 8,5 мМ KCl (pH 7,4), в концентрациях 0,8–51,2 нМ, после чего вносили в лунки 96-луночного планшета («Greiner», Германия) по 200 мкл. Растворы аптамеров (2 мкМ) готовили в буфере 1.

Таблица 1. Характеристики известных анти-EGFR-аптамеров

Аптамер	Тип	Мишень для селекции	Метод определения K_d	K_d , нМ
J18 [8]	РНК	EGFR*	связывание на фильтрах	7
E07 [9]	РНК	rhEGFR-Fc	проточная цитофлуориметрия	209 ± 46 [10]
			связывание на фильтрах	2,4 ± 0,2 [9]
ME07 [11]	РНК	EGFR*	ИБС с EGFR*	0,3 [12]
Производные ME07 [13]	РНК	EGFR-Fc	ELISA с EGFR-Fc	MinE07 3,70 ± 0,38 MinE07-U-Ph 359 ± 0,82 MinE07-U-Vi 4,62 ± 0,48 MinE07-U-I 2,05 ± 0,26 MinE07-UA 1,53 ± 0,13 MinE07UA' 3,39 ± 0,71 MinE07UB 1,47 ± 0,54 MinE07UC 1,23 ± 0,10 MinE07UC' 1,11 ± 0,45
CL4 [14]	РНК	клеточный SELEX (линия клеток A549)	связывание на фильтрах с EGFR*	10
TuTu19 [15]	ДНК	EGFR*	проточная цитофлуориметрия (иммобилизованный EGFR*)	74 ± 7
TuTu20 [15]				85 ± 10
TuTu21 [15]				78 ± 5
TuTu22 [15]				56 ± 7
U2 [16]	ДНК	клеточный SELEX (линия клеток U87 с суперэкспрессией EGFRvIII)	аптаферментный анализ	3,4 ± 1,0
U31 [16]			аптаферментный анализ	8,1 ± 2,4
			ИБС с EGFR*	3,7 ± 0,7 [17]
GR20 [17]	ДНК		ИБС с EGFR*	5,0 ± 2,0
GR200 [17]	ДНК			4,6 ± 1,1
2369-1-1 [18]	ДНК	EGFR*	связывание на фильтрах	11,7
2369-11-1 [18]				6,3
2369-12-1 [18]				7,1
2369-27-1 [18]				0,62
2369-27-2 – укороченный 2369-27-1 [18]				0,99
LINN2 [19]	ДНК	EGFR*	термофлуориметрический анализ (TFA)	9 ± 3
KM4 [20]	ДНК	гибридный SELEX: EGFR* + клеточная линия A549	термофлуориметрический анализ	~1
			проточная цитофлуориметрия	46

Примечание. ME07-U-X – аптамеры, содержащие в положении C5 модификации: U-Ph – фенильную группу, U-Vi – винильную группу, U-I – йод. MinE07-U-Ph, MinE07-U-Vi и MinE07-U-I имеют однородную модификацию всех уридинов. MinE07UA, MinE07UB и MinE07UC – экспериментально полученные укороченные варианты ME07, содержащие разные модификации U. MinE07UA', MinE07UC' – ожидаемые полноразмерные версии экспериментально полученных модифицированных усечённых вариантов. rhEGFR-Fc – рекомбинантный слитый белок EGFR человека с Fc-фрагментом иммуноглобулина; EGFR* – рекомбинантный внеклеточный домен рецептора эпидермального фактора роста человека; ИБС – интерферометрия биослоёв.

Таблица 2. Первичная структура анти-EGFR ДНК-аптамеров

Название	Последовательность (5'→3')
U31 [16]	ATCCAGAGTGACGCAGCATTTGTTTAATATGTTTTTAATCCCTTGTGGTGTGTTGTGGACACGGTGGCTTAGT
GR20 [17]	ACGCACCATTTGTTTAATATGTTTTTAATCCCTTGTGGTGTGT
U2 [16]	ATCCAGAGTGACGCAGCATTTTGACGCTTTATCCTTTTCTTATGGCGGGATAGTTTCGTGGACACGGTGGCTTAGT
U2s	CGCAGCATTTTGACGCTTTATCCTTTTCTTATGGCGGGATAGTTTCGTG
Gol1 [21]	GCCGGCATTTTGACGCCGCCCGGCTGCTTATGCTCCGGGGCATATGGC

Перед экспериментом биосенсоры Streptavidin (SA) (ForteBio; «Sartorius», Германия) гидратировали в буфере 1 в течение 10 мин, затем помещали на 10 мин в 2-мкМ раствор биотинилированного аптамера. Стадия ассоциации регистрировалась на приборе Octet R2 (ForteBio; «Sartorius») при помещении сенсора с иммобилизованным аптамером в лунки с образцами EGFR* с возрастающей концентрацией. Регистрацию базовой линии, стадию диссоциации и отмывки сенсора проводили в буфере 2. Продолжительность стадии ассоциации – 360 с, стадии диссоциации – 210 с. Регенерацию сенсоров проводили 3-кратным последовательным погружением на 5 с в 1 М раствор гидрохлорида этаноламина и буфер 2.

Обработку полученных сенсограмм проводили с помощью программы OriginPro 2020 в соответствии с моделью связывания Ленгмюра 1 : 1 [28]. Значения констант скорости комплексной ассоциации (k_{on}) и диссоциации (k_{off}) определяли с использованием экспоненциальной аппроксимации сенсограмм: функция BoxLucas1 для стадии ассоциации, функция Exp2PMod1 – для стадии диссоциации. Параметры ($k_{on} \cdot [A] + k_{off}$), где $[A]$ – концентрация добавленного в ходе эксперимента белка, каждой сенсограммы наносили на график зависимости от концентрации белка в растворе (С, нМ). Значение тангенса угла наклона из линеаризации графика для каждого комплекса аптамер–белок соответствует константе скорости ассоциации. Кажущуюся константу диссоциации kK_d рассчитывали по уравнению:

$$kK_d = k_{off}/k_{on}. \quad (2)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Построение моделей возможных вторичных структур анти-EGFR ДНК-аптамеров. Предполагаемые вторичные структуры анти-EGFR ДНК-аптамеров U2 и U31, отобранных в результате SELEX, и их производных U2s, Gol1 (из U2) и GR20 (из U31) представлены на рис. 1. Структуры

получены на основе анализа результатов, предлагаемых программой The ViennaRNA Package, и визуализированы с помощью Java-апплета VARNA.

Анализ возможных вторичных структур для семейства ДНК-аптамеров U31. В качестве базовой модели для нумерации нуклеотидов и элементов вторичной структуры выбран укороченный модифицированный вариант GR20. Первый нуклеотид A1 GR20 соответствует A11 в исходном аптамере U31. Аптамер GR20 получен путём удаления 5'- и 3'-концевых последовательностей (1–10 и 57–76). Концевой двутяжевой участок шпильки III-1 состоит из 9 пар нуклеотидов, при этом в мутантной форме GR20 C6 заменён на G6 (пара C6–G41 в GR20 вместо противостояния G6–G41 в U31); внутренняя петля П-1-1 состоит из 4-х нуклеотидов (T10–T13), петля П-1-2 имеет 8 нуклеотидов (T30–T37); стебель шпильки III-2 состоит из 4-х пар нуклеотидов и образует блок из трёх остатков Т с петлёй П-1-1; петля П-2 и стебель шпильки III-2 содержат блок из 6 остатков Т. На рис. 1, а и б в аптамерах серии U31 красным и фиолетовым контуром выделены 2 блока нуклеотидов, встречающихся в соответствующих петлях аптамеров серии U2.

Анализ возможных вторичных структур для семейства аптамеров U2. В качестве базовой модели для нумерации нуклеотидов и элементов вторичной структуры выбрана укороченная версия U2s. Первый нуклеотид C1 U2s соответствует C12 в исходном аптамере U2. Аптамер U2s получен путём удаления 5'- и 3'-концевых последовательностей (1–10 и 57–76). В U2s концевой двутяжевой участок шпильки III-1 состоит из 3-х пар нуклеотидов, включая пару G–T; стебель шпильки III-2 состоит из 3-х пар нуклеотидов; петля П-2 – из 8 нуклеотидов; двучепочный участок III-3 состоит из 7 пар нуклеотидов; петля П-3 состоит из 11 нуклеотидов. Петли П-2 и П-3 родительского U2 и укороченного варианта U2s содержат блоки из 4-х остатков Т. В исходно полученных моделях аптамеров U2 и U2s в шпильке III-3 в начале и в конце добавлено по одной паре G–T.

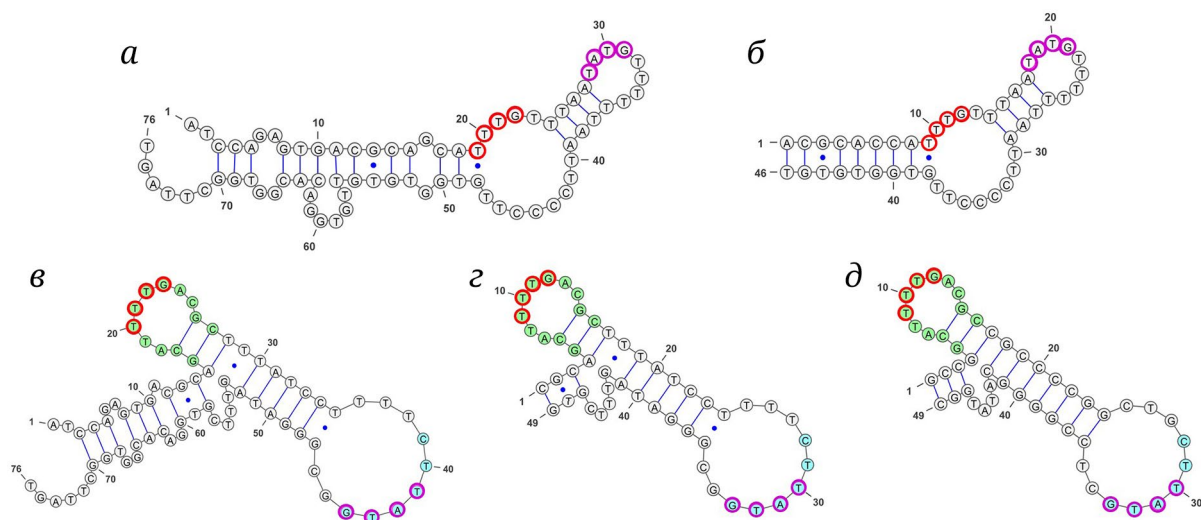


Рис. 1. Возможные вторичные структуры анти-EGFR ДНК-аптамеров U31, U2 и их производных. Структуры получены на основании анализа результатов, полученных с помощью сервиса The ViennaRNA Package и визуализированы с помощью Java-апплета VARNA: *а* – U31; *б* – GR20; *в* – U2; *г* – U2s; *д* – Gol1. Красным и фиолетовым контуром в структурах аптамеров U31 (*а*) и GR20 (*б*) выделены 2 блока нуклеотидов, встречающихся в соответствующих петлях аптамеров обоих семейств. В структурах аптамеров серии U2 (*в–д*) зелёным цветом выделены нуклеотиды в идентичных участках петель П-2 и шпильки П-3, голубым – повторяющиеся участки в петлях П-3. Синей точкой обозначены связи в неканонических парах оснований

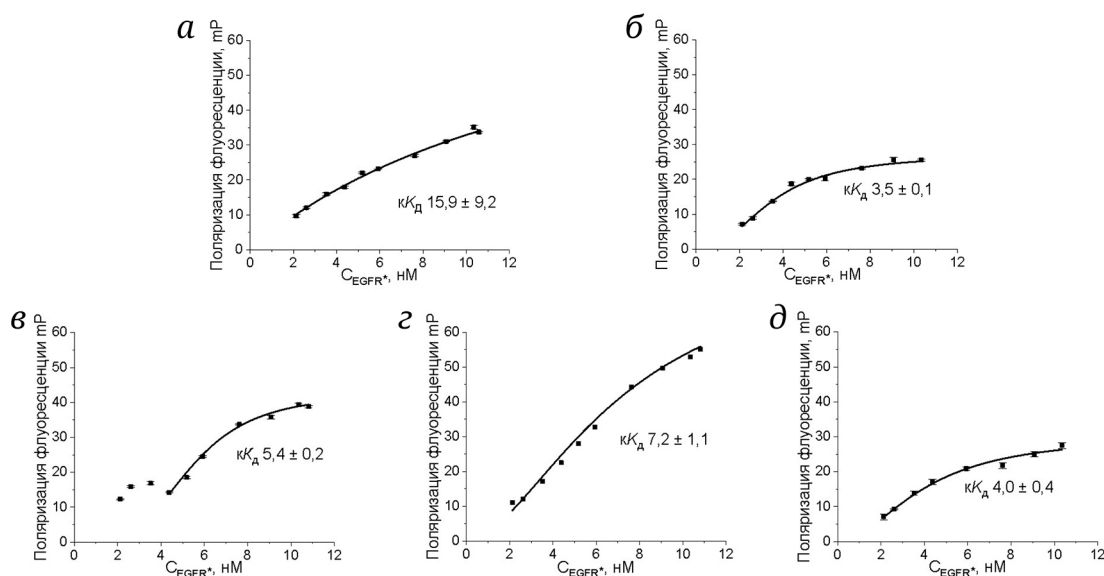


Рис. 2. Концентрационные зависимости изменения поляризации флуоресценции при связывании FAM-меченых ДНК-аптамеров семейства U31 (*а* и *б*) и U2 (*в–д*) с EGFR*. *а* – U31; *б* – GR20; *в* – U2; *г* – U2s, *д* – Gol1; $R^2 > 0,98$. Измерения проводились в трёх повторностях. Указаны рассчитанные K_d

Сконструированный ДНК-аптамер Gol1 представляет собой вариант аптамера U2s, в котором в двуспиральных участках все пары А–Т заменены на пары Г–С. Петля П-2 сохранена, а петля П-3 изменена и не содержит блока из 4-х остатков Т. Более подробное описание алгоритма конструирования Gol1 будет опубликовано отдельно.

В структурах, приведённых на рис. 1, голубым и зелёным цветом выделены общие участки в петлях для трёх аптамеров семейства U2.

Определение аффинности анти-EGFR ДНК-аптамеров методом ПФ. Метод ПФ позволяет определять равновесную константу диссоциации в растворе. На рис. 2 приведены концентрационные зависимости связывания аптамеров U31 и U2, а также их производных с EGFR*. Связывание аптамера U31 и его укороченного мутантного варианта GR20 происходит по-разному (рис. 2, *а* и *б*). Концентрационная кривая для GR20 характеризуется классической формой и наличием плато.

Таблица 3. Рассчитанные параметры аффинности анти-EGFR ДНК-аптамеров к EGFR*

Аптамер	ПФ	ИБС		
	kK_d	$k_{on} \times 10^{-5}, (M \cdot s)^{-1}$	$k_{off} \times 10^4, s^{-1}$	kK_d, nM
U31	$15,9 \pm 9,2$	$0,7 \pm 0,2$	18 ± 2	24 ± 6
GR20	$3,5 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	13 ± 3	26 ± 5
U2	$5,4 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$	20 ± 1	18 ± 3
U2s	$7,2 \pm 1,1$	$0,9 \pm 0,1$	23 ± 2	25 ± 2
Gol1	$4,0 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,3$	22 ± 2	17 ± 3

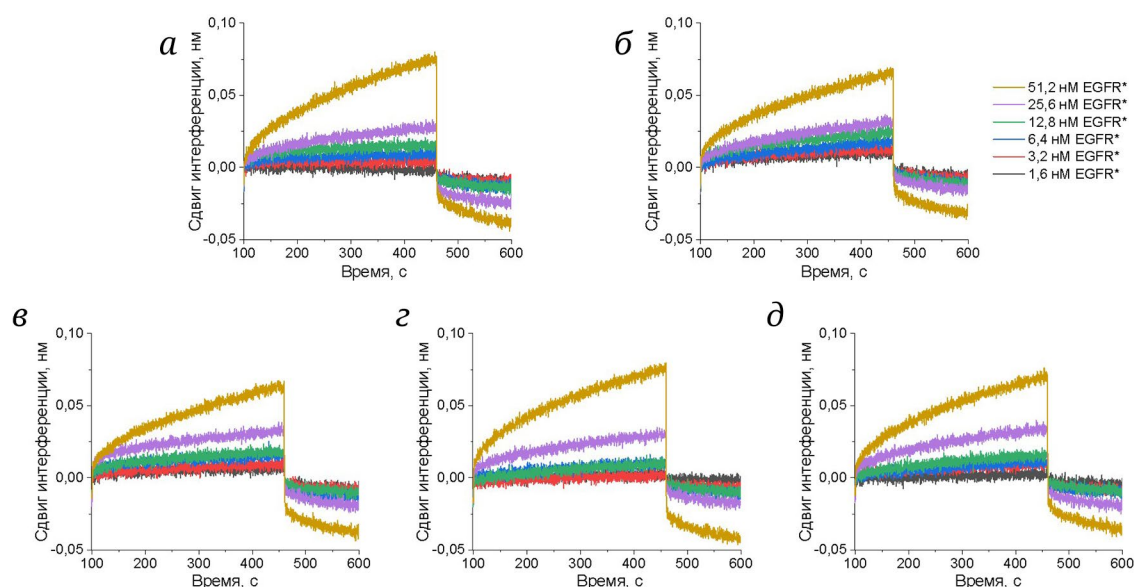


Рис. 3. Сенсограммы, полученные методом ИБС, для иммобилизованных биотинилированных ДНК-аптамеров при связывании с EGFR*. а – U31; б – GR20; в – U2; г – U2s; д – Gol1

Согласно рассчитанным константам, укороченный аптамер GR20 связывается в 4,5 раза лучше исходного аптамера U31: $kK_d = 3,5 \pm 0,1$ нМ против $15,9 \pm 9,2$ нМ (табл. 3).

Аптамеры семейства U2 демонстрируют разный характер взаимодействия с EGFR (рис. 2, в–д). Концентрационная зависимость связывания исходного аптамера U2 воспроизводимо начинается с 4 нМ белка. Аппроксимация даёт значение $kK_d = 5,4 \pm 0,2$ нМ. Укороченный вариант U2s связывается с мишенью несколько хуже исходного аптамера U2 ($kK_d = 7,2 \pm 1,1$ нМ против $5,4 \pm 0,2$ нМ). Концентрационная зависимость связывания сконструированного аптамера Gol1 показывает высокую аффинность – $kK_d = 4,0 \pm 0,4$ нМ.

В контрольных экспериментах при титровании флуоресцентно-меченых аптамеров белком БСА наблюдалось слабое увеличение сигнала ПФ за счёт неспецифического связывания аптамеров (рис. П1, а–д в Приложении), при этом концентрация БСА 1000-кратно превышала кон-

центрацию EGFR*. Аппроксимация по уравнению Хилла даёт значения kK_d , превышающие 1000 нМ.

Определение аффинности анти-EGFR ДНК-аптамеров методом ИБС. Метод ИБС позволяет определять кинетическую и равновесную аффинность, при этом один из компонентов, лучше аптамер, должен быть иммобилизован на поверхности биосенсора.

Аффинность аптамера U31 и его короткого производного GR20 к EGFR* определяли при иммобилизации меченного по 5'-концу биотином аптамера на поверхности SA-сенсора (рис. 3, а и б). В случае GR20 происходит небольшое падение (в 1,4 раза) как скорости ассоциации, так и скорости диссоциации комплекса. Отношение кинетических констант ассоциации и диссоциации комплекса, определяющее равновесное значение аффинности, сохраняется (для U31 $kK_d = 24 \pm 6$ нМ и для GR20 – 26 ± 5 нМ).

Сенсограммы связывания иммобилизованного аптамера U2 и его укороченных и скон-

струированных вариантов U2s и Gol1 с EGFR* показаны на рис. 3, в–д. Отличие наблюдается для аптамера U2s: небольшое снижение скорости ассоциации и повышение скорости диссоциации приводит к ухудшению аффинности в 1,4 раза: $K_d = 25 \pm 2$ нМ по сравнению с 18 ± 3 нМ для исходного аптамера U2. Кинетические показатели и результирующая аффинность сконструированного аптамера Gol1 ($K_d = 17 \pm 3$ нМ) сопоставима со значениями для исходного аптамера U2 ($K_d = 18 \pm 3$ нМ).

Для контрольного связывания ДНК-аптамеров с белком БСА методом ИБС наблюдается только неспецифическое связывание, для которого невозможно рассчитать K_d (рис. П2, а–д в Приложении).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для постселекционной адаптации аптамеров к конкретной мишени необходимо адекватно следить за возможными изменениями их свойств. Основные первичные манипуляции при адаптации – это укорочение аптамеров и изменения в предполагаемой вторичной структуре, например, стабилизация путём замены нуклеотидов в «дефектных» участках, т.е. участках, не являющихся «классическими» Уотсон-Криковскими двутяжевыми участками. Последующие более продвинутые манипуляции с аптамерами – это введение химических модификаций, создание мультимодульных и мультифункциональных конструкций и прочее. Основное свойство аптамеров – это аффинность к мишени, которая характеризуется равновесными константами ассоциации/диссоциации либо кинетическими константами скорости ассоциации/диссоциации. Равновесные константы позволяют оценить существенные изменения аффинности, в то время как кинетические константы могут выявить интересные особенности на каждом этапе взаимодействия – ассоциации и диссоциации.

Методы определения аффинности аптамеров к мишени можно условно разделить на две группы: определение в растворе и на поверхности сенсоров. Каждая группа имеет свои преимущества и недостатки, но их совместное использование позволяет сделать более адекватные выводы. Примерами методов из обеих групп являются поляризация флуоресценции для раствора и интерферометрия биослоёв для поверхностных сенсоров [17, 29].

Данная работа посвящена аффинности ДНК-аптамеров, поскольку они более технологичны и показывают большую селективность к мишеням из-за пониженной гидрофобности по сравнению с модифицированными аптамерами 2'-F-РНК.

Во введении отмечалось, что в настоящее время имеется 4 группы ДНК-аптамеров к EGFR: серии TuTu, U, 2369 и группа из двух аптамеров LINN2 и KM4 (табл. 1). Аптамеры получены различными вариантами селекции, их аффинность определена различными методами, статус мишени EGFR также различался, поэтому вопрос о сравнении свойств полученных аптамеров является крайне актуальным. Кроме того, стадии адаптации аптамеров к мишени требуют унификации методов сравнения их свойств.

Первичная структура опубликована только для аптамеров серии U, причём для нескольких различных семейств, полученных в ходе одной селекции [16]. Ранее для серии аптамеров одного из семейств – U31 – мы создали несколько конструкций, исходя из комплексных изменений – одновременного укорачивания и стабилизации аптамера [17]. Один из них – GR20 – получен из исходного 76-мерного аптамера U31 укорачиванием до 46-мера с одновременной заменой противостояния G6–G41 на пару C6–G41 в двуспиральном участке III-1.

В настоящей работе мы получили конструкции для второго семейства U2. Чтобы проследить влияние конкретных изменений на аффинность аптамеров, проводили не комплексные изменения структуры, а пошаговые. Сначала было проведено укорачивание исходного 76-мерного аптамера U2 до 49-мерного аптамера U2s; потом во всей предполагаемой вторичной структуре U2s создали пары G–C с небольшими изменениями в одной из петель с получением 49-мерного аптамера Gol1. Это позволяет решать задачу о важности первичной структуры стеблей и/или петель шпилек для взаимодействия с белком EGFR*. Одновременное использование двух методов измерения аффинности позволяет не только получить представления о чувствительности и возможностях обоих методов при манипуляциях со структурой аптамеров, но и выявить проблемы и выработать подходы для выбора аптамеров при их трансляции в биомедицинские исследования.

Построение моделей возможных вторичных структур анти-EGFR ДНК-аптамеров серии U. Ранее для конструирования аптамеров семейства U31 был выбран следующий подход. При анализе возможных вторичных структур, которые предлагает стандартный сервис The ViennaRNA Package, был выбран вариант, показанный на рис. 1, а. При этом компьютерная модель аптамера дополнена одной парой G–T (соответствующей G9–T38 в GR20) в конце шпильки III-1.

При укорачивании аптамера U31 был удалён нестабильный дефектный концевой двуспиральный участок A1–G10/T51–T76. Для стабилизации нового концевого участка дефектное противо-

стояние G6–G41 заменили на пару C6–G41 путём точечной замены G6C, что привело к созданию аптамера GR20 (нумерация дана по GR20). Аптамер GR20 имеет концевой стебель III-1 с девятью парами, две из которых – пары G–T (G3–T44, T9–G38). Внутренняя петля П-1-1 и шпилька III-2 содержат 2 блока из трёх остатков Т, а петля П-2 и шпилька III-2 содержит блок из 6 остатков Т.

В данной работе для конструирования аптамеров семейства U2 был выбран следующий подход. При анализе возможных вторичных структур, которые предлагает сервис The ViennaRNA Package, был выбран вариант, показанный на рис. 1, в. При этом исходная компьютерная модель аптамера дополнена парами Т–G в начале и в конце стебля шпильки III-3 (T18–G42 и T24–G36, согласно нумерации U2s).

При укорачивании аптамера U2 был удалён нестабильный дефектный концевой двуспиральный участок A1–A11/G61–T76. Полученный укороченный 49-мер (U2s) перенумерован. Концевая шпилька III-1 содержит всего 3 пары, из них 1 пара – G2–T48. Стебель шпильки III-2 также содержит всего 3 пары, но может стабилизироваться коаксиальным стэкингом со стеблем шпильки III-3, как это происходит у тРНК [30, 31]. Петли П-2 и П-3 родительского аптамера U2 и укороченного U2s содержат блоки из четырёх остатков Т.

Сконструированный аптамер Gol1 представляет собой вариант аптамера U2s, у которого в предполагаемых двуспиральных участках образованы пары G–C, что должно стабилизировать вторичную структуру. Петля П-2 сохранена, а петля П-3 изменена и не содержит блока из четырёх остатков Т. (Более подробное описание алгоритма конструирования Gol11 будет опубликовано отдельно.)

Полученный набор конструкций семейства U2 даёт возможность проверить гипотезы о природе узнающих участков аптамеров для взаимодействия с EGFR, а именно: активность каркаса вторичной структуры, активность петель, необходимость блоков из остатков Т.

Интересные наблюдения можно сделать при сравнении структур двух семейств аптамеров U31 и U2. Во внутренней петле П-1-1 семейства U31 и петле П-2 семейства U2 есть идентичная тетра-нуклеотидная последовательность TTTG (выделена красным контуром). Более того, в петлях П-2 и П-3 имеется вторая идентичная тетра-нуклеотидная последовательность TATG (выделена фиолетовым контуром).

Определение аффинности анти-EGFR ДНК-аптамеров методом ПФ. Метод ПФ основан на явлении поляризации флуоресценции. При быстром вращении небольшой флуоресцентно-меченой молекулы плоскость, в которой излучается

флуоресценция, отклоняется от плоскости возбуждения, вызывая деполяризацию флуоресценции. Образование комплекса с большей по размеру молекулой, например аптамер–белок, приводит к замедлению флуорофора, и плоскость, в которой излучается флуоресценция, меньше отклоняется от плоскости возбуждения, что приводит к поляризации флуоресценции (рис. ПЗ в Приложении). Метод ПФ активно применяется для комплексов аптамеров с белками с кажущимися константами диссоциации (K_d) от 0,1 до сотен нМ [32]. Для белка EGFR* в растворе определение аффинности аптамеров методом ПФ в этой работе проводилось впервые.

Для представителя семейства U31, сконструированного ранее, аптамера GR20, при укорочении и предполагаемой частичной стабилизации концевого двутяжевого участка, аффинность к белку возрастает примерно в 4,5 раза: K_d 15,9 нМ и 3,5 нМ соответственно (табл. 3). В связи с этим закономерен вопрос о том, что будет происходить с аффинностью при пошаговом укорочении и предполагаемой стабилизации для представителей семейства U2.

В серии аптамеров U2 при простом укорочении исходного 76-мерного аптамера U2 до 49-мерного аптамера U2s наблюдается снижение аффинности связывания с EGFR*: K_d = 5,4 нМ против 7,2 нМ соответственно. Возможно, это происходит из-за дестабилизации коаксиального стэкинга двутяжевых участков шпилек III-2 и III-3, поскольку укорочение концевого стебля шпильки III-1 до дефектного короткого концевого двутяжевого участка в три комплементарных пары, в том числе одна неканоническая пара G–T, не может обеспечить стабильную сближенность концов двух стеблей шпилек III-2 и III-3.

Неожиданные свойства показал аптамер Gol1. Замена семи возможных пар в исходном аптамере U2 на 7 пар G–C должна стабилизировать предполагаемую вторичную структуру аптамера, при этом узнавание белка EGFR* может нарушаться. Из 10 пар в стеблях шпилек III-2 и III-3 остались неизменными только 3 пары: G15–C6, C16–G5, C22–G38. Тем не менее аптамер Gol1 сохранил аффинность к белку: K_d = 5,4 нМ и 4,0 нМ для U2 и Gol1 соответственно. При этом ход кривой титрования белком для аптамера Gol1 практически совпадает с результатами, полученными для сконструированного аптамера GR20 из другого семейства. Значения рассчитанных K_d этих производных близки.

Интересная особенность – в обоих семействах, U31 и U2, все аптамеры сохраняли отмеченные ранее два идентичных тетра-нуклеотида: TTTG и TATG. Предстоит выяснить, являются ли они сигнатурами узнающих элементов структуры.

Что касается сравнения аффинности двух исходных аптамеров U2 и U31, то полученные разными авторами и разными методами данные (табл. 1 и 3) хорошо коррелируют между собой.

Обнаружение факта, что небольшие изменения структуры аптамеров приводят к кратному изменению аффинности, делает осмысленным переход к изучению взаимодействия аптамеров с рецептором EGFR в составе клеток.

Определение аффинности анти-EGFR ДНК-аптамеров методом ИБС. Метод ИБС основан на явлении интерференции отражённого света от торцевой поверхности оптоволоконного датчика и позволяет анализировать взаимодействие иммобилизованных аптамеров с белком-мишенью EGFR* в растворе в режиме реального времени. Регистрация комплексообразования в реальном времени позволяет рассчитать кинетические константы скорости ассоциации и диссоциации, а их отношение определяет K_d (рис. П4 в Приложении). Метод ИБС активно применяется для комплексов аптамеров с белками [33].

Для представителя семейства U31, сконструированного ранее, GR20, при укорочении и предполагаемой частичной стабилизации концевой двутяжевого участка скорость образования комплекса замедляется примерно в 1,4 раза, но при этом во столько же раз замедляется и скорость диссоциации. Таким образом, аффинность к белку остаётся прежней. Снижение скоростей ассоциации и диссоциации для аптамера GR20, по сравнению с исходным U31, согласуется с выдвинутым ранее предположением о связи аффинности аптамера со стабильностью образуемой структуры. Возможно, более длинный и конформационно подвижный аптамер U31 с дефектной вторичной структурой быстрее адаптируется к белку при ассоциации, по тем же причинам диссоциирует быстрее. Кинетические параметры позволяют определить выбор в пользу медленно диссоциирующего аптамера GR20, если скорость образования комплекса с рецептором не критична.

Важно понять, как влияет на взаимодействие с белком EGFR* пошаговое укорочение и стабилизация ДНК-аптамеров. Это сделано на примере семейства аптамеров U2. Исходный 76-мерный аптамер U2 при укорочении до 49-мерного аптамера U2s теряет аффинность к белку: $K_d = 18$ нМ против 25 нМ соответственно. По-видимому, причиной является дестабилизация аптамера, которая обсуждалась в предыдущем разделе о ПФ. По расчётным данным, построенным на аппроксимации, скорости образования комплекса примерно одинаковы ($k_{on} \times 10^{-5} - 1,1 \pm 0,2 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и $0,9 \pm 0,1 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ соответственно). Однако сравнение характера кривых ассоциации/диссоциации в диапазоне концентраций 6,4–51,2 нМ гово-

рит о более быстрой адаптации короткого аптамера U2s к белку EGFR*, но при этом комплекс становится менее стабильным, что приводит к потере аффинности.

Неожиданные свойства показал сконструированный аптамер Gol1. Как это было уже описано выше, замена большинства комплементарных пар аптамера U2s на пары G–C не привела к потере аффинности Gol1 к белку, то же самое справедливо и для данных ИБС: $K_d = 18$ нМ и 17 нМ для аптамеров U2 и Gol1 соответственно. При этом кинетические данные для аптамера Gol1 и исходного аптамера U2 также совпадают. По-видимому, стабильная конформация у аптамера Gol1 при наличии коаксиального стэкинга отвечает только за правильное позиционирование двух упомянутых ранее узнающих участков. Как следствие, можно предположить, что в узнавании белка EGFR* участвуют петли, а не комплементарные пары нуклеотидов в стеблях шпильки предполагаемой вторичной структуры ДНК-аптамеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как равновесный метод в растворе – ПФ, так и кинетический метод с аптамерами, иммобилизованными на поверхности – ИБС, дают воспроизводимые результаты для сравнения аффинности ДНК-аптамеров к EGFR*. Полученные при титровании белком EGFR* только численные значения равновесных K_d не являются единственным критерием для сравнения аффинности аптамеров, поскольку выражены через концентрацию белка, что, в свою очередь, определяется его удельной активностью. Сами по себе численные характеристики в виде констант существенно зависят, например, от методов аппроксимации кривых титрования и удельной активности белка. Для выбора аптамера чрезвычайно важно оценивать результат взаимодействий аптамер–мишень комплексно, в том числе учитывая амплитуду и скорость изменения, т.е. кривизну, кинетических кривых ассоциации и диссоциации.

Вклад авторов. Копылов А.М., Павлова Г.В. – концепция и руководство работой; Антипова О.А., Моисеенко В.Л., Рыбина А.А. – проведение экспериментов; Антипова О.А., Рыбина А.А., Моисеенко В.Л., Копылов А.М., Мухаметова Л.И., Ерёмин С.А. – обсуждение результатов исследования; Моисеенко В.Л., Антипова О.М., Копылов А.М. – написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2024-561 от 24.04.2024 г.).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием лю-

дей или использованием животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Di Mauro, V., Lauta, F.C., Modica, J., Appleton, S. L., De Franciscis, V., and Catalucci, D. (2023) Diagnostic and therapeutic aptamers: a promising pathway to improved cardiovascular disease management, *JACC Basic Transl. Sci.*, **9**, 260-277, <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2023.06.013>.
2. Kejamurthy, P., and Devi, K. T. R. (2023) Immune checkpoint inhibitors and cancer immunotherapy by aptamers: an overview, *Med. Oncol.*, **41**, 40, <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02267-4>.
3. Lin, B., Xiao, F., Jiang, J., Zhao, Z., and Zhou, X. (2023) Engineered aptamers for molecular imaging, *Chem. Sci.*, **14**, 14039-14061, <https://doi.org/10.1039/d3sc03989g>.
4. Murray, M. T., and Wetmore, S. D. (2024) Unlocking precision in aptamer engineering: a case study of the thrombin binding aptamer illustrates why modification size, quantity, and position matter, *Nucleic Acids Res.*, **52**, 10823-10835, <https://doi.org/10.1093/nar/gkae729>.
5. Plach, M., and Schubert, T. (2020) Biophysical characterization of aptamer-target interactions, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **174**, 1-15, https://doi.org/10.1007/10_2019_103.
6. An, Z., Aksoy, O., Zheng, T., Fan, Q. W., and Weiss, W. A. (2018) Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies, *Oncogene*, **37**, 1561-1575, <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0045-7>.
7. Sabbah, D. A., Hajjo, R., and Sweidan, K. (2020) Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors, *Curr. Top. Med. Chem.*, **20**, 815-834, <https://doi.org/10.2174/1568026620666200303123102>.
8. Li, N., Larson, T., Nguyen, H. H., Sokolov, K. V., and Ellington, A. D. (2010) Directed evolution of gold nanoparticle delivery to cells, *Chem. Commun. (Camb)*, **46**, 392-394, <https://doi.org/10.1039/b920865h>.
9. Li, N., Nguyen, H. H., Byrom, M., and Ellington, A. D. (2011) Inhibition of cell proliferation by an anti-EGFR aptamer, *PLoS One*, **6**, e20299, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020299>.
10. Cruz Da Silva, E., Foppolo, S., Lhermitte, B., Ingremau, M., Justiniano, H., Klein, L., Chenard, M. P., Vauchelles, R., Abdallah, B., Lehmann, M., Etienne-Selloum, N., Dontenwill, M., and Choulier, L. (2022) Bioimaging nucleic-acid aptamers with different specificities in human glioblastoma tissues highlights tumoral heterogeneity, *Pharmaceutics*, **14**, 1980, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14101980>.
11. Avutu, V. (2010) Avidity effects of MinE07, an anti-EGFR aptamer, on binding to A431 cells, *The University of Texas at Austin Texas ScholarWorks*, URL: <https://repositories.lib.utexas.edu/items/fbdce8b0-71cf-4422-a5c2-16c7e5695544>.
12. Cheng, S., Jacobson, O., Zhu, G., Chen, Z., Liang, S. H., Tian, R., Yang, Z., Niu, G., Zhu, X., and Chen, X. (2019) PET imaging of EGFR expression using an 18F-labeled RNA aptamer, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **46**, 948-956, <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4105-1>.
13. Paul, A. R., Falsaperna, M., Lavender, H., Garrett, M. D., and Serpell, C. J. (2023) Selection of optimised ligands by fluorescence-activated bead sorting, *Chem. Sci.*, **14**, 9517-9525, <https://doi.org/10.1039/d3sc03581f>.
14. Esposito, C. L., Passaro, D., Longobardo, I., Condorelli, G., Marotta, P., Affuso, A., de Franciscis, V., and Cerchia, L. (2011) A neutralizing RNA aptamer against EGFR causes selective apoptotic cell death, *PLoS One*, **6**, e24071, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024071>.
15. Wang, D. L., Song, Y. L., Zhu, Z., Li, X. L., Zou, Y., Yang, H. T., Wang, J. J., Yao, P. S., Pan, R. J., Yang, C. J., and Kang, D. Z. (2014) Selection of DNA aptamers against epidermal growth factor receptor with high affinity and specificity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **453**, 681-685, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.023>.
16. Wu, X., Liang, H., Tan, Y., Yuan, C., Li, S., Li, X., Li, G., Shi, Y., and Zhang, X. (2014) Cell-SELEX aptamer for highly specific radionuclide molecular imaging of glioblastoma *in vivo*, *PLoS One*, **9**, e90752, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090752>.
17. Zavyalova, E., Turashev, A., Novoseltseva, A., Legatova, V., Antipova, O., Savchenko, E., Balk, S., Golovin, A., Pavlova, G., and Kopylov, A. (2020) Pyrene-modified DNA aptamers with high affinity to wild-type EGFR and EGFRvIII, *Nucleic Acid Ther.*, **30**, 175-187, <https://doi.org/10.1089/nat.2019.0830>.
18. Kim, K., Lee, S., Ryu, S., and Han, D. (2014) Efficient isolation and elution of cellular proteins using aptamer-mediated protein precipitation assay, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **448**, 114-119, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.086>.

19. Damase, T. R., Miura, T. A., Parent, C. E., and Allen, P. B. (2018) Application of the open qPCR instrument for the *in vitro* selection of DNA aptamers against epidermal growth factor receptor and *Drosophila* C virus, *ACS Comb. Sci.*, **20**, 45-54, <https://doi.org/10.1021/acscombsci.7b00138>.
20. Damase, T. R., and Allen, P. B. (2019). Idiosyncrasies of thermofluorimetric aptamer binding assays, *BioTechniques*, **66**, 121-127, <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0128>.
21. Il'in, V. A., Pyzhik, E. V., Balakhonov, A. B., Kiryushin, M. A., Shcherbatova, E. V., Kuznetsov, A. A., Kostin, P. A., Golovin, A. V., Korshun, V. A., Brylev, V. A., Sapozhnikova, K. A., Kopylov, A. M., Pavlova, G. V., and Pronin, I. N. (2022) Radiochemical synthesis of 4-[18F]FluorobenzylAzide and its conjugation with EGFR-specific aptamers, *Molecules*, **28**, 294, <https://doi.org/10.3390/molecules28010294>.
22. Mathews, D. H., Disney, M. D., Childs, J. L., Schroeder, S. J., Zuker, M., and Turner, D. H. (2004) Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7287-7292, <https://doi.org/10.1073/pnas.0401799101>.
23. Reuter, J. S., and Mathews, D. H. (2010) RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis, *BMC Bioinformatics*, **11**, 129, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-129>.
24. SantaLucia J., Jr. (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1460-1465, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1460>.
25. SantaLucia, J., Jr., and Hicks, D. (2004) The thermodynamics of DNA structural motifs, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **33**, 415-440, <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141800>.
26. Hirka, S., and McKeague, M. (2021) Quantification of aptamer-protein binding with fluorescence anisotropy, *Aptamers*, **5**, 1-6, <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13355.57124>.
27. Weaver, S. D., and Whelan, R. J. (2021) Characterization of DNA aptamer-protein binding using fluorescence anisotropy assays in low-volume, high-efficiency plates, *Anal. Methods*, **13**, 1302-1307, <https://doi.org/10.1039/d0ay02256j>.
28. O'Shannessy, D. J., Brigham-Burke, M., Soneson, K. K., Hensley, P., and Brooks, I. (1993) Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods, *Anal. Biochem.*, **212**, 457-468, <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1355>.
29. Cao, Z., and Tan, W. (2005) Molecular aptamers for real-time protein-protein interaction study, *Chemistry*, **11**, 4502-4508, <https://doi.org/10.1002/chem.200400983>.
30. Ferré-D'Amaré, A. R., and Doudna, J. A. (1999) RNA folds: insights from recent crystal structures, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **28**, 57-73, <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.28.1.57>.
31. Sarkar, R., Mainan, A., and Roy, S. (2024) Influence of ion and hydration atmospheres on RNA structure and dynamics: insights from advanced theoretical and computational methods, *Chem. Commun. (Camb)*, **60**, 3624-3644, <https://doi.org/10.1039/d3cc06105a>.
32. Zhao, Q., Tao, J., Feng, W., Uppal, J. S., Peng, H., and Le, X. C. (2020) Aptamer binding assays and molecular interaction studies using fluorescence anisotropy – a review, *Anal. Chim. Acta*, **1125**, 267-278, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.05.061>.
33. Jha, R., Gorai, P., Shrivastav, A., and Pathak, A. (2024) Label-free biochemical sensing using processed optical fiber interferometry: a review, *ACS Omega*, **9**, 3037-3069, <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03970>.

POST-SELECTION DESIGN OF APTAMERS: COMPARATIVE STUDY OF THE DNA APTAMERS AFFINITY TO THE RECOMBINANT EXTRACELLULAR DOMAIN OF HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTORS

V. L. Moiseenko^{1,2*}, O. M. Antipova^{1,3}, A. A. Rybina¹, L. I. Mukhametova¹,
S. A. Eremin¹, G. V. Pavlova^{2,3}, and A. M. Kopylov^{1,2}

¹ Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: valerian.moiseenko@gmail.com

² Burdenko National Medical Research Institute for Neurosurgery, 125047 Moscow, Russia

³ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
117485 Moscow, Russia

The current work provides a comparative assessment of the designed DNA aptamers affinity for the extracellular domain of the human epidermal growth factor receptor (EGFR*). The affinity data of the 20 previously published aptamers are summarized. The diversity of aptamer selection methods

and techniques requires the unification of comparison algorithms, which is also necessary for designing aptamers used in post-selection fitting to the target protein EGFR*. In this study the affinity of DNA aptamers from two families – U31 and U2, previously obtained by Wu et al. from the same selection [Wu et al. (2014) *PLoS One*, **9**, e90752] and their derivatives – GR20, U2s and Gol1, obtained by us through rational development, was compared. The aptamer affinity for EGFR* was measured by two different methods: a solution-phase technique – fluorescence polarization of FAM-labeled aptamers, and by a kinetic method using biolayer interferometry technique with aptamers immobilized on the surface. Unlike the values of equilibrium dissociation constants obtained through titration and expressed in units of protein concentration, the analysis of the titration profiles themselves and the kinetics of interaction proved to be more informative. This allowed us to identify how even subtle changes in the aptamers and their structures affect the affinity. Hypotheses regarding the “structure–function” relationships and recognition mechanisms were formulated. The data obtained for the set of aptamer constructions are critical for moving forward to examination of aptamer interactions with EGFR on the cell surface.

Keywords: aptamer, EGFR, affinity, biolayer interferometry, fluorescence polarization

ХАРАКТЕРИСТИКА УГЛЕВОДНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ГРИБКОВЫМ АНТИГЕННЫМ МАРКЕРАМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТИНИЛИРОВАННЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ В КАЧЕСТВЕ ПОКРЫВАЮЩИХ АНТИГЕНОВ

© 2024 М.Л. Генинг¹, А.В. Полянская¹, А.Н. Кузнецов¹, А.Д. Титова¹,
В.И. Юдин¹, Д.В. Яшунский², Ю.Е. Цветков², О.Н. Юдина²,
В.Б. Крылов^{1*}, Н.Э. Нифантьев^{2*}

¹ Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,
лаборатория синтетических гликовакцин,
119991 Москва, Россия; электронная почта: v_krylov@ioc.ac.ru

² Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,
лаборатория химии гликоконъюгатов,
119991 Москва, Россия; электронная почта: nen@ioc.ac.ru

Поступила в редакцию 30.09.2024

После доработки 21.10.2024

Принята к публикации 24.10.2024

Маннан и β -(1→3)-глюкан являются характеристичными полисахаридными маркерами ряда грибковых патогенов, в том числе *Candida albicans* – самого распространённого возбудителя инвазивных микозов человека. В данной работе проведено изучение эпитопной специфичности двух моноклональных антител CM532 и FG70, распознающих олигосахаридные фрагменты данных грибковых полисахаридов. С применением широкой панели биотинилированных олигосахаридов в качестве покрывающих антигенов установлено, что антитело CM532, полученное при иммунизации конъюгатом пентаманнозида β -Man-(1→2)- β -Man-(1→2)- α -Man-(1→2)- α -Man с гемоцианином *Megathura crenulate* (KLH), селективно распознаёт трисахаридный эпитоп β -Man-(1→2)- α -Man-(1→2)- α -Man, а антитело FG70, полученное при иммунизации конъюгатом гептаглюкозида β -Glc-(1→3)-[β -Glc-(1→3)]₅- β -Glc с KLH, наиболее эффективно взаимодействует с линейным β -(1→3)-связанным пентасахаридным фрагментом глюкана, причём наличие 3,6-разветвлений внутри этой последовательности не снижает связывания. Полученные данные свидетельствуют о том, что рассматриваемые моноклональные антитела могут быть использованы для создания отсутствующих сегодня эффективных диагностикумов для выявления грибковых инфекций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: грибковые заболевания, β -(1→3)-глюкан, α -маннан, β -маннан, моноклональные антитела, углеводная специфичность, олигосахариды.

DOI: 10.31857/S0320972524120045 EDN: IFSICH

ВВЕДЕНИЕ

Инвазивные микозы представляют собой серьёзную угрозу для здоровья населения, особенно для людей с ослабленным иммунитетом [1]. Распространённость этих инфекций значительно возросла в последние десятилетия. Согласно статистическим данным, которые получены в самое последнее время, ежегодная заболеваемость ин-

вазивными грибковыми инфекциями составляет 6,5 млн случаев в год, что приводит к 3,8 млн смертей, из которых около 2,5 млн являются прямым следствием грибковой инфекции [2]. Данные показатели превышают таковые для многих других наиболее опасных инфекционных заболеваний, включая туберкулёз и малярию. Одним из наиболее распространённых видов инвазивных грибковых инфекций является инвазивный кандидоз (ИК). Ежегодно около 1,56 млн человек заболевают ИК, при этом 995 000 человек умирают [2].

Диагностика грибковых инфекций значительно улучшилась за последние 10–15 лет, однако качество известных на сегодня тестов не по-

Принятые сокращения: ИК – инвазивный кандидоз; ПАА – полиакриламид; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; KLH – гемоцианин *Megathura crenulata*.

* Адресат для корреспонденции.

зволяет получать достоверные результаты, а их доступность и фактическое использование ограничены [3]. Культуральные методы, т.е. выращивание культуры патогенного гриба, выделенного из крови или других физиологических жидкостей, является золотым стандартом в диагностике ИК, однако данные методы требуют продолжительного времени (от нескольких дней до недели), что является серьёзным недостатком с учётом неотложности клинического состояния пациентов при инвазивных микозах [4]. Методы ПЦР-диагностики пока не дают эффективного результата при обнаружении инвазивных микозов, для детекции которых более широко используются методы иммуноферментного анализа (ИФА). Их примерами являются диагностические наборы, обнаруживающие галактоманнан *Aspergillus* и маннан *Candida*, а также соответствующие антитела [3]. Для обнаружения грибкового β -(1 \rightarrow 3)-глюкана используется тест-система на основе лизата амебоцитов мечехвоста (*Limulus polyphemus*) [5], популяция которого является ограниченной и исчерпаемой. Данный тест способен давать ложноположительные результаты вследствие своей высокой чувствительности и неудобен при дробном использовании диагностического набора [6]. Представляется целесообразным заменить его на ИФА-формат.

Выбор диагностических маркеров и гомологичных антител является ключевой проблемой при разработке тест-систем ИФА. Они должны эффективно выявлять присутствие грибковых патогенов в организме даже на ранних стадиях инфекции. Одним из практически важных маркеров является полисахарид β -(1 \rightarrow 3)-глюкан – компонент клеточной стенки многих грибов, включая *Candida*, *Aspergillus* и *Pneumocystis jirovecii* [7]. Тесты, детектирующие β -(1 \rightarrow 3)-глюкан, используются для диагностики инвазивных микозов, вызываемых данными патогенными грибами [8]. Наличие этого маркера в сыворотке крови свидетельствует о наличии грибковой инфекции, однако тест не является специфичным для какого-то одного рода гриба, поэтому его результаты должны интерпретироваться в контексте с клинической картиной и другими диагностическими тестами.

Другой антигенный маркер, маннан, является компонентом клеточной стенки грибов рода *Candida*. Тест на маннан используется для диагностики инвазивного кандидоза [9]. Антитела, специфичные к маннану, также могут быть обнаружены в крови пациентов и указывают на иммунный ответ на инфекцию *Candida* [10]. Использование комбинации тестов на маннан и комплементарные антитела повышает чувствительность и специфичность диагностики ИК [11]. Однако существующие тесты характеризуются недостаточной чувствительностью, что связано с

выбором выявляемого эпитопа в структуре сложного и гетерогенного маннана [12, 13].

Разработка эффективных тест-систем ИФА для обнаружения β -(1 \rightarrow 3)-глюкана и маннана требует наличия соответствующих высокоаффинных антител, распознающих строго определённую олигосахаридную последовательность. Целью данной работы является характеристика углеводной специфичности двух моноклональных антител, CM532 и FG70, к грибковым антигенным маркерам с использованием серии олигосахаридов, полученных синтетическим путём. Особенностью проведённой работы является использование в качестве иммуногенов синтетических олигосахаридов определённого строения, которые, в отличие от гетерогенных грибковых полисахаридов, могут быть воспроизводимо получены и структурно охарактеризованы. Кроме того, показано, что достаточно широко распространённое использование в качестве покрывающих антигенов гликоконъюгатов на основе полиакриламида (ПАА) [14] может приводить к получению неточных и завышенных результатов по специфичности антител. Применение в качестве покрывающих антигенов биотинилированных олигосахаридов, которые могут быть нанесены количественно на слайды чипов и иммунологические планшеты [15], позволяет получать более точные данные об углеводной специфичности исследуемых антител.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Все реакции проводили в растворителях, очищенных по стандартным методам. Гель-хроматографию активированных эфиров олигосахаридных лигандов проводили на колонке (0,9 \times 30 см) с гелем TSK HW-40(S) («Tosoh Bioscience», Япония) в 0,5 М AcOH; скорость потока – 0,3 мл/мин; элюат анализировали с помощью проточного рефрактометра Knauer K-2401 («Knauer GmbH», Германия). Диализ проводили в диализных кассетах Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassettes (10K MWCO, 3 мл), согласно инструкции производителя («Thermo Fisher Scientific», США).

Спектры ЯМР регистрировали при 25 °C на приборе Bruker Avance 600 («Bruker Corporation», США) в тяжёлой воде (D₂O); в качестве внутреннего стандарта использовался ацетон (δ_H 2,225; δ_C 31,45). Масс-спектры высокого разрешения были зарегистрированы на приборе Bruker micrOTOF II («Bruker Corporation») методом электрораспылительной ионизации (ESI).

Синтез иммуногенов. Получение активированных лигандов **1-AE** и **2-AE**. К растворам олигосахаридных лигандов **1** и **2** (1,03 мг; 1,16 мкмоль – для **1**; 1,38 мг; 1,14 мкмоль – для **2**) в диме-

тилформамиде (ДМФА; 100 мкл), содержащем Et_3N (0,1 мкл), добавляли раствор бис(4-нитрофенил)(оксис(этан-2,1-диил))бис(карбоната) (5,07 мг; 11,5 мкмоль; 10 экв.) в ДМФА (200 мкл). Полученную реакционную смесь гомогенизировали на вортексе и выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин, затем упаривали досуха на ротаторном испарителе. Остаток растворяли в EtOAc (5,0 мл) и экстрагировали активированные эфиры **1-AE** и **2-AE** 0,1 М AcOH (3 раза по 2,0 мл), объединённую водную фазу упаривали на ротаторном испарителе. Остаток растворяли в 0,5 мл 0,5 М AcOH и наносили на колонку с гелем TSK HW-40(S) (0,9 × 30 см; элюент – 0,5 М AcOH). Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали досуха, затем остаток растворяли в воде (0,5 мл) и лиофилизировали. Производные **1-AE** (1,00 мг; 73%) и **2-AE** (1,20 мг; 70%) получали в виде белых аморфных порошков. В спектре ^1H ЯМР полученных продуктов **1-AE** и **2-AE** присутствовали сигналы углеводной части, практически не отличающиеся от соответствующих данных спектров исходных (3-аминопропил)гликозидов **1** и **2**, а также идентичные для обоих продуктов характеристичные сигналы агликона. Спектр ^1H ЯМР (600 МГц, D_2O , δ , м.д., J/Гц; характеристичные сигналы агликона): 4,11 (м, 2 H, $\text{CH}^a\text{H}^b\text{OC}=\text{O}$); 4,37 (м, 2 H, $\text{CH}^a\text{H}^b\text{OC}=\text{O}$); 7,37 (д, 2 H, pNPh, $J = 9,0$); 8,24 (д, 2 H, pNPh, $J = 9,0$). **1-AE** – найдено: m/z 1205,3705 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ $\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{N}_2\text{O}_{34}$; вычислено: $\text{M} + \text{Na} = 1205,3702$. **2-AE** – найдено: m/z 1529,4752 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ $\text{C}_{57}\text{H}_{90}\text{N}_2\text{O}_{44}$; вычислено: $\text{M} + \text{Na} = 1529,4759$.

Получение конъюгатов с KLH (гемоцианин *Megathura crenulate*). Раствор KLH («Sigma-Aldrich», США; H8283; 4,4 мг/мл; 500 мкл) вносили в предварительно гидратированную диализную кассету, которую помещали в 200 мл фосфатного буфера (50 mM, pH 8,55), который меняли через 2, 4, и 16 ч. Раствор KLH извлекали из кассеты и делили на две части по 250 мкл (4,0 мг/мл), к которым добавляли водные растворы активированных лигандов **1-AE** (1,0 мг в 40 мкл H_2O) или **2-AE** (1,2 мг в 50 мкл H_2O). Полученные реакционные смеси гомогенизировали на вортексе и выдерживали при комнатной температуре в течение двух суток, при этом весь активированный эфир расходовался (ТСХ-контроль). Затем реакционные смеси диализовали против фосфатно-солевого буфера (ФСБ), который меняли через 2, 4, и 16 ч. Целевые конъюгаты извлекали из кассет с использованием ФСБ («Sigma-Aldrich») для промывки. Получали по 600 мкл конъюгатов **1-KLH** и **2-KLH** с концентрацией по белку 1,22 мг/мл ($\epsilon^{279} = 1,4 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; $\epsilon^{347} = 0,4 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) в виде слегка опалесцирующих жидкостей с голубым оттенком, которые использовали в качестве

иммуногенов для получения моноклональных антител.

Моноклональные антитела. Моноклональные антитела CM532 (IgG2a) и FG70 (IgG2b) были получены с использованием гибридомной технологии, как было описано ранее [16, 17]. Конъюгаты **1-KLH** и **2-KLH** использовали в качестве иммуногенов, а соответствующие биотинилированные конъюгаты – в качестве покрывающих антигенов ИФА для отбора клеточных линий продуцентов. Изогипотипы антител, продуцируемых обоими клонами, были определены с помощью набора для изотипирования («Sigma-Aldrich»). Очистку антител проводили методом аффинной хроматографии на колонке с белком А-сефароза. Для очистки антител использовали среды, собранные при культивировании гибридом. Антитела элюировали с помощью 50 mM лимонной кислоты с последующим добавлением фосфата натрия. Финальный состав цитратно-фосфатного буфера: 22 mM фосфатного буфера и 12 mM лимонной кислоты (pH 7,5); 0,05% (v/v) Tween 20; 0,1% ProClin 300.

Конъюгаты олигосахаридных лигандов с биотином и полиакриламидом. Биотинилированные олигосахариды **1m–14m**, родственные фрагментам маннана [18–24], и **1g–13g**, родственные фрагментам глюкозана [25–27], были синтезированы с использованием ранее разработанных синтетических методов [28]. Для этого к раствору аминопропил гликозида в ДМФА добавляли Et_3N и раствор активированного эфира биотина, после прохождения реакции конъюгат очищали методом гель-проникающей хроматографии на геле TSK HW-40(S) (элюент – 0,1 М AcOH). Конъюгаты олигосахаридов **9m–12m** с ПАА были получены по описанной нами ранее методике [29] с 20%-ным мольным содержанием олигосахаридного лиганда. Кратко, к раствору аминопропил гликозида в ДМФА добавляли Et_3N и раствор *n*-нитрофенил полиакрилата в ДМФА при 37 °C. Через 2 ч к смеси добавляли *n*-BuNH₂, а ещё через 2 ч добавляли избыток этаноламина и оставляли на ночь. Реакционную смесь упаривали, конъюгат очищали методом гель-проникающей хроматографии на геле LH-20 («Sigma-Aldrich») в системе MeCN/ H_2O (1/1).

Иммуноферментный анализ с использованием полиакриламидных покрывающих антигенов. Раствор конъюгатов олигосахаридов **1m–14m** с ПАА (100 мкл; 2 мкг/мл в ФСБ) наносили в лунки полистирольного планшета («Thermo Fisher Scientific») и оставляли при 4 °C на сутки. После нанесения лунки промывали ФСБ (100 мкл) 1 раз и блокировали 1%-ным раствором БСА в ФСБ при 37 °C в течение 1 ч. После вытряхивания блокирующего раствора и сушки планшет был готов для эксперимента. Образцы исследуемых моноклональных антител (100 мкл) в заданной concentra-

ции наносили в лунки планшета и инкубировали при 37 °C в течение 1 ч, затем промывали промывочным буфером 3 раза. Для разведения антител и промывки планшетов использовали ФСБ (рН 7,4), содержащий 0,1% БСА и 0,1% (v/v) Tween 20. Далее, лунки обрабатывали конъюгатом поликлональных антител к IgG мыши с пероксидазой («ИМТЕК», Россия) и инкубировали при 37 °C в течение 30 мин, затем промывали промывочным буфером 5 раз. Проявление планшетов производили добавлением 100 мкл однокомпонентного хромогенного субстрата ТМВ («Хема», Россия) в течение 10 мин. Реакцию останавливали, добавляя 50 мкл 1 М H₂SO₄. Поглощение измеряли при длине волны 450 нм на планшетном ридере Multiskan GO («Thermo Fisher Scientific»). Все измерения проводили независимо в трёх повторениях.

Иммуноферментный анализ с использованием биотинилированных покрывающих антигенов. Иммуноферментный анализ проводили на авидиновых планшетах («Хема»; Р300А) при использовании ФСБ, содержащего 0,05% (v/v) Tween 20 и 0,1% БСА, в качестве отмывающего раствора и раствора для разведения биотинилированных олигосахаридов, моноклональных антител и проявляющих антител, меченных пероксидазой. Биотинилированные олигосахариды **1m-14m** и **1g-13g** адсорбировали на дно лунок (20 пмоль олигосахаридов в 100 мкл разводящего раствора на одну лунку) в течение 2 ч при 37 °C при встряхивании, затем промывали планшет 3 раза и наносили образцы исследуемых моноклональных антител в заданной концентрации (100 мкл). Планшет инкубировали 45 мин при 37 °C при встряхивании, после чего промывали планшет 5 раз. Адсорбированные антитела проявляли с использованием поликлональных антител к IgG мыши, меченных пероксидазой, и однокомпонентного хромогенного субстрата ТМВ. Поглощение продуктов ферментативной реакции измеряли на приборе Multiskan GO при длине волны 450 нм.

Статистический анализ. Все измерения для олигосахарид-специфического ИФА повторяли трижды и представляли в виде среднего. Разброс полученных значений представлен на графиках в виде среднеквадратичного отклонения. Относительное стандартное отклонение значения поглощения при повторях не превышало 10%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полисахарид маннан, являющийся характерным антигенным маркером для рода *Candida*, имеет сложную разветвлённую структуру, напоминающую гребень. Основная цепь данного поли-

сахарида построена из α -(1→6)-связанных остатков маннозы, к которым во втором положении присоединены олигоманнозные цепи, которые, в свою очередь, могут также содержать ответвления. Боковые олигоманнозиды для разных серотипов *Candida* имеют различную структуру и длину. Они могут быть построены либо только из α -(1→2)-, α -(1→3)-связанных остатков маннозы, либо дополнены на невосстанавливаемом конце фрагментами из β -(1→2)-связанных остатков маннозы. Боковые цепи маннана являются антигенными факторами, позволяющими серотипировать различные виды *Candida*, и составляют основу для их диагностики. Ранее было установлено, что именно боковые цепи, содержащие β -(1→2)-связанные остатки маннозы, вносят наибольший вклад при индуцировании выработки антител в отношении маннанов *Candida albicans* [29–31]. Поэтому в качестве лиганда для получения иммуногенного конъюгата в данной работе был выбран пентаманнозид **1**, содержащий блок из двух β -(1→2)-связанных маннозных остатков на невосстанавливаемом конце α -(1→2)-триманнозидной последовательности (схема 1).

β -D-Глюканы, являющиеся маркерами целого ряда грибковых инфекций (см. выше), имеют, как правило, β -(1→3)-связанную основную цепь, несущую боковые ответвления при C-6 некоторых остатков глюкозы. Для выработки антител был использован линейный гептасахаридный фрагмент β -(1→3)-глюкана (схема 1), так как именно эта основная цепь в первую очередь взаимодействует с клетками иммунной системы [32].

Конъюгаты лигандов **1** и **2** были получены по разработанной ранее методике (схема 1) [33]. Для этого из олигосахаридов **1** и **2**, содержащих аминопропильный агликон, были получены производные с дополнительным линкером на основе диэтиленгликоля, содержащим на конце паранитрофениловый эфир (соединения **1-AE** и **2-AE** соответственно). Активированные таким образом лиганды **1-AE** и **2-AE** были введены в реакцию с белком-носителем с дальнейшей очисткой с помощью диализа. Таким образом, были получены конъюгаты **1-KLN** и **2-KLN**, содержащие фрагменты целевых грибковых антигенов – маннана и глюкана.

Конъюгаты **1-KLN** и **2-KLN** были использованы в качестве иммуногенов для получения моноклональных антител при помощи гибридомной технологии, как было описано ранее [16, 17]. Биотинилированные производные маннана (**1**) и глюкана (**2**) были использованы в качестве покрывающих антигенов для отбора соответствующих клеточных линий продуцентов методом ИФА. В результате были получены моноклональные антитела CM532 и FG70, специфичность которых

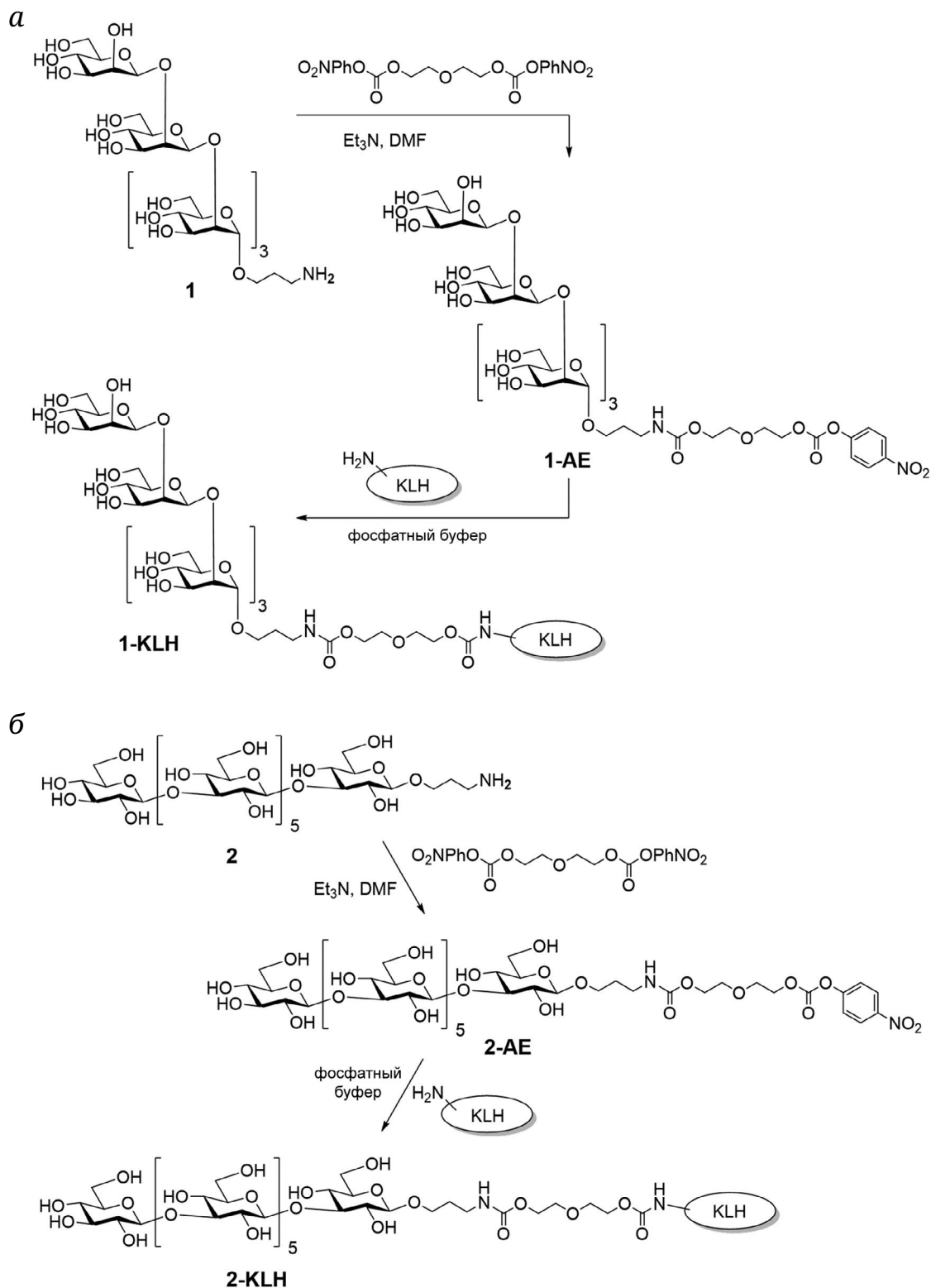
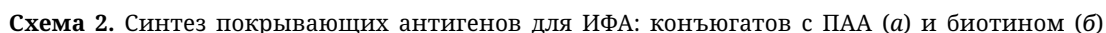


Схема 1. Синтез конъюгатов 1-KLH (а) и 2-KLH (б), использованных в качестве иммуногенов при получении моноклональных антител

была исследована с использованием серий олигосахаридных лигандов.

Для изучения эпитопной специфичности моноклональных антител в качестве покрывающих

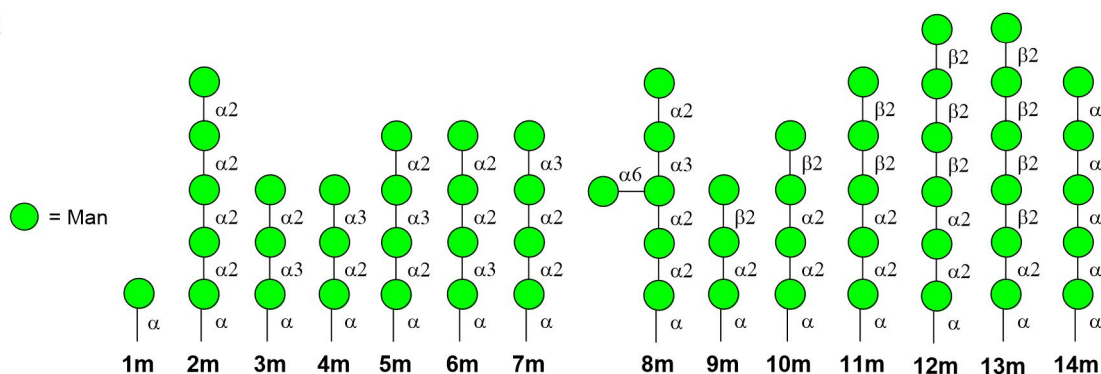
антигенов для ИФА были использованы два типа производных: поливалентные конъюгаты с ПАА и моновалентные конъюгаты с биотином (схема 2). Конъюгаты с ПАА были получены по реакции



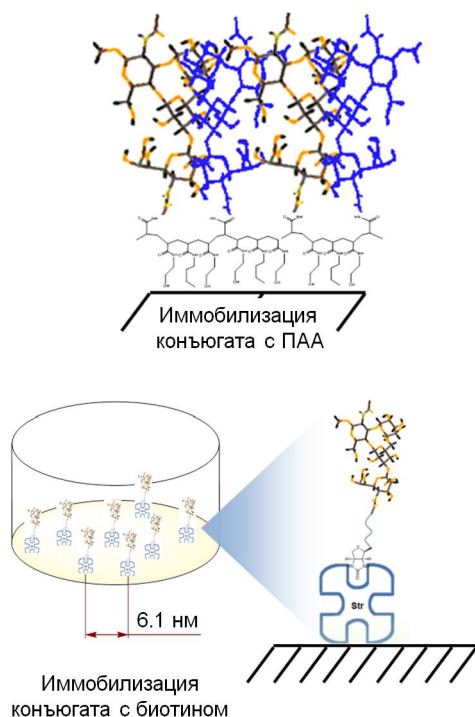
Первоначально для изучения эпитопной специфичности моноклонального антитела СМ532 были использованы ПАА-конъюгаты олигосахаридов **11m**, входящего в состав иммуногена, а также структурно родственных лигандов **9m**, **10m** и **12m** (рис 1, а). Результаты ИФА с использованием данного типа покрывающего антигена показали примерно одинаковое распознавание всех исследованных олигосахаридов (рис 1, в). Отсутствие различий между лигандами с существенными структурными различиями (**9m**, **10m**, **11m** и **12m**), вероятно, является следствием использования полиакриламидной основы для покрывающих антигенов. В этом случае невозможно контролировать плотность присоединения лигандов к поверхности полимера, а следовательно, нельзя добиться воспроизводимых результатов и сравнивать количественно показатели связывания для различных конъюгатов. Кроме того, адгезия полиакриламида к поверхности лунки планшета также не поддаётся контролю, затрудняя интерпре-

В связи с вышесказанным для дальнейшего изучения эпитопной специфичности отобранных моноклональных антител были использованы библиотеки биотиновых углеводных лигандов [15]. Так, для моноклонального антитела СМ532 в качестве покрывающих антигенов для ИФА были исследованы биотинилированные олигосахариды **1m-14m** (рис. 1, а). В этом ряду содержались как α -(1 \rightarrow 2)-/ α -(1 \rightarrow 3)-связанные маннозиды (**1m-8m**), так и соединения, содержащие β -(1 \rightarrow 2)-маннозидные фрагменты (**9m-13m**). Также был рассмотрен лиганд, содержащий разветвление при С-6 (**8m**) и пента- α -(1 \rightarrow 6)-маннозид (**14m**), родственный фрагменту главной цепи маннана *C. albicans*. Как видно из результатов скрининга (рис. 1, з), ни один из лигандов, содержащих исключительно α -гликозидные связи (**1m-8m**), не обладает родством к моноклональному антителу СМ532. Это можно объяснить иммунодоминантной ролью

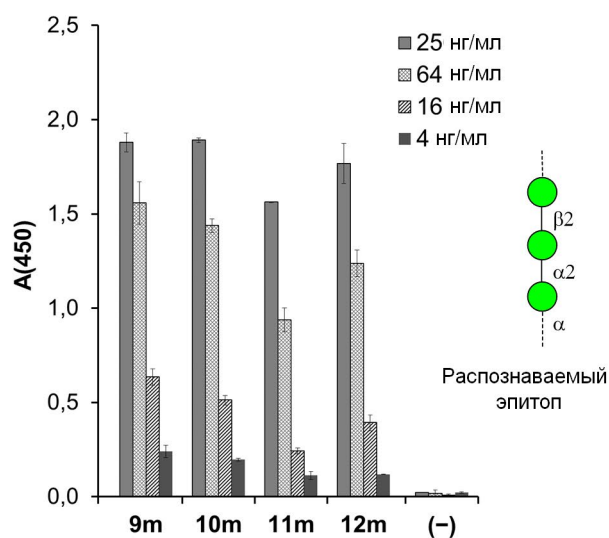
а



б



в



г

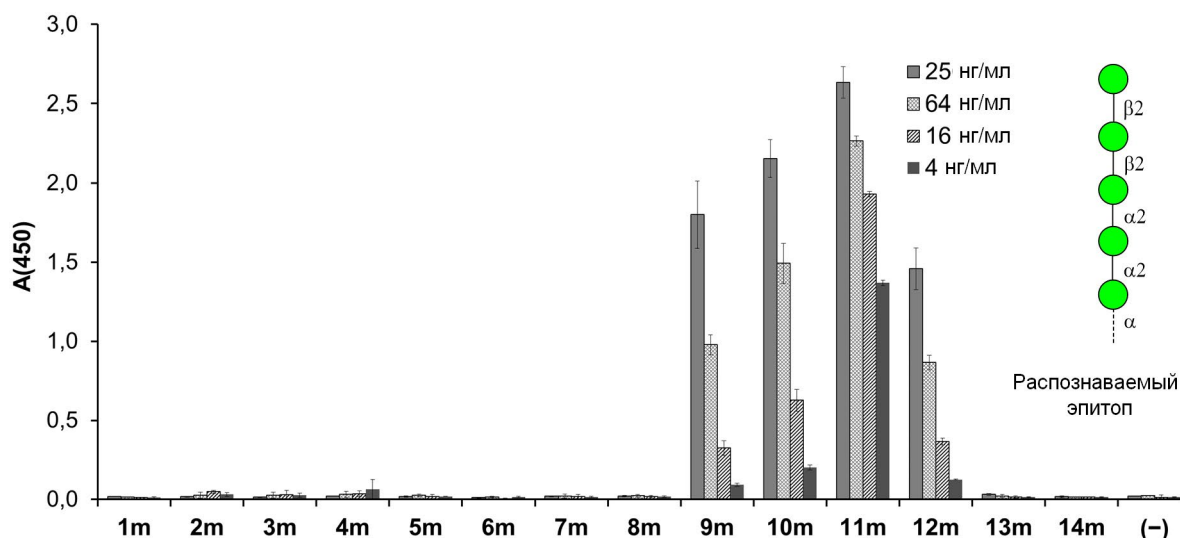


Рис. 1. Результаты скрининга углеводной специфичности антитела CM532 с использованием углеводных лигандов 1m–14m (а), родственных маннану *Candida albicans*. Схематичное изображение иммобилизации конъюгатов с ПАА и биотином на поверхности планшета (б). Результаты ИФА, полученные с использованием конъюгатов с полиакриламидом (в) и биотином (г); ПАА – полиакриламид

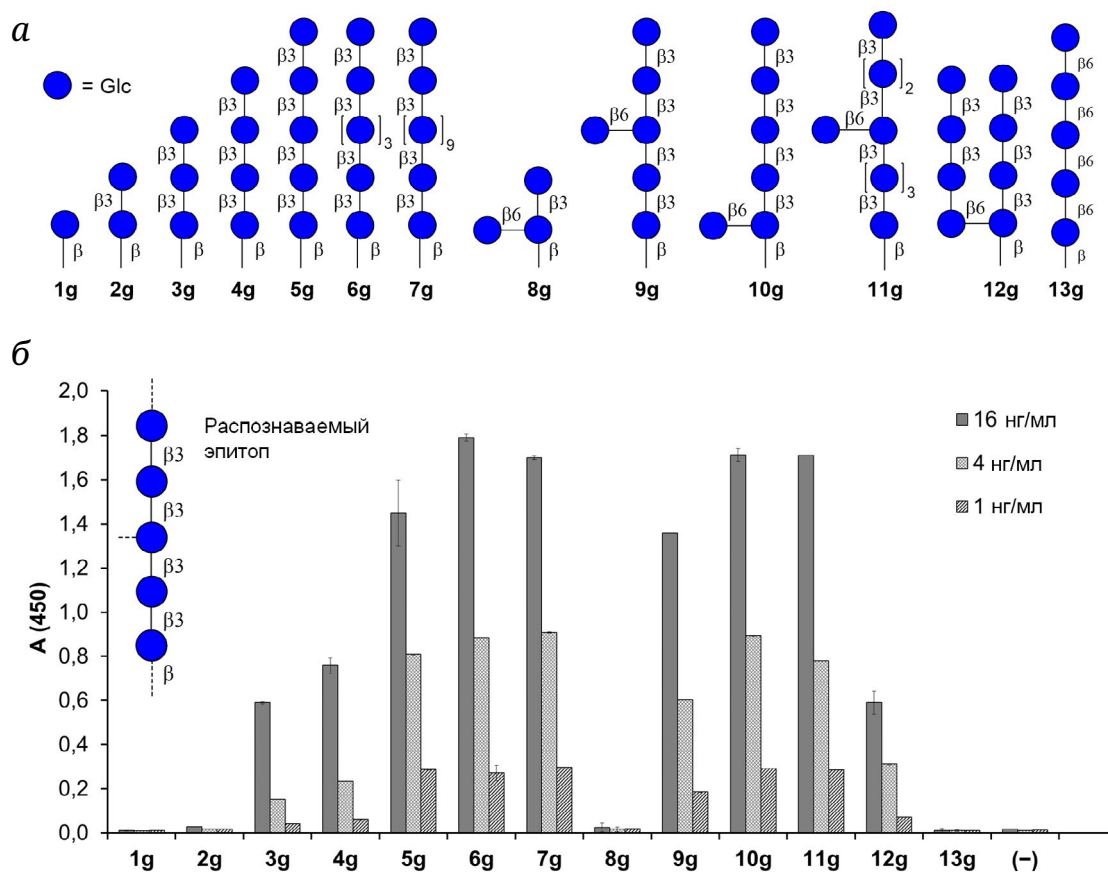


Рис. 2. Результаты скрининга углеводной специфичности антитела FG70 с использованием углеводных лигандов **1g–13g** (а), родственных общему грибковому маркеру β -(1 \rightarrow 3)-D-глюкану. б – Результаты ИФА, полученные с использованием биотинилированных конъюгатов

β -(1 \rightarrow 2)-связанного фрагмента, входящего в состав гаптена **1**. Рассматриваемое антитело связывается с олигоманнозидами, содержащими одну, две или три β -(1 \rightarrow 2)-гликозидные связи (соединения **9m**, **10m**, **11m** и **12m** соответственно), но не связывается с лигандами, содержащими более длинную последовательность из четырёх β -(1 \rightarrow 2)-связанных остатков маннозы (**13m**). Вероятно, в этом случае решающую роль играют конформационные особенности гексасахаридного лиганда **13m**, не позволяющие ему эффективно взаимодействовать с центром связывания антитела CM532. Как следует из высоких значений поглощения (рис. 1, г) для всех рассмотренных концентраций, наибольшим сродством к антителу CM532 обладает пентасахарид **11m**, а тетрасахарид **10m** лишь незначительно ему уступает. Хуже распознаются лиганды **9m** и **12m**. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что минимальный эпитоп, специфично распознаваемый моноклональным антителом CM532, представляет собой трисахаридную последовательность β -Man-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 2)- α -Man.

Аналогичным образом был проведён скрининг углеводных лигандов для изучения эпитопной специфичности моноклонального анти-

тела FG70, полученного в ответ на иммунизацию конъюгатом гепта- β -(1 \rightarrow 3)-глюкозида (**2-KLH**). В качестве покрывающих антигенов для ИФА были использованы биотинилированные производные линейных β -(1 \rightarrow 3)-глюкозидов, содержащих от одного до тринадцати звеньев глюкозы (**1g–7g**), а также β -(1 \rightarrow 3)-глюкозидов, содержащих разветвления в виде одного остатка β -(1 \rightarrow 6)-связанной глюкозы в различных участках цепи (**8g–11g**), и октасахарид **12g**, в котором боковая цепь образована четырьмя остатками глюкозы. В качестве отрицательного контроля был выбран пента- β -(1 \rightarrow 6)-глюкозид.

В результате проведённого скрининга (рис. 2) было установлено, что моно- и дисахаридные фрагменты (**1g** и **2g**) не распознаются антителом FG70 совсем; далее, по мере роста цепи от три- до пентасахарида (**3g–5g**) эффективность связывания возрастает, однако дальнейшее удлинение цепи (7 остатков – **6g**, 13 остатков – **7g**) не приводит к улучшению взаимодействия и выходит на плато.

При сравнении значений поглощения для лигандов **5g**, **9g** и **10g** (рис. 2, б), содержащих одинаковый фрагмент пента- β -(1 \rightarrow 3)-глюкозида, можно

заклучить, что дополнительное 3,6-разветвление практически не влияет на аффинность. Также на уровне пентасахарида **5g** распознаётся нонасахарид **11g** с одним 3,6-разветвлением в середине цепи. Олигосахаридные лиганды, в структуре которых отсутствует β -(1 \rightarrow 3)-пентаглюкозидный фрагмент, либо не распознаются (соединение **8g** и **13g**), либо распознаются значительно слабее (соединение **12g**). Эти данные позволяют сделать вывод о том, что эпитоп, специфично распознаваемый моноклональным антителом FG70, расположен в пентасахаридной последовательности β -Glc-(1 \rightarrow 3)- β -Glc-(1 \rightarrow 3)- β -Glc-(1 \rightarrow 3)- β -Glc-(1 \rightarrow 3)- β -Glc.

Ранее авторами работы были исследованы моноклональные антитела 3G11 и 5H5, которые были отобраны после иммунизации мышей нона- β -(1 \rightarrow 3)-глюкозидом [16]. Однако сравнительный анализ предельных значений концентраций антител, детектируемых в тестах ИФА, даёт основания полагать, что антитело FG70 обладает более высокой аффинностью к целевым глюканам, чем ранее описанные антитела 3G11 и 5H5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате данной работы были получены и охарактеризованы два моноклональных антитела, обладающие высокой специфичностью по отношению к фрагментам двух грибковых полисахаридов. Это позволяет рассматривать антитела CM532 и FG70 в качестве перспективных для разработки диагностикомов, предназначенных для выявления соответствующих грибковых инфекций. Используемое сейчас в коммерческих диагностических наборах моноклональное антитело ЕВСА-1 также распознаёт трисахаридный

фрагмент β -Man-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 2)- α -Man [13], что указывает на перспективность полученного в данной работе антитела CM532.

Используемые в настоящее время наборы для диагностики грибковых глюканов содержат ферменты, выделяемые из живых организмов (мечехвостов), поэтому их использование имеет существенные ограничения. Применение ИФА-наборов на основе синтетических углеводных антигенов и гомологичных моноклональных антител позволит упростить производство, а также получать более достоверные и воспроизводимые диагностические результаты [34]. Охарактеризованные в данной работе антитела FG70 и CM532 обладают необходимыми для этого характеристиками.

Вклад авторов. В.Б. Крылов, Н.Э. Нифантьев – концепция и руководство работой; А.В. Полянская, А.Н. Кузнецов, А.Д. Титова, В.И. Юдин, Ю.Е. Цветков, О.Н. Юдина, Д.В. Яшунский – проведение экспериментов; М.Л. Генинг, Н.Э. Нифантьев – обсуждение результатов исследования; М.Л. Генинг, В.Б. Крылов – написание текста; А.Н. Кузнецов, Н.Э. Нифантьев – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-03-2024-401/3 от 30.05.2024).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Soriano, A., Honore, P. M., Puerta-Alcalde, P., Garcia-Vidal, C., Pagotto, A., Gonçalves-Bradley, D. C., and Verweij, P. E. (2023) Invasive candidiasis: current clinical challenges and unmet needs in adult populations, *J. Antimicrob. Chemother.*, **78**, 1569-1585, <https://doi.org/10.1093/jac/dkad139>.
2. Denning, D. W. (2024) Global incidence and mortality of severe fungal disease, *Lancet Infect. Dis.*, **24**, e428-e438, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00692-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8).
3. Terrero-Salcedo, D., and Powers-Fletcher, M. V. (2020) Updates in laboratory diagnostics for invasive fungal infections, *J. Clin. Microbiol.*, **58**, e01487-19, <https://doi.org/10.1128/JCM.01487-19>.
4. Barantsevich, N., and Barantsevich, E. (2022) Diagnosis and treatment of invasive candidiasis, *Antibiotics*, **11**, 718, <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060718>.
5. Roslansky, P. F., and Novitsky, T. J. (1991) Sensitivity of *Limulus* amebocyte lysate (LAL) to LAL-reactive glucans, *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2477-2483, <https://doi.org/10.1128/jcm.29.11.2477-2483.1991>.
6. He, S., Hang, J.-P., Zhang, L., Wang, F., Zhang, D.-C., and Gong, F.-H. (2015) A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3- β -D-glucan for invasive fungal infection: focus on cutoff levels, *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **48**, 351-361, <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.06.009>.
7. Synytsya, A., and Novák, M. (2013) Structural diversity of fungal glucans, *Carbohydr. Polym.*, **92**, 792-809, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.077>.

8. Senn, L., Calandra, T., Bille, J., and Marchetti, O. (2008) Beta-glucan in the diagnosis of invasive fungal disease: reply letter to Pasqualotto and Sukiennik, *Clin. Infect. Dis.*, **47**, 293-294, <https://doi.org/10.1128/JCM.01737-13>.
9. Mikulska, M., Calandra, T., Sanguinetti, M., Poulain, D., Viscoli, C., and Third European Conference on Infections in Leukemia Group (2010) The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia, *Crit. Care*, **14**, R222, <https://doi.org/10.1186/cc9365>.
10. Solovev, A. S., Tsarapaev, P. V., Krylov, V. B., Yashunsky, D. V., Kushlinskii, N. E., and Nifantiev, N. E. (2023) A repertoire of anti-mannan *Candida albicans* antibodies in the blood sera of healthy donors, *Russ. Chem. Bull.*, **72**, 263-268, <https://doi.org/10.1007/s11172-023-3731-3>.
11. Clancy, C. J., and Nguyen, M. H. (2018) Diagnosing invasive candidiasis, *J. Clin. Microbiol.*, **56**, e01909-17, <https://doi.org/10.1128/JCM.01909-17>.
12. The Cava Trem Study Group, León, C., Ruiz-Santana, S., Saavedra, P., Castro, C., Loza, A., Zakariya, I., Úbeda, A., Parra, M., Macías, D., Tomás, J. I., Rezusta, A., Rodríguez, A., Gómez, F., and Martín-Mazuelos, E. (2016) Contribution of *Candida* biomarkers and DNA detection for the diagnosis of invasive candidiasis in ICU patients with severe abdominal conditions, *Crit. Care*, **20**, 149, <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1324-3>.
13. Krylov, V. B., Solovev, A. S., Puchkin, I. A., Yashunsky, D. V., Antonets, A. V., Kutsevalova, O. Y., and Nifantiev, N. E. (2021) Reinvestigation of carbohydrate specificity of EBCA-1 monoclonal antibody used for the detection of *Candida* mannan, *J. Fungi*, **7**, 504, <https://doi.org/10.3390/jof7070504>.
14. Tuzikov, A., Chinarev, A., Shilova, N., Gordeeva, E., Galanina, O., Ovchinnikova, T., Schaefer, M., and Bovin, N. (2021). 40 years of glyco-polyacrylamide in glycobiology, *Glycoconj. J.*, **38**, 89-100, <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09965-5>.
15. Krylov, V. B., and Nifantiev, N. E. (2019) Synthetic oligosaccharides mimicking fungal cell wall polysaccharides, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **425**, 1-16, https://doi.org/10.1007/82_2019_187.
16. Matveev, A. L., Krylov, V. B., Khlusevich, Y. A., Baykov, I. K., Yashunsky, D. V., Emelyanova, L. A., Tsvetkov, Y. E., Karelin, A. A., Bardashova, A. V., Wong, S. S. W., Aimanian, V., Latgé, J.-P., Tikunova, N. V., and Nifantiev, N. E. (2019) Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognizing β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan antigen, *PLoS One*, **14**, e0215535, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215535>.
17. Matveev, A. L., Krylov, V. B., Emelyanova, L. A., Solovev, A. S., Khlusevich, Y. A., Khlusevich, Y. A., Baykov, I. K., Fontaine, T., Latgé, J.-P., Tikunova, N. V., and Nifantiev, N. E. (2018) Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognize *Aspergillus fumigatus* galactomannan, *PLoS One*, **13**, e0193938, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193938>.
18. Karelin, A. A., Tsvetkov, Yu. E., Kogan, G., Bystricky, S., and Nifantiev, N. E. (2007) Synthesis of oligosaccharide fragments of mannan from *Candida albicans* cell wall and their BSA conjugates, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **33**, 110-121, <https://doi.org/10.1134/S106816200701013X>.
19. Karelin, A. A., Tsvetkov, Y. E., Paulovičová, L., Bystrický, S., Paulovičová, E., and Nifantiev, N. E. (2009) Synthesis of a heptasaccharide fragment of the mannan from *Candida guilliermondii* cell wall and its conjugate with BSA, *Carbohydr. Res.*, **344**, 29-35, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.09.016>.
20. Karelin, A. A., Tsvetkov, Y. E., Paulovičová, L., Bystrický, S., Paulovičová, E., and Nifantiev, N. E. (2010) Synthesis of 3, 6-branched oligomannoside fragments of the mannan from *Candida albicans* cell wall corresponding to the antigenic factor 4, *Carbohydr. Res.*, **345**, 1283-1290, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.11.012>.
21. Argunov, D. A., Karelin, A. A., Grachev, A. A., Tsvetkov, Yu. E., and Nifantiev, N. E. (2011) A new synthesis of the 3,6-branched hexasaccharide fragment of the cell wall mannan in *Candida albicans*, corresponding to the antigenic factor 4, *Russ. Chem. Bull.*, **60**, 1004-1011, <https://doi.org/10.1007/s11172-011-0157-0>.
22. Karelin, A. A., Tsvetkov, Yu. E., Paulovičová, E., Paulovičová, L., and Nifantiev, N. E. (2015) Blockwise synthesis of a pentasaccharide structurally related to the mannan fragment from the *Candida albicans* cell wall corresponding to the antigenic factor 6, *Russ. Chem. Bull.*, **64**, 2942-2948, <https://doi.org/10.1007/s11172-015-1251-5>.
23. Karelin, A. A., Tsvetkov, Y. E., Paulovičová, E., Paulovičová, L., and Nifantiev, N. E. (2016) A blockwise approach to the synthesis of (1 \rightarrow 2)-linked oligosaccharides corresponding to fragments of the acid-stable β -mannan from the *Candida albicans* cell wall, *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, 1173-1181, <https://doi.org/10.1002/ejoc.201501464>.
24. Karelin, A. A., Ustyuzhanina, N. E., Tsvetkov, Y. E., and Nifantiev, N. E. (2019) Synthesis of a biotinylated probe from biotechnologically derived β -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-D-mannopyranose for assessment of carbohydrate specificity of antibodies, *Carbohydr. Res.*, **471**, 39-42, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.10.013>.
25. Yashunsky, D. V., Tsvetkov, Y. E., Grachev, A. A., Chizhov, A. O., and Nifantiev, N. E. (2016) Synthesis of 3-aminopropyl glycosides of linear β -(1 \rightarrow 3)-D-glucooligosaccharides, *Carbohydr. Res.*, **419**, 8-17, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.10.012>.
26. Yashunsky, D. V., Tsvetkov, Yu. E., and Nifantiev, N. E. (2015) Synthesis of 3-aminopropyl glycosides of branched β -(1 \rightarrow 3)-glucooligosaccharides, *Russ. Chem. Bull.*, **64**, 2922-2931, <https://doi.org/10.1007/s11172-015-1249-z>.

27. Yashunsky, D. V., Tsvetkov, Y. E., and Nifantiev, N. E. (2016) Synthesis of 3-aminopropyl glycoside of branched β -(1 \rightarrow 3)-D-glucoside, *Carbohydr. Res.*, **436**, 25-30, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.11.005>.
28. Tsvetkov, Y. E., Burg-Roderfeld, M., Loers, G., Ardá, A., Sukhova, E. V., Khatuntseva, E. A., Grachev, A. A., Chizhov, A. O., Siebert, H.-C., Schachner, M., Jiménez-Barbero, J., and Nifantiev, N. E. (2012) Synthesis and molecular recognition studies of the HNK-1 trisaccharide and related oligosaccharides. The specificity of monoclonal anti-HNK-1 antibodies as assessed by surface plasmon resonance and STD NMR, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 426-435, <https://doi.org/10.1021/ja2083015>.
29. Krylov, V. B., Kuznetsov, A. N., Polyanskaya, A. V., Tsarapaev, P. V., Yashunsky, D. V., Kushlinskii, N. E., and Nifantiev, N. E. (2023) ASCA-related antibodies in the blood sera of healthy donors and patients with colorectal cancer: characterization with oligosaccharides related to *Saccharomyces cerevisiae* mannan, *Front. Mol. Biosci.*, **10**, 1296828, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1296828>.
30. Sendid, B., Lecointe, K., Collot, M., Danzé, P.-M., Damiens, S., Drucbert, A.-S., Fradin, C., Vilcot, J.-P., Grenouillet, F., Dubar, F., de Ruyck, J., Jawhara, S., Mallet, J.-M., and Poulain, D. (2021) Dissection of the anti-*Candida albicans* mannan immune response using synthetic oligomannosides reveals unique properties of β -1,2 mannotriose protective epitopes, *Sci. Rep.*, **11**, 10825, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90402-4>.
31. Singh, R. K., Reuber, E. E., Bruno, M., Netea, M. G., and Seeberger, P. H. (2023) Synthesis of oligosaccharides to identify an immunologically active epitope against *Candida auris* infection, *Chem. Sci.*, **14**, 7559-7563, <https://doi.org/10.1039/D3SC01242E>.
32. Ruiz-Herrera, J., and Ortiz-Castellanos, L. (2019) Cell wall glucans of fungi. A review, *Cell Surf.*, **5**, 100022, <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2019.100022>.
33. Friedman Ohana, R., Kirkland, T. A., Woodroffe, C. C., Levin, S., Uyeda, H. T., Otto, P., Hurst, R., Robers, M. B., Zimmerman, K., Encell, L. P., and Wood, F. V. (2015) Deciphering the cellular targets of bioactive compounds using a chloroalkane capture tag, *ACS Chem. Biol.*, **10**, 2316-2324, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00351>.
34. Sunamura, E., Iwasaki, M., Shiina, S., Kitahara, S., Yotani, T., Manabe, M., and Miyazaki, O. (2020) A novel enzyme immunoassay for the measurement of plasma (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan levels, *J. Immunol. Methods*, **487**, 112872, <https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112872>.

CHARACTERIZATION OF CARBOHYDRATE SPECIFICITY OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO FUNGAL ANTIGENIC MARKERS USING BIOTINYLATED OLIGOSACCHARIDES AS COATING ANTIGENS

**M. L. Gening¹, A. V. Polyanskaya¹, A. N. Kuznetsov¹, A. D. Titova¹, V. I. Yudin¹,
D. V. Yashunskiy², Y. E. Tsvetkov², O. N. Yudina², V. B. Krylov^{1*}, and N. E. Nifantiev^{2*}**

¹ Laboratory of Synthetic Glycovaccines, N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; e-mail: v_krylov@ioc.ac.ru

² Laboratory of Glycoconjugate Chemistry, N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; e-mail: nen@ioc.ac.ru

Mannan and β -(1 \rightarrow 3)-glucan are two polysaccharide markers that are characteristic for a number of fungal pathogens, including *Candida albicans*, which is the most common cause of invasive mycoses in humans. In this study, we examined the epitope specificity of two monoclonal antibodies, CM532 and FG70, which recognize certain oligosaccharide fragments from these fungal polysaccharides. Using a panel of biotinylated oligosaccharides as coating antigens, we found that antibody CM532, obtained by immunization with a pentamannoside β -Man-(1 \rightarrow 2)- β -Man-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 2)- α -Man KLH conjugate, selectively recognizes the trisaccharide β -Man-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 2)- α -Man epitope. Another antibody, FG70, obtained by immunization with heptaglucan β -Glc-(1 \rightarrow 3)-[β -Glc-(1 \rightarrow 3)]₅- β -Glc with KLH, interacts with a linear β -(1 \rightarrow 3)-linked pentaglucofragment, and the presence of 3,6-branches within this epitope does not significantly affect the interaction efficiency. The data obtained indicate that the monoclonal antibodies under consideration can be used to create currently lacking effective diagnostics for the detection of fungal infections.

Keywords: fungal diseases, β -(1 \rightarrow 3)-glucan, α -mannan, β -mannan, monoclonal antibodies, carbohydrate specificity, oligosaccharides

НОВЫЕ РАМНОЗОСОДЕРЖАЩИЕ ГЛИКОПОЛИМЕРЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *Rathayibacter festucae* ВКМ Ас-1390[†]

© 2024 **А.С. Шашков**¹, Н.В. Потехина^{2*}, Е.М. Тульская², А.С. Дмитренко¹,
С.Н. Сенченкова¹, Л.В. Дорофеева³, Л.И. Евтушенко³

¹ Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991 Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: potekhina56@mail.ru

³ ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), 142290 Пушкино, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 05.10.2024

После доработки 28.10.2024

Принята к публикации 30.10.2024

Rathayibacter festucae ВКМ Ас-1390[†] (семейство Microbacteriaceae, класс Actinomycetes) содержит в клеточной стенке три гликополимера. Структуры гликополимеров устанавливали химическими и ЯМР-спектроскопическими методами. Один из них, рамноманнан, построен из повторяющихся тетрасахаридных звеньев, несущих боковые остатки ксилопиранозы: $\rightarrow 2)$ - α -[β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)]-D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-(1 \rightarrow). Второй полимер, обнаруженный у исследованного штамма в минорном количестве, представляет собой рамнан: $\rightarrow 2)$ - α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow). Третий полимер является тейхуроновой кислотой, ацетилированной остатками пировиноградной кислоты: $\rightarrow 2)$ - α -[4,6-S-Pyrl]-D-Manp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow). Структуры рамноманнана и тейхуроновой кислоты являются новыми для представителей рода *Rathayibacter* и прокариот в целом. Результаты настоящего исследования расширяют представления о структурном разнообразии микробных гликополимеров и согласуются с ранее описанными данными о специфичности структур и состава гликополимеров для видов рода *Rathayibacter*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Rathayibacter*, гликополимер клеточной стенки, полисахарид, рамноманнан, D-рамнан, тейхуроновая кислота, пируват.

DOI: 10.31857/S0320972524120051 EDN: IFNBHD

ВВЕДЕНИЕ

Актинобактерии рода *Rathayibacter* известны с конца позапрошлого столетия – с момента обнаружения бактериального заболевания ежи сборной (*Dactylis glomerata* L.), вызванного бактерией «*Aplanobacter rathayi*» (ныне *Rathayibacter rathayi*) [1]. К началу нашей работы род *Rathayibacter* включал 11 зарегистрированных видов, из них 9 – с валидно опубликованными наименованиями (<https://psn.dsmz.de/genus/rathayibacter>).

Виды этого рода характеризуются наличием в клеточной стенке пептидогликана с 2,4-диаминомасляной кислотой (L-изомер), а также рамнозы и маннозы в качестве основных диагностических сахаров [2, 3]. Вышеуказанные сахара полностью или частично входят в состав гликополимеров клеточных стенок, ковалентно связанных с пептидогликаном [4].

Эти гликополимеры представляют собой нейтральные рамнозосодержащие полисахариды (рамнозилированный глюкоманнан и разные

Принятые сокращения: COSY – корреляционная спектроскопия; HMBC – гетероядерная корреляция ¹H,¹³C через несколько связей; HSQC – протон-детектированная НОНО-квантовая корреляция; J – константа спин-спинового взаимодействия; ROESY – двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; TOCSY – тотальная корреляционная спектроскопия; TSP – натриевая соль 3-(триметилсилил)-3,3,2,2-тетрадегтеропропионовой кислоты; δ_c , δ_H – значения химических сдвигов атомов ¹³C, ¹H соответственно.

* Адресат для корреспонденции.

по структуре рамноманнаны и рамнанны), обычно присутствующие в сочетании с тейхуроновыми кислотами [4]. При этом каждый вид *Rathayibacter* характеризуется индивидуальным набором от одного до трех полимеров, в большинстве случаев включающим полимеры как нейтральной, так и кислой природы [4]. Химические структуры гликополимеров, выявленных у *Rathayibacter*, не были описаны ранее у других прокариот.

В данной работе мы сообщаем о новых структурах гликополимеров, идентифицированных в клеточной стенке штамма *Rathayibacter festucae* ВКМ Ас-1390^Т, выделенного из овсяницы красной (*Festuca rubra* L.) [3, 5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальный штамм *Rathayibacter festucae* ВКМ Ас-1390^Т был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) (www.vkm.ru).

Условия культивирования и получение биомассы для исследований, а также выделение и очистка клеточных стенок описаны в работе Dmitrenok et al. [6].

Выделение гликополимеров проводили методом ТХУ-экстракций: 10% ТХУ, 4 °С, 24 ч и затем – 5% ТХУ, 90 °С, 20 мин, как описано ранее [6]; выход препаратов гликополимеров соответственно составил 12,3% и 19,7% от веса сухой клеточной стенки. Полученные препараты гликополимеров, проявившие полную идентичность при их предварительном исследовании химическими и ЯМР-спектроскопическими методами, были объединены и обозначены как суммарный препарат.

Методы кислотного гидролиза клеточной стенки и препаратов гликополимеров (2 М HCl, 3 ч, 100 °С), нисходящая хроматография, а также реактивы для проявления продуктов их кислотной дегградации описаны ранее [6].

Метод анионообменной гель-хроматографии на колонке (80 × 1,5 см) с DEAE-целлюлозой («Тоуорpearl», Япония) использовали для разделения гликополимеров суммарного препарата, как описано ранее [7].

Дегградацию по Смиту нейтральной фракции (нейтральных полисахаридов), приводящую к расщеплению основной цепи, проводили, как описано ранее [6].

Абсолютную конфигурацию моносахаридов и глюкуроновой кислоты определяли по эффектам гликозилирования в остатках моносахаридов в спектрах ЯМР ¹³С, согласно закономерностям, изложенным в работе Shashkov et al. [8], и на основании принадлежности глюкозы к D-ряду.

Спектры ЯМР снимали на приборе Bruker AV600 («Bruker», Германия) для растворов

в 99,96% D₂O при температурах, обеспечивающих минимальное перекрытие остаточного сигнала дейтерированной воды с сигналами полимеров. В качестве внутреннего эталона использовали натриевую соль 3-(триметилсилил)-3,3,2,2-тетрадейтеропропионовой кислоты (TSP; δ_H 0,0 м.д.; δ_C –1,6 м.д.). Двумерные ЯМР-эксперименты выполняли с использованием стандартного математического обеспечения («Bruker Optik GmbH», Германия). Время спин-лока в экспериментах ¹H,¹H TOCSY (тотальная корреляционная спектроскопия) составляло 100 мс. Время смешивания в эксперименте ¹H,¹H ROESY (двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат) составляло 150 мс. Эксперименты по гетероядерной корреляции ¹H,¹³С NMBC были оптимизированы для констант спин-спинового взаимодействия J_{H,C}, 8 Гц.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С помощью нисходящей хроматографии на бумаге в кислотном гидролизате клеточной стенки были выявлены глюкоза, манноза, ксилоза и рамноза. Эти же моносахариды обнаружены в гидролизатах суммарного препарата гликополимеров.

Спектр ¹³С ЯМР суммарного препарата (рис. 1, а) был типичен для нерегулярного полимера и/или смеси полимеров. Спектр содержал, в частности, 8 сигналов различной интенсивности в области аномерного углеродного резонанса δ_C 99,6–104,6 м.д., 4 сигнала 6-дезоксисахаров при δ_C 17,9–18,3 м.д. и сигнал при δ_C 26,0 м.д., характерный для пирувата в шестичленном цикле.

В спектре также наблюдались 2 сигнала в области резонанса карбонильных групп при δ_C 175,5 и 174,9 м.д. Мы предположили, что последние сигналы принадлежат COOH-группе, и предприняли попытку разделить препарат с помощью анионной гель-хроматографии на DEAE-целлюлозе. В результате разделения были получены две фракции: нейтральная и кислая.

Нейтральная фракция (нейтральные полисахариды). Спектр ЯМР ¹³С нейтральной фракции (рис. 1, б) снова показал признаки нерегулярности. Аномерная область углеродного спектра содержала 4 сигнала различной интенсивности, которые представляют собой 2 интенсивных пика при δ_C 103,3 и 101,9 м.д. и второстепенные пики при δ_C 102,8 и 102,5 м.д. Высокопольная область спектра содержала 2 сигнала при δ_C 18,0 и 18,2 м.д. Спектр ¹H ЯМР нейтральной фракции (рис. 2, верхние проекции) также содержал сигналы различной интенсивности, что указывало на нерегулярность полисахарида.

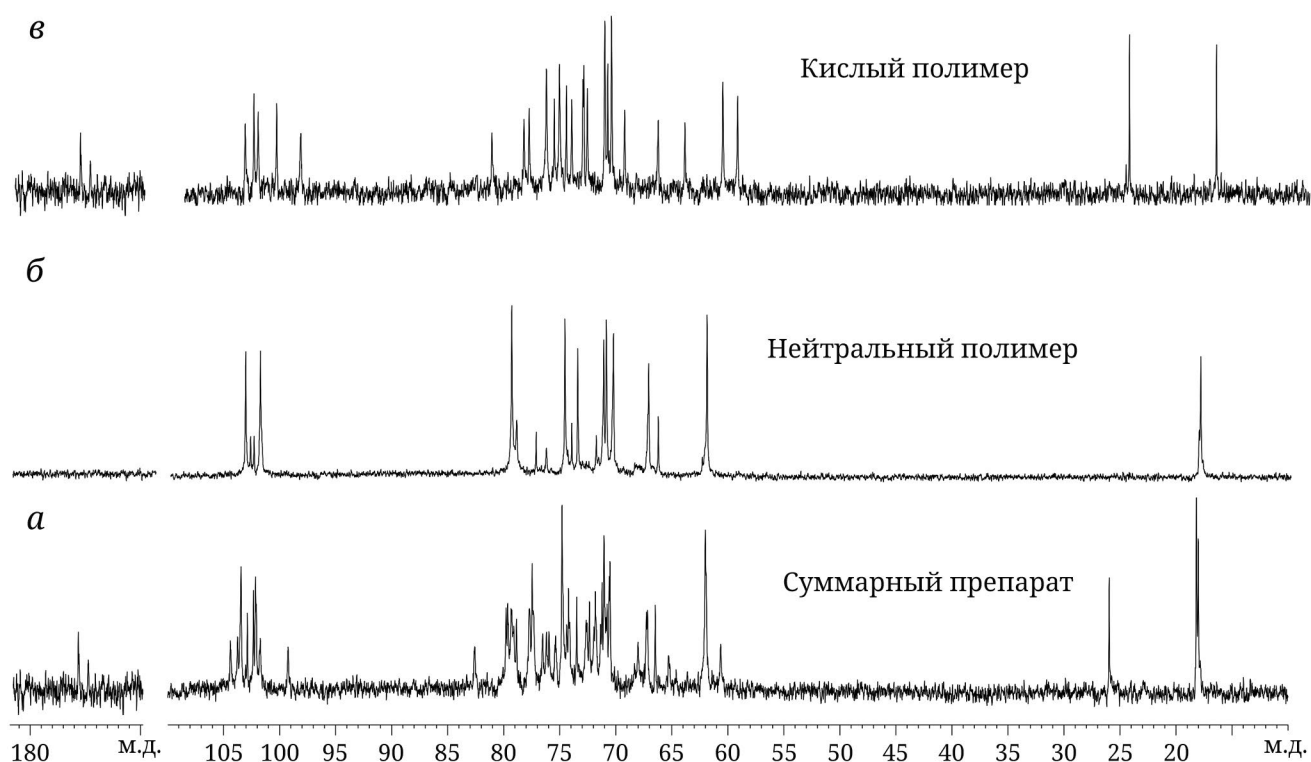


Рис. 1. Спектры ЯМР ^{13}C полисахаридов из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ас-1390^T: суммарный препарат (а); нейтральная фракция (б); кислая фракция (в)

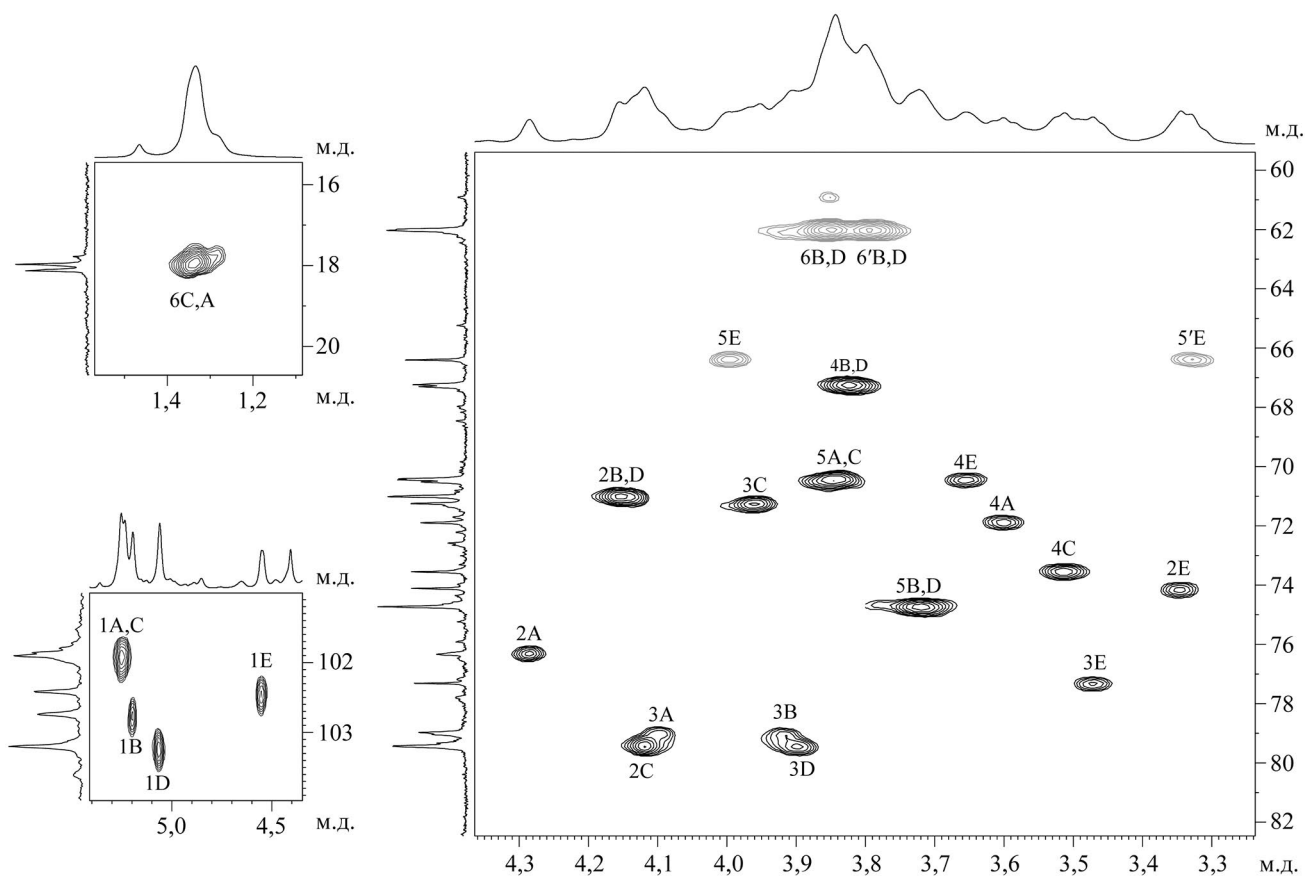


Рис. 2. Части спектра ^1H , ^{13}C HSQC нейтрального полисахарида(ов) из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ас-1390^T. Части спектров ЯМР ^1H и ^{13}C показаны вдоль горизонтальной и вертикальной осей соответственно. Арабские цифры относятся к атомам углерода в остатках, как обозначено в табл. 1

Таблица 1. Химические сдвиги в спектрах ЯМР ^{13}C ($\delta_{\text{с TSP}} -1,6$) и ^1H ($\delta_{\text{H TSP}} 0,0$) полисахаридов из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ас-1390^Т

Остаток		С-1 H-1	С-2 H-2	С-3 H-3	С-4 H-4	С-5 H-5	С-6 H-6 (H-6a, 6b)
Нейтральный полисахарид (полимер 1)							
→2)-α-D-Rhap-(1→ 3) ↑	(A)	101,9 5,24	76,3 4,28	79,0 4,10	71,9 3,60	70,4 3,84	18,2 1,34
β-D-Xylp-(1	(E)	102,5 4,55	74,1 3,35	77,3 3,48	70,5 3,65	66,4 4,00; 3,33	
→3)-α-D-Manp-(1→	(B)	102,8 5,19	71,0 4,15	79,0 3,92	67,3 3,82	74,7 3,72	62,0 3,85; 3,79
→2)-α-D-Rhap-(1→	(C)	101,9 5,25	79,4 4,12	71,2 3,96	73,6 3,51	70,5 3,85	18,0 1,33
→3)-α-D-Manp-(1→	(D)	103,2 5,06	71,0 4,15	79,4 3,90	67,2 3,83	74,7 3,72	62,0 3,85; 3,79
Продукт деградации по Смиту нейтральной фракции (минорный полимер 2)							
→2)-α-D-Rhap-(1→	(A')	102,2 5,19	79,3 4,07	71,2 3,95	73,5 3,51	70,6 3,83	18,0 1,32
→3)-α-D-Rhap-(1→	(B')	103,3 4,96	71,2 4,15	78,9 3,85	73,0 3,56	70,7 3,76	17,9 1,27
Кислый полисахарид (полимер 3)							
→2)-β-D-Manp-(1→ 4) 6) \ / S-Pyr	(A)	103,4 5,02 175,5	79,8 4,33 102,5	70,9 3,82 26,0 1,49	75,6 3,64	67,9 3,41	65,5 4,08; 3,72
→4)-β-L-Rhap-(1→	(B)	101,8 4,85	72,4 4,04	74,2 3,72	82,6 3,51	72,0 3,45	18,3 1,28
→4)-β-D-Glcp-(1→	(C)	103,8 4,48	74,5 3,33	76,7 3,64	77,8 3,64	76,1 3,53	62,2 3,92; 3,81
→4)-α-D-Glcp-(1→	(D)	99,6 5,47	72,6 3,57	72,0 3,76	79,4 3,64	72,6 3,77	60,8 3,86; 3,82
→4)-β-D-GlcpA-(1→	(E)	104,6 4,67	74,6 3,48	77,1 3,77	77,8 3,84	76,7 3,90	174,9

Сигналы как в ^1H -, так и ^{13}C -спектрах полимера были отнесены путем комбинированного использования методов 2D ЯМР, а именно гомоядерных $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (корреляционная спектроскопия), TOCSY, ROESY и гетероядерных $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC и $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC экспериментов (табл. 1).

Спектры 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, TOCSY, ROESY выявили остатки α-рамнопиранозы (α-Rhap), α-маннопиранозы (α-Manp) и β-ксилопиранозы (β-Xylp).

Анализ спектра протон-детектированной НОНО-квантовой корреляции $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC (рис. 2) показал замещение α-Rhap в позициях 2 и 3 ($\delta_{\text{с-2}}$ 76,3 м.д.; $\delta_{\text{с-3}}$ 79,0 м.д.) (остаток А, табл. 1) и только в позиции 2 ($\delta_{\text{с-2}}$ 79,4 м.д. остаток С); заме-

щение остатков α-Manp в положение 3 ($\delta_{\text{с-3}}$ 79,0 м.д., остаток В и 79,4 м.д., остаток D). Остатки β-Xylp были определены терминальными (остаток E).

Выводы о составе сахаров, размере цикла и аномерной конфигурации (полимер 1, табл. 1) были сделаны на основе сравнения химических сдвигов ^{13}C остатков сахаров и соответствующих родоначальных пираноз [9–11].

Последовательность остатков в повторяющемся звене была установлена путем анализа спектров $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY и $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC.

В спектре $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY (рис. 3) наблюдались следующие корреляционные пики $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{H}}$ между остатками: 1(A)/H-3,4(B) (5,24/3,92, 3,82); H-1(C)/

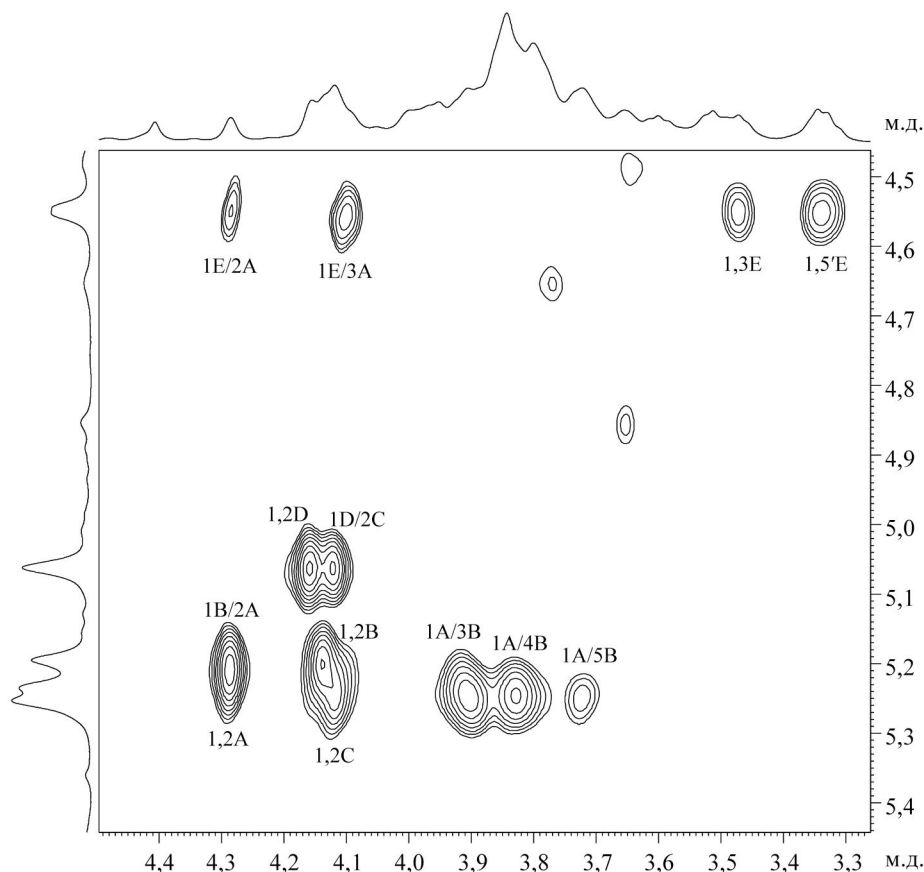


Рис. 3. Часть спектра $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY нейтрального полисахарида(ов) из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ас-1390^T. Арабские цифры относятся к протонам в остатках, как указано в табл. 1. Косая черта относится к пикам корреляции между остатками

H-3,4(D) (5,25/3,90, 3,83); H-1(B)/H-2(A) (5,19/4,28); H-1(C)/H-3,4(D) (5,25/3,83) и H-1(E)/H-3(A) (4,55/4,10), что указывает на присутствие в нейтральной фракции двух типов повторяющихся единиц в полимере или двух полимеров.

В конечном итоге структуры полимеров были подтверждены при анализе спектра $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ NMBC (рис. 4), где были обнаружены следующие корреляционные пики $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ между остатками: 1A/3B (5,24/79,0); 1B/2A (5,19/76,3); 1E/3A (4,55/79,0); 1C/3D (5,25/79,4); 1D/2C (5,06/79,4); 2A/1B (4,28/102,8); 3D/1A (3,90/101,9); 3A/1E (4,10/102,5); 2C/1D (4,12/103,2) и 3D/1C (3,90/101,9).

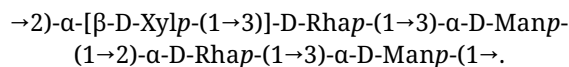
Абсолютные конфигурации остатков сахаров были определены на основе закономерностей, описанных ранее [8], и предположения о D-конфигурации остатков ксилозы. Большие по модулю и отрицательные β -эффекты замещения для C-2 (–3,1 м.д.) и C-4 (–1,7 м.д.) остатка А характерны для той же абсолютной конфигурации гликозилирующих (β -Xylp) и гликозилированных (α -Rhap) пираноз.

Сравнение химических сдвигов C-1, C-2 и C-3 α -Rhap и α -Manp в спектрах ^{13}C ЯМР полимеров 1 и 2 со спектрами полимеров из *Rathayibacter*

tanacetii ВКМ Ас-2596 [12] показало одинаковую абсолютную конфигурацию остатков.

Деградация по Смитту нейтральной фракции привела к получению смеси многочисленных низкомолекулярных продуктов и очень небольшому количеству полисахарида с повторяющимся звеном $\rightarrow 2)$ -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)-D-Rhap-(1 \rightarrow) (полимер 2, табл. 1). Внимательное рассмотрение спектров ЯМР исходного суммарного препарата выявило минорные сигналы, которые могли бы принадлежать вышеупомянутому полимеру 2 с 3- и 2,3-замещенными остатками Rhap, но полное отнесение минорных сигналов не представляется возможным на фоне интенсивных сигналов основных полимеров.

В любом случае отсутствие дополнительно-го полимера в продуктах деградации по Смитту позволило предположить статистическое распределение точек разветвления в основном нейтральном полисахариде (полимер 1), и структура его повторяющегося звена должна быть следующей:



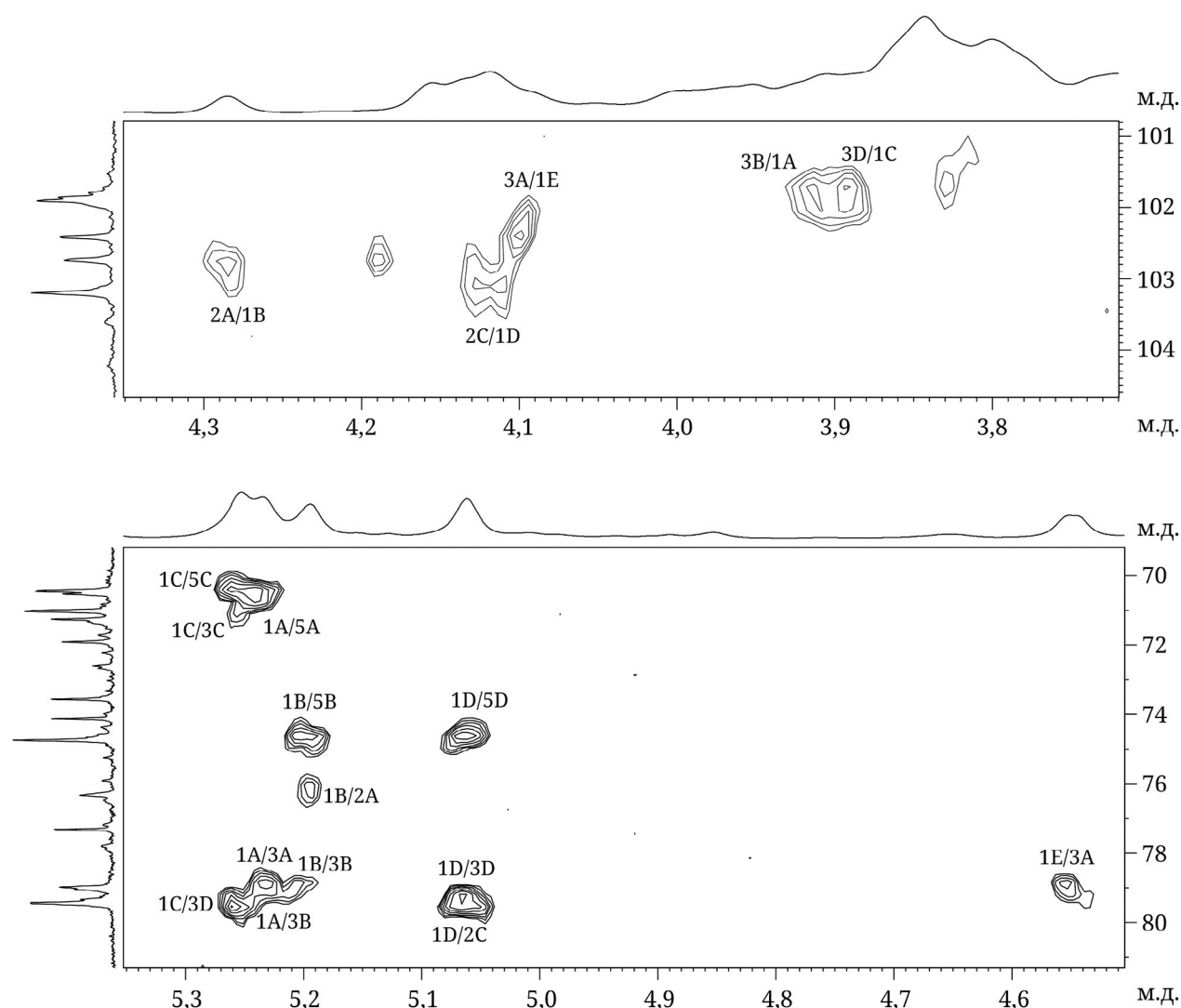


Рис. 4. Части спектра ^1H , ^{13}C НМВС нейтрального полисахарида(ов) из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ас-1390^Т. Заглавные латинские буквы относятся к остаткам, как обозначено в табл. 1. Арабские цифры перед косой чертой относятся к протонам, а после косой черты – к атомам углерода в соответствующих остатках

Кислая фракция (кислый полисахарид).

^{13}C ЯМР-спектр кислой фракции (рис. 1, в) был типичен для регулярного полимера. Его аномерная область содержала 5 сигналов примерно равной интегральной интенсивности (99,6–104,6 м.д.) и небольшой сигнал, принадлежащий непротонированному атому углерода, связанному с двумя атомами кислорода (102,5 м.д.).

Два сигнала наблюдались в области сильного поля при $\delta_{\text{с}}$ 18,3 м.д. и 26,0 м.д., последний был характерен для пирувата в шестичленном кольце. Два сигнала при $\delta_{\text{с}}$ 174,9 м.д. и 175,5 м.д. наблюдались в области резонанса карбоксильных групп.

^1H ЯМР-спектр кислой фракции (рис. 5, верхние проекции) содержал 5 хорошо разрешенных сигналов в аномерной области. Все сигналы имели одинаковую интегральную интенсивность, что указывает на регулярное строение полисахарида. В области сильного поля наблюдались 2 сигнала

при δ_{H} 1,49 м.д. (синглет, 3H) и 1,28 м.д. (дублет, 6 Гц, 3H).

Спектры ^1H и ^{13}C кислой фракции были отнесены с использованием 2D ЯМР-спектров, упомянутых выше. Спектры 2D ^1H , ^1H COSY, TOCSY и ROESY выявили остатки β -Manp (остаток А, табл. 1, полимер 3); β -Rhap (остаток В); β -Glcр (остаток С); α -Glcр (остаток D) и β -GlcрА (остаток Е).

Анализ спектров ^1H , ^{13}C HSQC (рис. 5) выявил смещение атомов углерода C-2 ($\delta_{\text{с}}$ 79,8 м.д.), C-4 ($\delta_{\text{с}}$ 75,6 м.д.) и C-6 ($\delta_{\text{с}}$ 65,5 м.д.) (остаток А); C-4 ($\delta_{\text{с}}$ 82,6 м.д.; остаток В); C-4 ($\delta_{\text{с}}$ 77,8 м.д.; остаток С); C-4 ($\delta_{\text{с}}$ 79,4 м.д.; остаток D) и C-4 ($\delta_{\text{с}}$ 77,8 м.д.; остаток Е) в сторону слабого поля по сравнению с положением атомов в спектрах соответствующих незамещенных остатков.

Сильно сдвинутый в высокое поле сигнал C-5 остатка β -Manp ($\delta_{\text{с}}$ 67,9 м.д.) указывал на расположение остатка пиروвиноградной кислоты в поло-

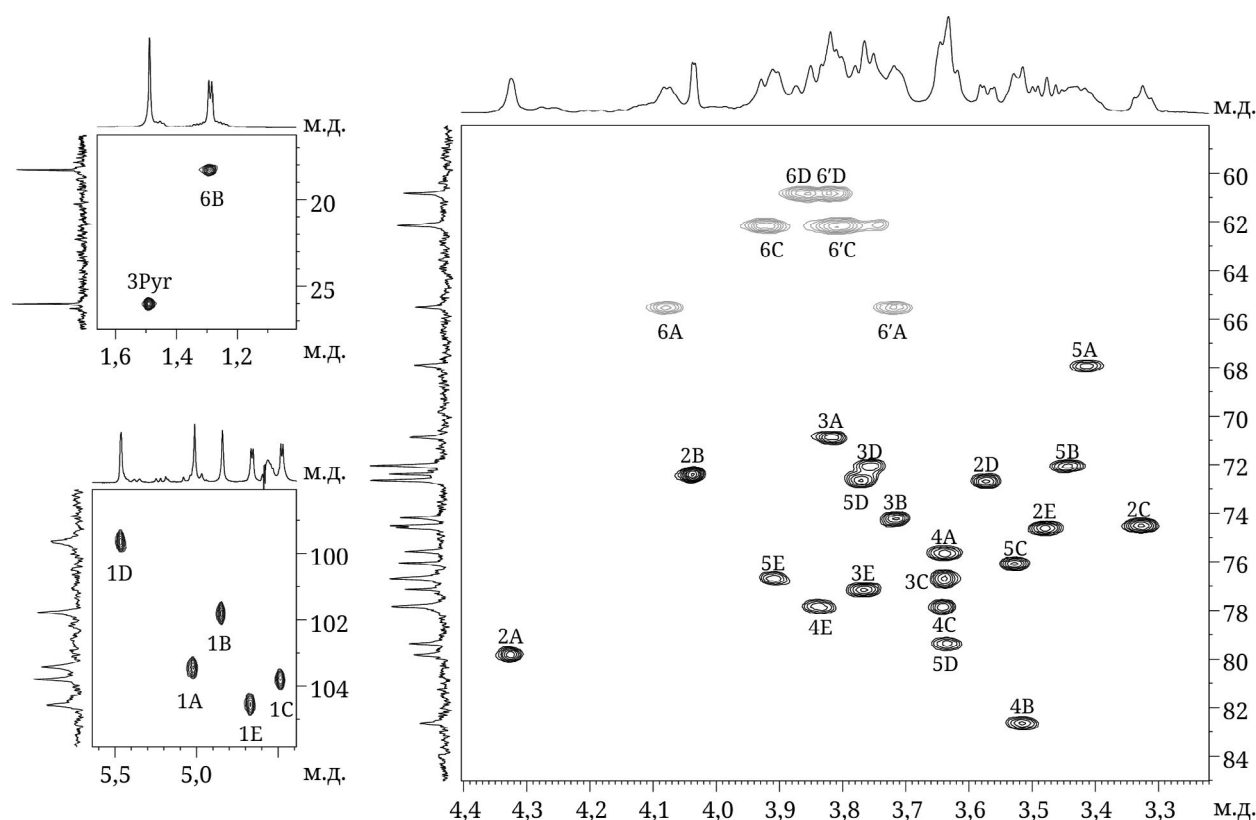


Рис. 5. Части спектра $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC кислого полисахарида из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ас-1390^Г. Части спектров ЯМР ^1H и ^{13}C показаны вдоль горизонтальной и вертикальной осей соответственно. Арабские цифры относятся к атомам углерода в остатках, как обозначено в табл. 1

жении 4,6 остатка А. Химический сдвиг 26,0 м.д. от ^{13}C был типичным для S-абсолютной конфигурации пирувата [13].

Последовательность и расположение остатков пировиноградной кислоты стали ясны после анализа спектра 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY (рис. 6) и подтверждены спектром $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC (рис. 7). Спектр $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY содержал следующие пики $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{H}}$ между остатками: 1A/4B (5,02/3,51); 1B/3,4C (4,85/3,64, 3,64); 1C/4D (4,48/3,64); 1D/3,4,5E (5,47/3,77, 3,84, 3,90) и 1E/2A (4,67/4,33), демонстрируя линейную структуру повторяющейся единицы: $\rightarrow\text{A}\rightarrow\text{B}\rightarrow\text{C}\rightarrow\text{D}\rightarrow\text{E}\rightarrow$.

Последовательность и тип замещения в остатках были подтверждены спектрами $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC, в которых наблюдались корреляционные пики между остатками $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$: 1A/4B (5,02/82,6); 1B/4C (4,85/77,8); 1C/4D (4,48/79,4); 1D/4E (5,47/77,8) и 1E/2A (4,67/79,8).

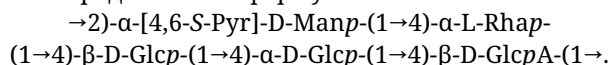
Абсолютные конфигурации остатков сахаров и глюкуроновой кислоты определяли по эффектам гликозилирования в остатках моносахаридов в спектрах ^{13}C ЯМР, согласно закономерностям, изложенным в работе Shashkov et al. [8], и на основании принадлежности глюкозы к D-ряду.

Небольшие положительные β -эффекты гликозилирования (+0,1 м.д.) для C-3 замещения β -GlcA характерны для той же (D) конфигурации

сахаров в дисахаридном фрагменте α -D-GlcA-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcA.

Относительно большие (+7,5 м.д.) α -эффекты гликозилирования для замещения C-1 β -GlcA во фрагменте β -GlcA-(1 \rightarrow 2)- β -Manp также характерны для той же (D) конфигурации сахаров. L-Абсолютная конфигурация β -Rhap (остаток В) во фрагменте β -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcA подтверждается отсутствием отрицательного эффекта γ -гликозилирования для C-6 остатка β -D-GlcA (остаток С). Для ситуации с β -D-(1 \rightarrow 4)-D эффект γ -гликозилирования для C-6 D-GlcA имел бы небольшую отрицательную величину (около -1 м.д.), как это видно для фрагмента β -D-GlcA-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcA, где эффект γ -гликозилирования для гликозилированного остатка D-GlcA составлял -1,1 м.д.

В конечном итоге структура повторяющегося звена кислого полисахарида (полимер 3) может быть представлена формулой:



ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ас-1390^Г были выделены три гликополимера,

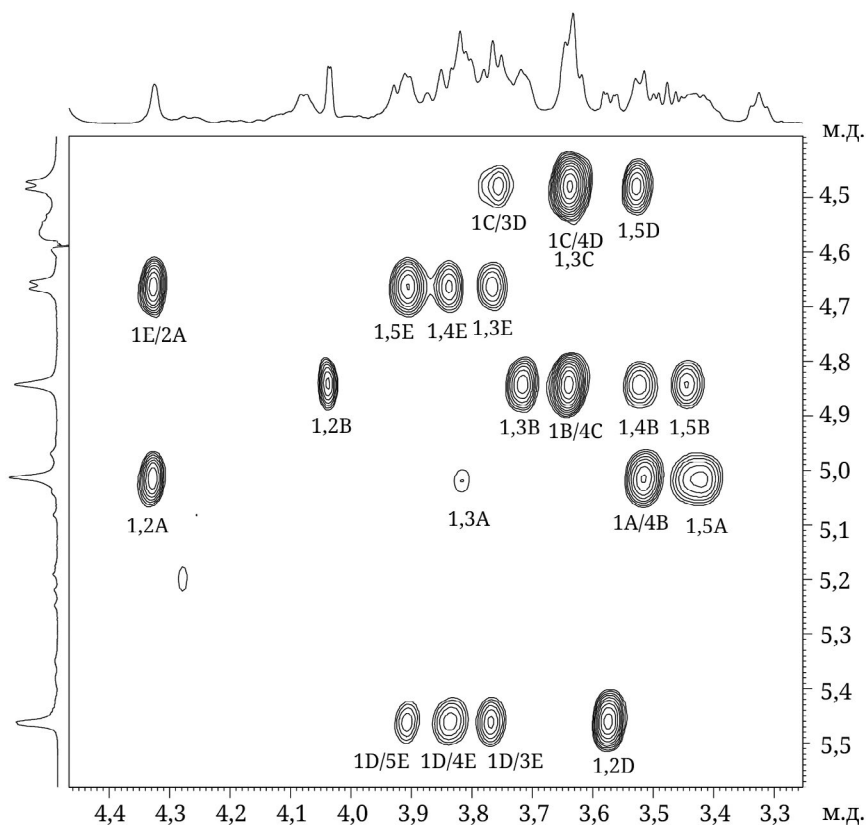


Рис. 6. Часть спектра $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY кислого полисахарида из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ас-1390^Г. Арабские цифры относятся к протонам в остатках, как обозначено в табл. 1. Косая черта относится к пикам корреляции между остатками

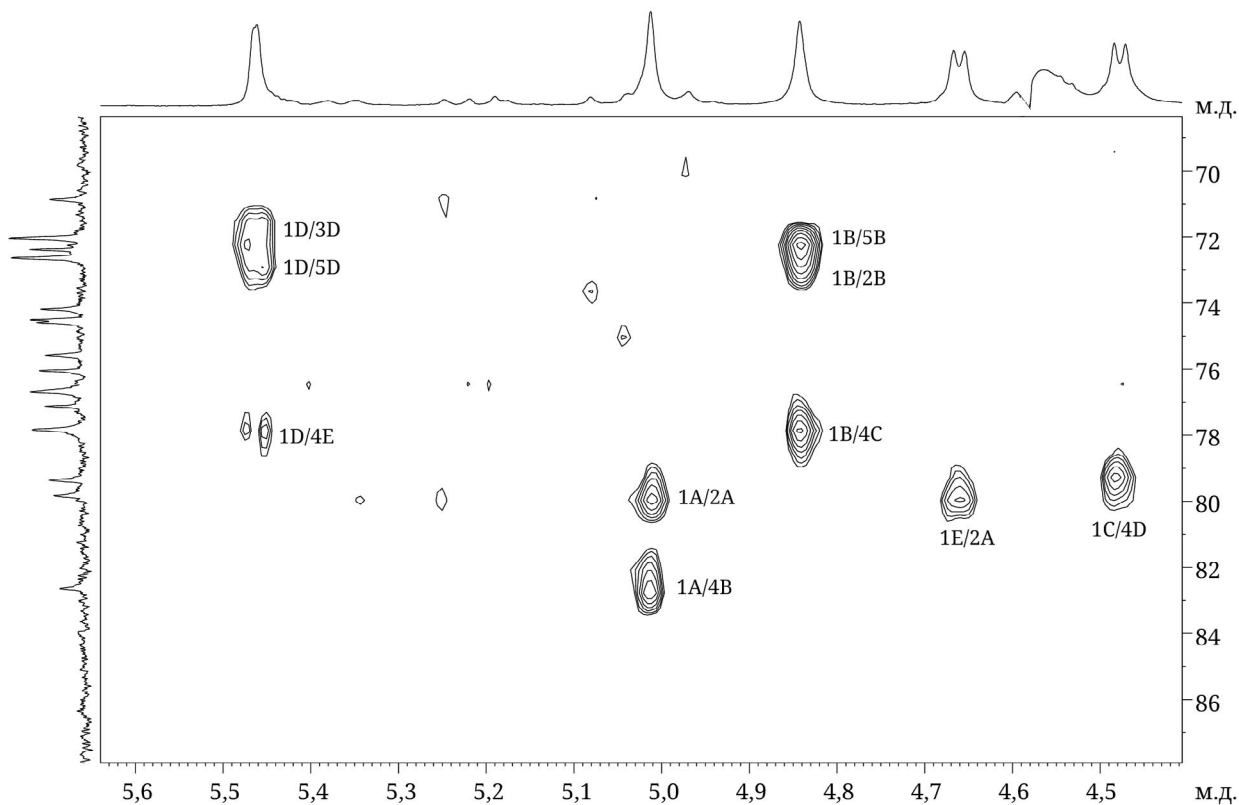


Рис. 7. Часть спектра $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBSC кислого полисахарида из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ас-1390^Г. Заглавные латинские буквы относятся к остаткам, как обозначено в табл. 1. Арабские цифры перед косой чертой относятся к протонам, а после косой черты – к атомам углерода в соответствующих остатках

структуры которых установлены с использованием химических и ЯМР-спектроскопических методов. Первый полимер – разветвленный рамноманнан с повторяющейся единицей: $\rightarrow 2)$ - α - $[\beta$ -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)]-D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-(1 \rightarrow). Установленная структура рамноманнана описана для прокариот впервые. При этом остатки ксилопиранозы ранее находили в полимерах других видов *Rathayibacter* – рамноманнана *Rathayibacter tritici* ВКМ Ас-1603^Т и рамнане *Rathayibacter oskolensis* ВКМ Ас-2121^Т [14, 15].

Рамнан, второй нейтральный полимер, обнаружен у исследованного штамма в минорном количестве, что затрудняло его полную идентификацию. Однако выявленные минорные сигналы в спектрах ¹³С ЯМР (на фоне интенсивных сигналов основных полимеров), а также результаты деградации по Смиту указывали на наличие в основной цепи рамнана бокового замещения по О-3, идентифицировать которое не представилось возможным.

Кроме того, в отличие от исследованных ранее представителей рамнан-содержащих штаммов (*Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759 и *R. oskolensis* ВКМ Ас-2121^Т), изученный штамм ВКМ Ас-1390^Т имел одновременно с рамнаном и другой нейтральный полимер, рамноманнан [4].

Рамноза в обоих нейтральных полимерах изученного нами штамма *R. festucae*, как и у ранее изученных представителей рода *Rathayibacter*, имела D-конфигурацию [4].

Третий гликополимер представлял собой тейхуроновую кислоту новой структуры. Она содержала 5 моносахаридных остатков в повторяющемся звене и остаток S-пировиноградной кислоты в положениях 4,6 остатка α -D-Manp. Ранее S-пировиноградная кислота была обнару-

жена в кислых гликополимерах клеточной стенки представителей трех других видов *Rathayibacter* [7, 15, 16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования расширяют представления о структурном разнообразии микробных гликополимеров и согласуются с данными о специфичности структур и состава гликополимеров для видов рода *Rathayibacter*, описанных ранее.

Вклад авторов. А.С. Шашков – расшифровка спектров ЯМР-спектроскопии; Н.В. Потехина, Е.М. Тульская – выделение клеточной стенки и гликополимеров, их первичный химический анализ, написание текста статьи; А.С. Дмитренко – съемка ЯМР-спектров; С.Н. Сенченкова – химический анализ препаратов (ДЕАЕ-хроматография, пробоподготовка образцов к ЯМР-анализу); Л.В. Дорофеева – выращивание культуры *R. festucae*, получение биомассы; Л.И. Евтушенко – общее руководство, обсуждение результатов, редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках программы исследований 121032300094-7, запланированных в МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра микробиологии, 2021–2027 гг.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith, E. F. (1913) A new type of bacterial disease, *Science*, **38**, 926, <https://doi.org/10.1126/science.38.991.926.a>.
2. Zgurskaya, H. I., Evtushenko, L. I., Akimov, V. N., and Kalakoutsii, L. V. (1993) *Rathayibacter* gen. nov., including the species *Rathayibacter rathayi* comb. nov., *Rathayibacter tritici* comb. nov., *Rathayibacter iranicus* comb. nov., and six strains from annual grasses, *Int. J. Sys. Bacteriol.*, **43**, 143-149, <https://doi.org/10.1099/00207713-43-1-143>
3. Evtushenko, L. I., and Dorofeeva, L. V. (2012) Genus XXII. *Rathayibacter* Zgurskaya, Evtushenko, Akimov and Kalakoutsii 1993, 147^{VP} in *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Suzuki, K.-I., Ludwig, W., and Whitman, W. B., eds) 2nd Edn., Vol. 5, Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp. 953-964.
4. Potekhina, N. V., Tul'skaya, E. M., Ospennikov, and Y. V. Evtushenko, L. I. (2023) Cell wall glycopolymers as chemotaxonomic characteristics of the genus and species *Rathayibacter*, *Microbiology*, **92** (Suppl 1), S2-S6, <https://doi.org/10.1134/S0026261723603822>.
5. Dorofeeva, L. V., Evtushenko, L. I., Krausova, V. I., Karpov, A. V., Subbotin, S. A., and Tiedje, J. M. (2002) *Rathayibacter caricis* sp. nov. and *Rathayibacter festucae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of *Carex* sp. and the leaf gall induced by the nematode *Anguina graminis* on *Festuca rubra* L., respectively, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 1917-1923, <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-1917>.

6. Dmitrenok, A. S., Shashkov, A. S., Streshinskaya, G. M., Tul'skaya, E. M., Potekhina, N. V., Senchenkova, S. N., Dorofeeva, L. V., and Evtushenko, L. I. (2019) New rhamnose-containing glycopolymers from *Rathayibacter iranica* VKM Ac-1602^T cell wall, *Carbohydr. Res.*, **482**, 107728, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2019.06.007>.
7. Шашков А. С., Тульская Е. М., Потехина Н. В., Дмитренко А. С., Сенченкова С. Н., Зайчиков В. А., Дорофеева Л. В., Евтушенко Л. И. (2021) Рамнан и пируватсодержащая тейхуроновая кислота клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ac-2759, *Биохимия*, **86**, 595-606, <http://dx.doi.org/10.31857/S0320972521040114>.
8. Shashkov, A. S., Lipkind, G. M., Knirel, Y. A., and Kochetkov, N. K. (1988) Stereometrical factors determining the effects of glycosylation on the ¹³C chemical shifts in carbohydrates, *Magn. Reson. Chem.*, **26**, 735-747, <https://doi.org/10.1002/mrc.1260260904>.
9. Jansson, P.-E., Kenne, L., and Widmalm, G. (1989) Computer-assisted structural analysis of polysaccharides with an extended version of CASPER using ¹H- and ¹³C-n.m.r. data, *Carbohydr. Res.*, **188**, 169-191, [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(89\)84069-8](https://doi.org/10.1016/0008-6215(89)84069-8).
10. Altona, C., and Haasnoot, C. A. G. (1980) Prediction of anti and gauche vicinal proton-proton coupling constants in carbohydrates: a simple additivity rule for pyranose rings, *Org. Magn. Reson.*, **13**, 417-429, <https://doi.org/10.1002/mrc.1270130606>.
11. Bock, K., and Pedersen C. (1983) Carbon 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **41**, 27-66, [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60055-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60055-4).
12. Шашков А. С., Тульская Е. М., Дмитренко А. С., Стрешинская Г. М., Потехина Н. В., Сенченкова С. Н., Пискункова Н. Ф., Дорофеева Л. В., Евтушенко Л. И. (2018) Рамнозосодержащие гликополимеры клеточных стенок *Rathayibacter toxicus* ВКМ Ac-1600 и «*Rathayibacter tanacetii*» ВКМ Ac-2596, *Биохимия*, **83**, 915-925, <https://doi.org/10.1134/S0006297918060093>.
13. Garegg, P. J., Jansson, P.-E., Lindberg, B., Lindh, F., and Lönngren, J. (1980) Configuration of the acetal carbon atom of pyruvic acid acetals in some bacterial polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, **79**, 127-132, [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)83666-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83666-6).
14. Shashkov, A. S., Tul'skaya, E. M., Streshinskaya, G. M., Dmitrenok, A. S., Potekhina, N. V., Senchenkova, S. N., Piskunkova, N. F., Dorofeeva, L. V., and Evtushenko, L. I. (2020) Rhamnomannans and teichuronic acid from the cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603^T, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 369-377, <https://doi.org/10.1134/S0006297920030128>.
15. Shashkov, A. S., Potekhina, N. V., Tul'skaya, E. M., Dmitrenok, A. S., Senchenkova, S. N., Torgov, V. I., Dorofeeva, L. V., and Evtushenko, L. I. (2024) New lactate- and pyruvate-containing polysaccharide and rhamnomannan with xylose residues from the cell wall of *Rathayibacter oskolensis* VKM Ac-2121^T, *Carbohydr. Res.*, **540**, 109145, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2024.109145>.
16. Shashkov, A. S., Potekhina, N. V., Dmitrenok, A. S., Tul'skaya, E. M., Senchenkova, S. N., Dorofeeva, L. V., Zaychikov, V. A. and Evtushenko, L. I. (2021) D-Rhamnan and teichuronic acid from the cell wall of *Rathayibacter caricis* VKM Ac-1799^T, *Carbohydr. Res.*, **499**, 108233, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2021>.

NOVEL RHAMNOSE-CONTAINING GLYCOPOLYMERS FROM THE CELL WALL OF *Rathayibacter festucae* VKM Ac-1390^T

**A. S. Shashkov¹, N. V. Potekhina^{2*}, E. M. Tul'skaya², A. S. Dmitrenok¹,
S. N. Senchenkova¹, L. V. Dorofeeva³, and L. I. Evtushenko³**

¹ Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: potekhina56@mail.ru

³ All-Russian Collection of Microorganisms (VKM),
G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

Rathayibacter festucae VKM Ac-1390^T (family Microbacteriaceae, class Actinomycetes) contains three glycopolymers in the cell wall. The structures of glycopolymers established by chemical and NMR spectroscopy methods. One of them, rhamnomannan, built from repeating tetrasaccharide units carrying side xylopyranose residues, $\rightarrow 2)$ - α -[β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)]-D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-(1 \rightarrow). The second polymer, found in minor amounts in the strain studied, is rhamnan,

→2)-α-D-Rhap-(1→3)-α-D-Rhap-(1→. The third polymer is teichuronic acid, acetalated with pyruvic acid, →2)-α-[4,6-S-Pyr]-D-Manp-(1→4)-α-L-Rhap-(1→4)-β-D-Glcp-(1→4)-α-D-Glcp-(1→4)-β-D-GlcpA-(1→. The structures of rhamnomannan and teichuronic acid are new for *Rathayibacter* and prokaryotes in a whole. The results of the present study expand our understanding of the structural diversity of microbial glycopolymers and are consistent with the data on the specificity of the structures and composition of glycopolymers for species of the genus *Rathayibacter* described previously.

Keywords: *Rathayibacter*, cell wall glycopolymers, polysaccharide, rhamnomannan, D-rhamnan, teichuronic acid, pyruvate

КОМБИНАЦИЯ ИНГИБИТОРОВ IX ИЗОФОРМЫ КАРБОАНГИДРАЗЫ И ГЕФИТИНИБА УГНЕТАЕТ ИНВАЗИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

© 2024 А.С. Бунев¹, А.А. Шетнев², О.С. Шемчук³, П.К. Кожухов³, Т.В. Шаронова⁴,
И.И. Тюряева^{4,5}, М.Г. Хотин⁵, С.В. Агеев^{3,4}, Д.К. Холмуродова⁶, Ж.А. Ризаев⁶,
К.Н. Семенов^{3,4,6}, В.В. Шаройко^{1,3,4,6*}

¹ Тольяттинский государственный университет, Центр медицинской химии,
445020 Тольятти, Россия; электронная почта: sharoyko@gmail.com

² Институт биофизики будущего, 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, 197022 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург, Россия

⁵ Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Россия

⁶ Научно-практический центр иммунологии, аллергологии и геномики человека,
Самаркандский государственный медицинский университет, 100400 Самарканд, Узбекистан

Поступила в редакцию 10.06.2024

После доработки 24.10.2024

Принята к публикации 05.11.2024

IX изоформа карбоангидразы человека (КАЧ IX) играет ключевую роль в поддержании pH-гомеостаза злокачественных новообразований, формируя благоприятное микроокружение для роста, инвазии и метастазирования опухолевых клеток. Исследования последних лет установили, что ингибирование активности КАЧ IX, экспрессирующей на поверхности опухолевых клеток, значительно повышает эффективность классических химиотерапевтических агентов и позволяет подавлять резистентность опухолевых клеток к химиотерапии, а также повышать их чувствительность к применяемым препаратам (в т.ч. понижать необходимую дозу цитостатиков). В данной работе изучалась способность новых ингибиторов КАЧ IX на основе замещенных 1,2,4-оксадиазолсодержащих первичных ароматических сульфаниламидов в условиях гипоксии потенцировать цитостатический эффект gefitinib (селективный ингибитор тирозинкиназного домена рецептора эпидермального фактора роста). Изучен комбинированный цитотоксический эффект gefitinib и ингибиторов КАЧ IX – 4-(3-фенил-1,2,4-оксадиазол-5-ил)тиофен-2-сульфонамида (1), 4-(5-(тиофен-3-ил)-1,2,4-оксадиазол-3-ил)бензолсульфонамида (2), 4-(3-(пиридин-2-ил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)тиофен-2-сульфонамида (3) и 4-(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)бензолсульфонамида (4), а также их влияние на пролиферацию, активацию каспаз 3/7 и клеточный цикл на примере клеточной линии аденокарциномы легкого человека A549 в условиях физиологической гипоксии. Установлено, что сочетание ингибиторов 1 и 2 и gefitinib угнетает инвазивный потенциал клеток A549, при этом ингибитор 1 обладает наибольшим эффектом и может рассматриваться как перспективный кандидат для дальнейших исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: комбинированная терапия, микроокружение опухоли, ингибиторы карбоангидразы человека, клеточная линия аденокарциномы легкого человека A549, онкологические заболевания, гипоксия, сульфаниламиды, 1,2,4-оксадиазолы, gefitinib.

DOI: 10.31857/S0320972524120065 EDN: IFJGQW

ВВЕДЕНИЕ

Рак легких по-прежнему остается одной из основных причин смертности от онкологических

заболеваний во всем мире; при этом большинство пациентов имеют запущенную форму заболевания и неблагоприятный долгосрочный прогноз [1]. Немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) составляет примерно 85% случаев рака легких [1]. Gefitinib – селективный ингибитор тирозинкиназ-

* Адресат для корреспонденции.

ного домена рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), вызывает снижение пролиферации и усиление апоптоза клеток, а также повышает противоопухолевую активность химиотерапевтических препаратов и лучевой терапии. Гефитиниб показал эффективность при лечении пациентов с немелкоклеточной аденокарциномой легкого с мутациями в гене *EGFR* в экзоне 21 (L858R) и делециями в экзоне 19 [2]. Однако в большинстве случаев успех терапии гефитинибом носит временный характер. Опухолевые клетки приобретают резистентность к гефитинибу, и после года терапии заболевание может прогрессировать [3]. Применение гефитиниба как адъювантного агента в комбинированной химиотерапии продлевает выживаемость пациентов с НМЛР без прогрессирования заболевания [4]. Было также установлено, что резистентности клеток аденокарциномы легкого к химиопрепаратам способствует фермент карбоангидраза IX изоформа (КАЧ IX), трансмембранный металлофермент, содержащий в активном центре ион цинка. КАЧ IX нейтрализует ацидоз в опухолевых клетках [5]. Повышенная экспрессия КАЧ IX является маркером неблагоприятного прогноза для пациентов с НМРЛ [6]; фермент синтезируется в условиях гипоксии под контролем транскрипционного фактора-1 α , индуцируемого гипоксией (HIF1 α) [5].

Каталитическая активность КАЧ IX в значительной степени обеспечивает адаптацию опухолевых клеток к неблагоприятным условиям дефицита кислорода и энергосубстратов. В частности, каталитическая функция внеклеточного домена фермента играет ключевую роль в работе ряда транспортных белков и позволяет избежать внутриклеточного ацидоза (поддерживается слабощелочной внутриклеточный pH) [7]. В то же время ацидификация внеклеточной среды (в среднем в микроокружении гипоксической опухоли pH составляет 6,5–6,8) [8] нарушает клеточную адгезию в здоровых тканях, облегчая пролиферацию и инвазию опухолевых клеток, а также их метастазирование [9]. Более того, КАЧ IX-зависимый межклеточный ацидоз [8] может способствовать нарушению межклеточных адгезионных контактов за счет подавления экспрессии белка адгезии Е-кадгерина, а также трансформации злокачественных клеток в менее дифференцированное состояние [10]. При этом опухолевые клетки приобретают так называемый фенотип «стволовости» (увеличение доли опухолевых стволовых клеток в опухоли), что делает опухолевый фенотип более агрессивным и устойчивым ко многим

химиотерапевтическим препаратам [11]. Последние данные указывают на то, что роль КАЧ IX в гипоксических опухолях выходит далеко за рамки регуляции pH-гомеостаза.

Комбинированная терапия онкологических заболеваний основывается на феноменах синергетического действия различных химиотерапевтических препаратов [12]. При комбинировании препаратов с различным механизмом действия можно создать условия для их применения в оптимальной дозе, что снижает побочные эффекты и повышает в целом переносимость химиотерапии [13]. Примечательно, что препараты, механизм действия которых различается, способны совместно эффективно подавлять рост опухолей, что, помимо прочего, позволяет уменьшить вероятность развития резистентности опухолевых клеток к химиотерапии. Более того, в случае уже сформировавшейся резистентности использование адъювантных агентов в комбинации с классическими химиотерапевтическими препаратами в ряде случаев позволяет преодолеть лекарственную устойчивость агрессивных фенотипов [14]. Таким образом, разработка эффективных ингибиторов КАЧ IX для их комбинированного использования в сочетании с клинически одобренными противоопухолевыми препаратами может оказаться успешной стратегией преодоления резистентности опухолей к химиотерапии. В ряде научных работ было показано, что существует взаимосвязь между транскрипцией генов *HIF1A* и *CAIX* (кодирует трансмембранный белок семейства карбоангидраз, который участвует в регуляции клеточного pH) и экспрессией *EGFR* в гипоксических клетках, в том числе НМРЛ [15, 16], и установлено, что активация сигнального каскада через EGFR усиливает клеточный ответ на гипоксию и действует как фактор выживания опухолевых клеток [17]. Ингибирование транскрипции генов, регулируемых гипоксией, может быть одной из стратегий лечения химиорезистентных опухолей с использованием ингибиторов тирозинкиназного домена EGFR. Совокупность вышеуказанных экспериментальных фактов определила выбор комбинации новых ингибиторов КАЧ IX и ингибитора тирозинкиназного домена EGFR – гефитиниба – для проведения исследований, результаты которых представлены в статье. Таким образом, на данном этапе исследования была поставлена задача изучить эффективность совместного действия четырех новых ингибиторов КАЧ IX с цитостатическим препаратом гефитинибом на клеточную линию аденокарциномы

Принятые сокращения: КИ – клеточный индекс; НМРЛ – немелкоклеточный рак легких; CI – комбинационный индекс; DAPI – дигидрохлорид 4',6-диамидино-2-фенилиндол; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; HIF1 α – транскрипционный фактор-1 α , индуцируемый гипоксией.

легкого человека A549 в условиях физиологической гипоксии. Клетки линии A549 известны устойчивостью к gefitinibu ($IC_{50} = 21$ мкМ в условиях нормоксии) [18] и не имеют мутаций в гене *EGFR* (wild-type *EGFR*) [19]. Изучен комбинированный цитотоксический эффект gefitiniba и ингибиторов КАЧ IX на цитотоксичность, а также их влияние на пролиферацию, активацию каспаз 3/7 и клеточный цикл на примере клеточной линии аденокарциномы легкого человека A549 в условиях физиологической гипоксии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. В исследовании использовались следующие соединения: диметилсульфоксид (ДМСО; «Панэко», Россия), gefitinib («Sigma-Aldrich», США), $CoCl_2$ («Sigma-Aldrich») и ингибиторы КАЧ IX: 4-(3-фенил-1,2,4-оксадиазол-5-ил)тиофен-2-сульфонамид (1), 4-(5-(тиофен-3-ил)-1,2,4-оксадиазол-3-ил)бензолсульфонамид (2), 4-(3-(пиридин-2-ил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)тиофен-2-сульфонамид (3) и 4-(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)бензолсульфонамид (4). Ингибиторы синтезированы согласно методике, опубликованной в работе Krasavin et al. [20]. Характеризация синтезированных соединений проводилась методами 1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии (Bruker AVANCE DPX 400; «Bruker», США) и масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (Bruker microTOF; «Bruker»), а также включала измерение температуры плавления (Electrothermal IA 9300; «Electrothermal», Великобритания).

Характеризация соединений 1–4. 4-(3-фенил-1,2,4-оксадиазол-5-ил)тиофен-2-сульфонамид (1). Выход – 181 мг (59%). Бежевое твердое вещество, $t_{пл}$ 295–297 °C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,59 (s, 1H); 8,18 (d, J $\frac{1}{4}$ 6,9 Hz, 2H); 8,02 (s, 1H); 7,88 (s, 2H); 7,75 (t, J $\frac{1}{4}$ 7,1 Hz, 1H); 7,67 (t, J $\frac{1}{4}$ 7,5 Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 176,0 (C); 164,6 (C); 148,5 (C); 134,0 (CH); 133,2 (CH); 130,1 (CH); 128,4 (CH); 128,2 (CH); 127,4 (C); 123,6 (C). HRMS (ESI, m/z): рассчитано для $C_{12}H_9N_3O_3S_2$ $[M + H]^+$ – 308,0158; найдено – 308,0155.

4-(5-(тиофен-3-ил)-1,2,4-оксадиазол-3-ил)бензолсульфонамид (2). Выход – 157 мг (51%). Бежевое твердое вещество, $t_{пл}$ 279–281 °C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,70 (s, 1H); 8,26 (d, J $\frac{1}{4}$ 8,4 Hz, 2H); 8,04 (t, J $\frac{1}{4}$ 6,7 Hz, 2H); 7,89 (dd, J $\frac{1}{4}$ 5,0, 2,9 Hz, 1H); 7,77 (d, J $\frac{1}{4}$ 5,1 Hz, 1H); 7,55 (s, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 172,6 (C); 167,7 (C); 147,1 (C); 132,8 (CH); 129,9 (CH); 129,5 (C); 128,2 (CH); 127,1 (CH); 126,8 (CH); 125,0 (C). HRMS (ESI, m/z): рассчитано для $C_{12}H_9N_3O_3S_2$ $[M + Na]^+$ – 329,9978; найдено – 329,9987.

4-(3-(пиридин-2-ил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)тиофен-2-сульфонамид (3). Выход – 222 мг (72%). Бежевое твердое вещество, $t_{пл}$ 239–241 °C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,87 (s, 1H); 8,79 (d, J $\frac{1}{4}$ 4,5 Hz, 1H); 8,15 (d, J $\frac{1}{4}$ 7,7 Hz, 1H); 8,10 (s, 1H); 8,06 (t, J $\frac{1}{4}$ 7,6 Hz, 1H); 7,97 (s, 2H); 7,64 (t, J $\frac{1}{4}$ 5,0 Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 171,5 (C); 168,7 (C); 150,8 (CH); 149,0 (C); 145,9 (C); 138,2 (CH); 136,1 (CH); 128,5 (CH); 126,7 (CH); 124,6 (C); 123,9 (CH). HRMS (ESI, m/z): рассчитано для $C_{11}H_8N_4O_3S_2$ $[M + Na]^+$ – 330,9930; найдено – 330,9941.

4-(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)бензолсульфонамид (4). Выход – 206 мг (86%). Белое твердое вещество, $t_{пл}$ 214–215 °C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,18 (d, J $\frac{1}{4}$ 8,5 Hz, 2H); 8,00 (d, J $\frac{1}{4}$ 8,5 Hz, 2H); 7,53 (s, 2H); 2,68 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 178,4 (C); 167,2 (C); 146,9 (C); 129,7 (C); 128,0 (CH); 127,1 (CH); 12,5 (CH $_3$). HRMS (ESI, m/z): рассчитано для $C_9H_9N_3O_3S$ $[M + H]^+$ – 240,0437; найдено – 240,0433.

Культивирование клеточной линии аденокарциномы легкого человека A549. Клетки аденокарциномы легкого человека A549 (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Институт цитологии РАН) культивировали в среде (далее «полная» среда) DMEM («Gibco», США) с добавлением 10% инактивированной бычьей эмбриональной сыворотки (FBS; «Gibco») без применения антибиотиков. Пересев клеток проводили с использованием раствора, содержащего 0,25% трипсина, и раствора Версена (0,02% ЭДТА) в соотношении 1/3 («Биолот», Россия). В эксперименте по клеточной миграции клетки линии A549 подвергались химически-индуцированной гипоксии с использованием известного миметика гипоксии $CoCl_2$ ($C = 100$ мкМ) [21–23]. Остальные эксперименты проводили в условиях физиологической гипоксии при 1%-ном содержании кислорода в газовой смеси. В качестве контроля использовали клетки, к которым добавляли ДМСО (финальное разведение – 1 : 1000), т.к. исследуемые соединения 1–4 были растворены в ДМСО.

Цитотоксичность. Изучение цитотоксичности соединений 1–4 и gefitiniba проводилось с использованием реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) на клетках линии A549. Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при +37 °C в увлажненной атмосфере, содержащей воздух и 5% CO_2 , в полной питательной среде. В результате взаимодействия МТТ с NAD(F)H-зависимыми клеточными оксидоредуктазами образуется окрашенный продукт – формазан с максимумом поглощения при длине волны 540 нм, содержание которого пропорционально количеству жизнеспособных клеток. Для проведения эксперимента клетки открепляли от культуральных флаконов, проводили подсчет

числа клеток на анализаторе жизнеспособности клеток Luna-II («Logos Biosystems», Южная Корея), затем клетки переносили в 96-луночный планшет («Thermo Scientific», США) и инкубировали в течение ночи в CO₂-инкубаторе: за это время происходило прикрепление клеток к поверхности лунок (в каждую лунку вносили 5000 клеток в 200 мкл полной среды). Клетки инкубировали в течение 24 ч в условиях физиологической гипоксии, после чего в лунки добавляли растворы, содержащие соединения 1–4 и/или гефитиниб. Клетки инкубировали в планшетах в течение 48 ч в CO₂-инкубаторе при +37 °С. По окончании инкубационного периода культуральную среду удаляли путем инвертирования планшета. Далее, в лунки вносили 100 мкл полной среды DMEM-F12 и 20 мкл МТТ-реактанта, и планшеты с клетками инкубировали в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе при +37 °С. После удаления надосадочной жидкости кристаллы формазана растворяли в течение 15 мин при перемешивании в ДМСО (200 мкл на лунку). Поглощение измеряли на планшетном ридере Allsheng AMR-100 («Allsheng», Китай). Величину IC₅₀ рассчитывали с использованием пакета программ Graphpad Prism («GraphPad Software Inc.», США), $n = 6$.

Клеточная миграция. Скорость клеточной миграции изучалась в режиме реального времени с использованием системы клеточного анализа xCELLigence RTCA DP («ACEA Biosciences», США). В лунки нижней камеры CIM-планшета (CIM-Plate 16; «ACEA Biosciences») вносили по 160 мкл среды DMEM, содержащей 10% FBS и 100 мкМ CoCl₂. Клетки линии A549, предварительно инкубированные в течение 24 ч с 100 мкМ CoCl₂, переносили в лунки верхней камеры CIM-планшета (3·10⁴ клеток на лунку) в среде DMEM без сыворотки с 100 мкМ CoCl₂ и добавляли тестируемые соединения – гефитиниб до конечной концентрации 10 мкМ и/или ингибиторы КАЧ IX до конечной концентрации 25 или 50 мкМ. Значение импеданса каждой лунки автоматически регистрировалось системой xCELLigence каждые 15 мин в течение 48 ч и выражалось в виде единиц клеточного индекса (КИ), отражающего изменение числа клеток на микроэлектронных сенсорах, расположенных с обратной стороны пористого дна лунок верхней камеры. Миграция клеток происходит в пределах 20–24 ч. Однако изучался эффект тестируемых соединений за период 48 ч, что дает дополнительную информацию об ингибирующей способности соединений 1 и 2. Все образцы анализировали в 3–4 повторах. Анализ полученных данных проводили с использованием программного обеспечения RTCA 2.0.0.1301 («ACEA Biosciences»). Анализ кривых проводили с использованием коэффициента наклона кривых (α) и t -критерия Стьюдента.

Подготовка клеток для проточной цитометрии. Для проведения анализа методом проточной цитометрии клетки линии A549 высевали в чашки Петри диаметром 40 мм («ТТР», Швейцария) в количестве 5·10⁴ клеток в 2 мл полной среды и предварительно инкубировали в течение 24 ч в гипоксическом инкубаторе (содержание O₂ – 1%). Спустя 24 ч среду в чашках меняли на среду с добавлением исследуемых ингибиторов ($C = 25$ мкМ или 50 мкМ) и гефитиниба ($C = 10$ мкМ). Через 24 и 48 ч клетки анализировали с использованием проточного цитометра CytoFLEX S («Beckman Coulter», США). Полученные данные обрабатывались с использованием пакета программ CytExpert («Beckman Coulter»). Перед анализом полностью собранные трипсинизацией с поверхности чашек клетки в одинаковом объеме переносили в пробирки, содержащие кондиционную среду, перемешивали и отбирали по 0,1 мл для определения жизнеспособности и концентрации клеток. Затем к суспензии клеток добавляли дигидрохлорид 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI; $C = 2$ мкг/мл; «Sigma-Aldrich»), и суспензию клеток перемешивали в течение 30 сек, после чего анализировали на проточном цитометре. Проводился анализ не менее 2000 событий в координатах FSC-A log/SSC-A log.

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла. Анализ клеточного цикла является одним из методов изучения пролиферации клеток. Этим методом исследуются фазы клеточного цикла – распределение клеток по G₁/G₀-, S- и G₂/M-фазам клеточного цикла путем определения относительного содержания ДНК в клетках с использованием ДНК-связывающего флуоресцентного красителя DAPI. Клетки линии A549 трипсинизировали, осаждали и разводили полной средой до концентрации 1·10⁶ клеток/мл. К полученной суспензии клеток добавлялась смесь DAPI ($C = 100$ мкг/мл) и Triton X-100 ($C = 1\%$) в соотношении 1/5 («Sigma-Aldrich»). Окрашивание и пермеабиллизацию клеток проводили в течение 1 мин при комнатной температуре при медленном перемешивании. Для анализа использовалось не менее 10 000 окрашенных клеток. Данные обрабатывались с использованием пакета программ ModFit LT («Verity Software House», США).

Определение активности каспаз 3/7. Активность каспаз, выявляемая при каспаза-зависимом апоптозе, определялась с использованием набора реактивов для проточной цитометрии CellEvent™ Caspase-3/7 Green («Invitrogen», США) в соответствии с протоколом производителя. В состав набора входит флуорогенный субстрат для активированных каспаз 3 и 7, который состоит из пептида DEVD, конъюгированного с красителем, связывающим ДНК. При проникновении в клетки суб-

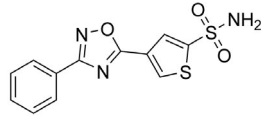
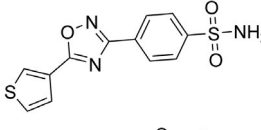
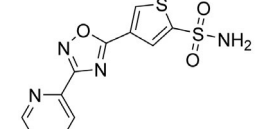
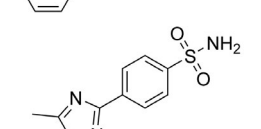
страт не флуоресцирует, поскольку пептид DEVD ингибирует взаимодействие красителя с ДНК. При индукции апоптоза каспазы активируются и расщепляют пептид DEVD, что позволяет красителю связываться с ДНК и флуоресцировать. После трипсинизации определяли концентрацию клеток, которые затем разводили полной средой до концентрации $5 \cdot 10^5$ клеток/мл. После этого к 0,2 мл суспензии клеток линии A549 добавляли 0,2 мкл реагента CellEvent™ ($C = 500$ нМ). Клетки инкубировали в течение 30 мин при 37 °C в CO₂-инкубаторе. За 5 мин до окончания инкубации добавлялся раствор DAPI ($C = 2$ мкг/мл) для детектирования доли погибших или поздних апоптотических клеток. По окончании инкубации пробы анализировались на проточном цитометре. Флуоресценция возбуждалась лазерами 488 нм для регистрации сигнала каспаз 3/7 в канале FITC и 375 нм – для регистрации сигнала DAPI.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием кинетического метода остановленного потока в нашем предыдущем исследовании измерение констант ингибирования рекомбинантной КАЧ IX для соединений на основе замещенных 1,2,4-оксадиазолсодержащих первичных ароматических сульфаниламидов выявило серию ингибиторов-лидеров КАЧ IX – соединения 1–4 со значениями констант ингибирования (K_i), лежащими в наномолярном и субнаномолярном концентрационном диапазоне (табл. 1) [17].

Цитотоксическое действие ингибиторов КАЧ IX и гефитиниба на клетки аденокарциномы легкого A549. Изучение влияния ингибиторов 1–4, гефитиниба и их комбинированного влияния на жизнеспособность клеток линии A549 прово-

Таблица 1. Новые ингибиторы КАЧ IX

№	Структура	K_i , нМ
1		$0,24 \pm 0,02$
2		$1,80 \pm 0,13$
3		$0,39 \pm 0,03$
4		$0,53 \pm 0,04$

дилось в условиях нормоксии и физиологической гипоксии (1% O₂). Было установлено, что в условиях физиологической гипоксии, по данным ОТ-ПЦР, отмечается повышение уровня экспрессии мРНК *HIF1A* в 2,1 раза и мРНК *CAIX* – в 1,5 раза по сравнению с контролем (условия нормоксии) (рис. П1 в Приложении). На уровне белка отмечена стабилизация HIF1α (повышение относительной экспрессии в 19 раз) в условиях физиологической гипоксии, которая была подтверждена методом иммуоблоттинга. Уровень КАЧ IX также повышается, но в меньшей степени (рис. П2 в Приложении).

В табл. 2 представлены результаты анализа жизнеспособности клеток линии A549 в присутствии ингибиторов 1–4 и гефитиниба в условиях нормоксии и физиологической гипоксии. В экспе-

Таблица 2. Жизнеспособность клеток линии A549 и комбинационный индекс, характеризующий эффективность совместного действия ингибиторов 1–4 и гефитиниба в условиях нормоксии и физиологической гипоксии

№	Нормоксия		Гипоксия	
	Ингибитор IC_{50} , мкМ	Ингибитор + гефитиниб IC_{50} , мкМ/*CI	Ингибитор IC_{50} , мкМ	Ингибитор + гефитиниб IC_{50} , мкМ/CI
1	$58,3 \pm 5,6$	$29,0 \pm 3,3/0,97$	$45,6 \pm 4,2$	$15,1 \pm 1,6/0,92$
2	$60,4 \pm 5,9$	$32,3 \pm 4,1/1,01$	$35,4 \pm 2,9$	$12,2 \pm 1,8/0,93$
3	$76,1 \pm 6,8$	$41,7 \pm 2,8/1,02$	$45,6 \pm 4,3$	$19,1 \pm 1,8/1,01$
4	–	$80,3 \pm 6,3/–$	$53,4 \pm 6,6$	$24,1 \pm 2,9/1,04$

Примечание. Условия нормоксии и физиологической гипоксии (C (гефитиниба) = 10 мкМ, время инкубации – 48 ч). CI – Комбинационный индекс; *CI < 1, CI = 1 и CI > 1 показывают синергизм, аддитивный эффект или антагонизм действия соответственно. На основе данных IC_{50} для гефитиниба, соединений 1–4 и их комбинации с гефитинибом были рассчитаны значения CI. В условиях физиологической гипоксии для комбинации ингибитора 1 с гефитинибом и ингибитора 2 с гефитинибом CI < 1, что свидетельствует о синергизме их действия; для комбинации ингибитора 3 с гефитинибом и ингибитора 4 с гефитинибом CI ≈ 1 показывает аддитивное действие.

рименте использовалась фиксированная концентрация гефитиниба ($C = 10$ мкМ), при которой он как моноагент не влиял на выживаемость клеток в условиях нормоксии и физиологической гипоксии. Как видно из табл. 2, сочетанное действие ингибиторов 1–3 и гефитиниба в условиях нормоксии приводит к снижению величины IC_{50} в 2 (ингибитор 1), 1,9 (ингибитор 2) и 1,8 (ингибитор 3) раза соответственно по сравнению с индивидуальными ингибиторами 1–3. В условиях физиологической гипоксии комбинированное действие приводит к уменьшению величины IC_{50} в 3 (ингибитор 1), 2,9 (ингибитор 2), 2,4 (ингибитор 3) и 1,6 (ингибитор 4) раза соответственно по сравнению с индивидуальными ингибиторами 1–4.

Селективность цитотоксического действия ингибиторов 1–4 была изучена на клетках линии ARPE-19 (линия клеток пигментного эпителия сетчатки глаза человека) в условиях физиологической гипоксии. Выживаемость клеток линии ARPE-19 для ингибиторов 1–4 ($C = 50$ мкМ) составляла 72,3%, 83,0%, 92,3% и 95,1% соответственно (рис. ПЗ в Приложении).

Влияние ингибиторов КАЧ IX и гефитиниба на миграцию клеток аденокарциномы легкого A549 в условиях гипоксии (100 мкМ $CoCl_2$). Одной из основных причин прогрессирования рака является возникновение метастазов, которые могут распространяться на другие органы и ткани. Важным фактором, приводящим к формированию метастазов, является миграционная способность опухолевых клеток [24]. Поэтому, кроме действия комбинаций новых ингибиторов КАЧ IX 1–4 с гефитинибом на пролиферацию опухолевых клеток, была проведена оценка влияния этих комбинаций на миграцию клеток аденокарциномы легкого A549 в условиях химически-индуцированной гипоксии. Оценку клеточной миграции проводили в режиме реального времени электроимпедансным методом.

Полученные данные, оцениваемые по коэффициентам наклона кривых (α), свидетельствуют о том, что ингибитор 1 в концентрации 25 мкМ только в период до 24 ч в сочетании с гефитинибом ($C = 10$ мкМ) снижал миграцию клеток линии A549 по сравнению с эффектом индивидуального гефитиниба (рис. 1, а; $p < 0,05$). При повышении концентрации ингибитора 1 до 50 мкМ в сочетании с гефитинибом наблюдается ингибирование миграции клеток линии A549 как за период 24 ч ($p < 0,01$), так и за период 48 ч ($p < 0,005$) по сравнению как с контрольными клетками, так и с клетками, инкубированными в присутствии индивидуального гефитиниба (рис. 1, б). Соотношение $\alpha(ДМСО)/\alpha(ингибитор\ 1 + гефитиниб)$ за 24 ч составило 1,93, а за 48 ч – 1,58. В то же время

индивидуальный ингибитор 1 в концентрации 50 мкМ также уменьшал миграционную активность клеток по сравнению с контрольными клетками в период первых суток.

Ингибитор 2 в концентрации 25 мкМ в комбинации с гефитинибом снижал миграционную активность клеток как в течение 24 ч ($p < 0,05$), так и за 48 ч ($p < 0,05$) по сравнению с индивидуальным гефитинибом (рис. 2, а). Соотношение $\alpha(ДМСО)/\alpha(ингибитор\ 2 + гефитиниб)$ за 24 ч составляло 1,36. Однако после 30 ч эксперимента данный эффект исчезал. Через 24 ч эксперимента не было выявлено отличий в миграции клеток линии A549 под действием ингибитора 2 в концентрации 50 мкМ по сравнению с контрольными клетками, но в сочетании с гефитинибом ингибитор 2 снижал миграционную активность клеток ($p < 0,005$; рис. 2, б). Соотношение $\alpha(ДМСО)/\alpha(ингибитор\ 2 + гефитиниб)$ за 24 ч составляло 1,8.

Ингибитор 3 в концентрациях 25 мкМ (рис. 3, а) и 50 мкМ (рис. 3, б) в сочетании с гефитинибом действовал на миграционную активность клеток линии A549 так же, как и индивидуальный гефитиниб (хотя в начальный период эксперимента наблюдается небольшое подавление клеточной миграции) за период 24 ч и 48 ч. Индивидуальный ингибитор 3 за общий период времени 48 ч не влиял на миграцию клеток линии A549 по сравнению с контролем (рис. 3, а и б).

Ингибитор 4 в концентрации 25 мкМ в сочетании с гефитинибом в первые 24 ч демонстрирует тенденцию к ингибированию клеточной миграции, однако никаких значимых отличий не наблюдается между кривыми (рис. 4, а). В следующие сутки клетки, культивируемые как в присутствии индивидуального гефитиниба, так и гефитиниба в комбинации с ингибитором 4, на биосенсорах регистрируются в большем количестве по сравнению с контролем и клетками, обработанными только ингибитором 4 (рис. 4, а). Ингибитор 4 в концентрации 50 мкМ в сочетании с гефитинибом в первые 24 ч ингибирует миграцию клеток по сравнению с контрольными клетками ($p < 0,05$) и с клетками, обработанными только гефитинибом ($p < 0,05$), соотношение $\alpha(ДМСО)/\alpha(ингибитор\ 4 + гефитиниб)$ за 24 ч составило 1,34. После 30 ч эксперимента характер наклона кривой для ингибитора 4 ($C = 50$ мкМ) и гефитиниба меняется, демонстрируя увеличение КИ до уровня, сравнимого с таковым для клеток, обработанными только ингибитором 4, а также контрольных клеток (рис. 4, б).

Несмотря на то что ингибиторы 1 и 2 в концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ в комбинации с гефитинибом (10 мкМ) и по отдельности значительно снижают миграционную подвижность клеток в первые 24 ч, позднее во всех случаях наблюдается

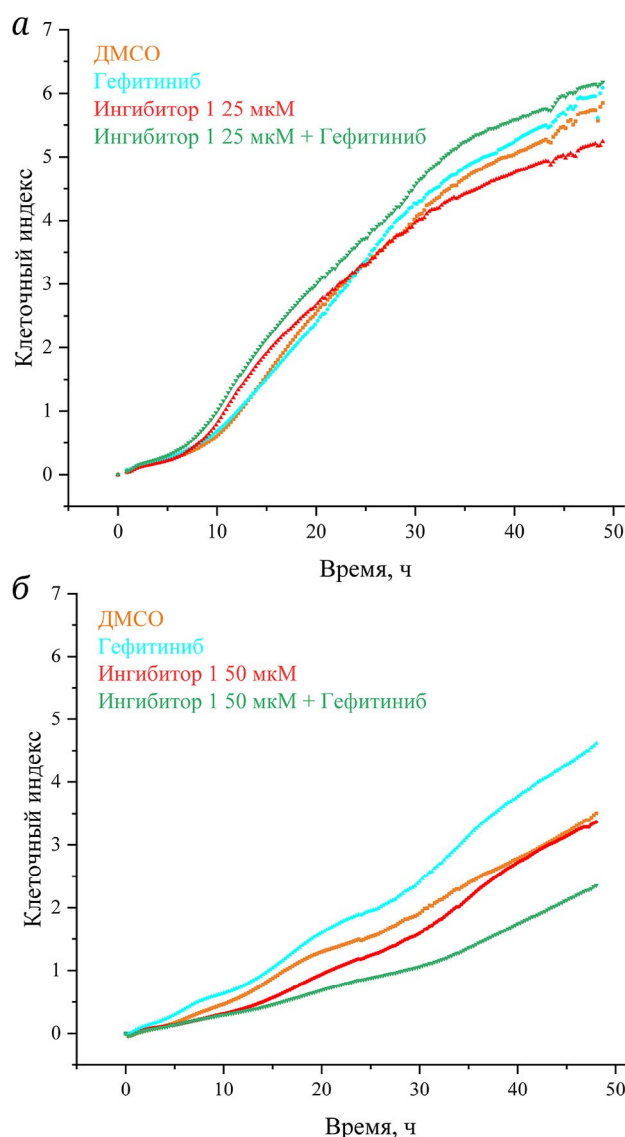


Рис. 1. Эффект ингибитора 1 и gefитиниба на миграцию клеток линии A549 в зависимости от концентрации ингибитора 1 и времени культивирования. а – Инкубация с gefитинибом (10 мкМ) и ингибитором 1 (25 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения клеточного индекса (КИ); б – инкубация с gefитинибом (10 мкМ) и ингибитором 1 (50 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения КИ. Показаны результаты одного репрезентативного измерения из трех разных экспериментов

увеличение КИ. Действительно, миграция клеток обычно происходит в период 20–24 ч, а позднее, помимо миграции, вклад в повышение КИ может давать клеточная пролиферация. Это объясняет временный положительный эффект от химиотерапии различными противоопухолевыми препаратами, в том числе и gefитинибом. Таким образом, опухолевые клетки приобретают резистентность к gefитинибу, и по прошествии некоторого времени заболевание начинает прогрессиро-

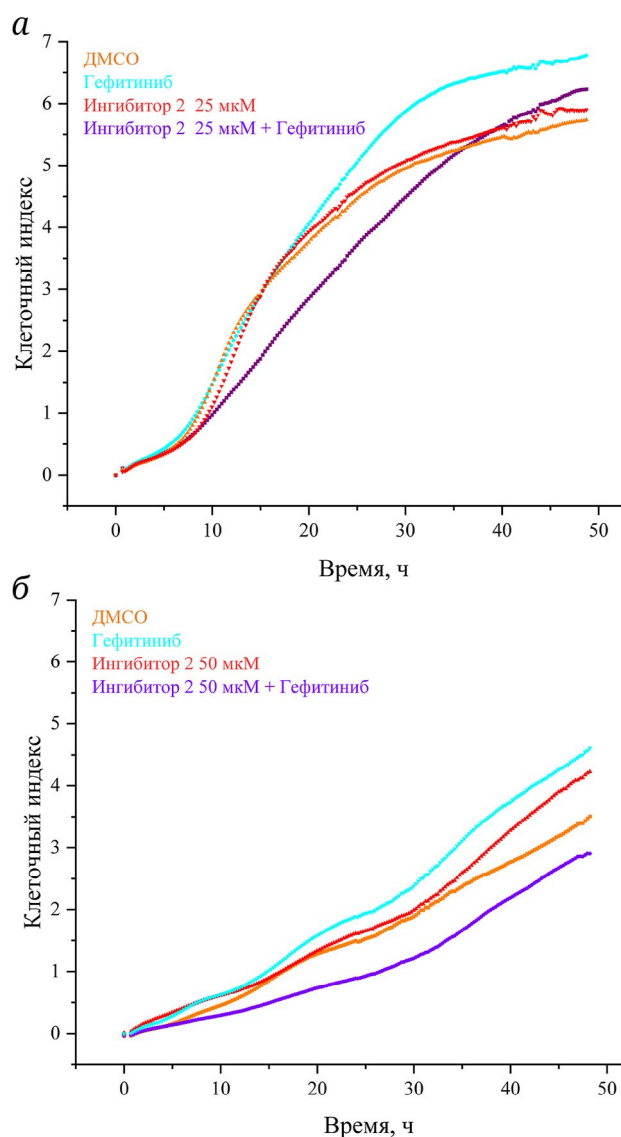


Рис. 2. Эффект ингибитора 2 и gefитиниба на миграцию клеток линии A549 в зависимости от концентрации ингибитора 2 и времени культивирования. а – Инкубация с gefитинибом (10 мкМ) и ингибитором 2 (25 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения клеточного индекса (КИ); б – инкубация с gefитинибом (10 мкМ) и ингибитором 2 (50 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения КИ. Показаны результаты одного репрезентативного измерения из трех разных экспериментов

вать [9]. Интерпретируя результаты эксперимента за последние 24 ч, а именно увеличение КИ, также нельзя исключать вероятность спонтанного метастазирования. В клинической практике встречаются случаи, когда монотерапия противоопухолевым препаратом вызвала повышенную миграцию раковых клеток. Так, сунитиниб значительно подавлял рост первичной опухоли, но усугублял ее гипоксию, тем самым увеличивая метастазирование [25].

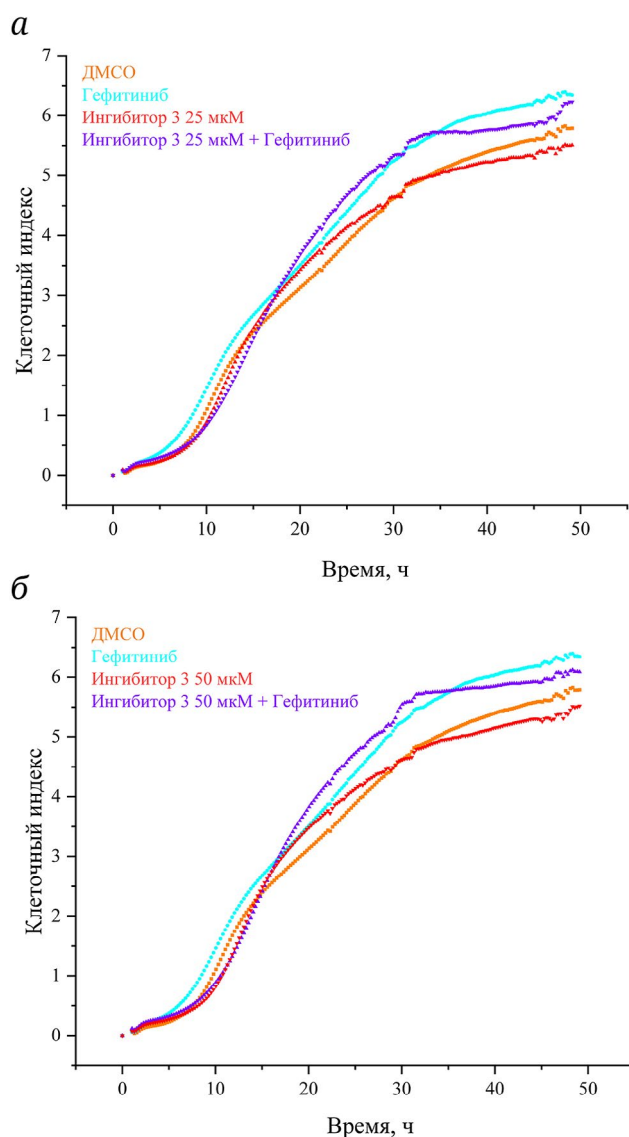


Рис. 3. Эффект ингибитора 3 и гефитиниба на миграцию клеток линии A549 в зависимости от концентрации ингибитора 3 и времени культивирования. а – Инкубация с гефитинибом (10 мкМ) и ингибитором 3 (25 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения клеточного индекса (КИ); б – инкубация с гефитинибом (10 мкМ) и ингибитором 3 (50 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения КИ. Показаны результаты одного репрезентативного измерения из трех разных экспериментов

По совокупности проведенных исследований можно заключить, что ингибиторы 1, 3 и 4 в концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ не изменяют миграционную активность клеток линии аденокарциномы легкого человека A549, кроме эффекта ингибитора 2 в концентрации 50 мкМ, который проявился спустя 40 ч после начала эксперимента. При этом ингибиторы 1 и 2 ($C = 50$ мкМ) в сочетании с гефитинибом ($C = 10$ мкМ) проявляли стабильное ингибирующее действие на миграци-

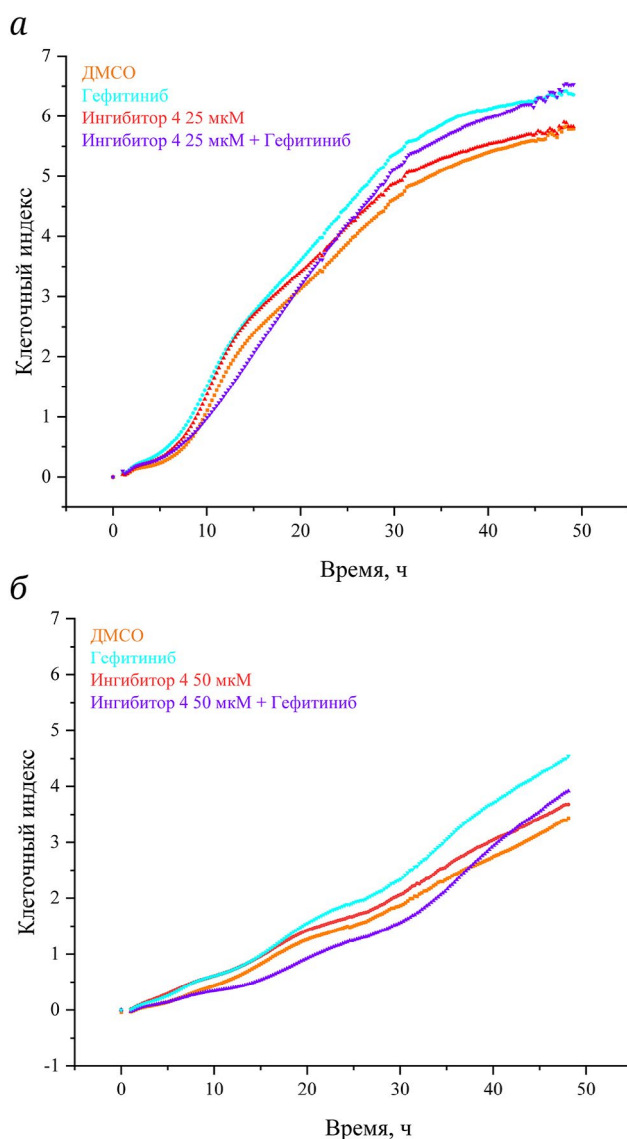


Рис. 4. Эффект ингибитора 4 и гефитиниба на миграцию клеток линии A549 в зависимости от концентрации ингибитора 4 и времени культивирования. а – Инкубация с гефитинибом (10 мкМ) и ингибитором 4 (25 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения клеточного индекса (КИ); б – инкубация с гефитинибом (10 мкМ) и ингибитором 4 (50 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения КИ. Показаны результаты одного репрезентативного измерения из трех разных экспериментов

онную активность клеток линии A549, кроме того, в случае комбинации ингибитора 1 с гефитинибом миграция клеток подавлялась эффективнее всего. Таким образом, комбинации ингибиторов КАЧ IX с гефитинибом оказали большее влияние не только на выживаемость опухолевых клеток, но и на их подвижность, чем эти же соединения, взятые по отдельности. Ввиду того что адаптация опухолевых клеток к гипоксическим условиям способствует выбросу метастазов, а ингибиторы КАЧ IX

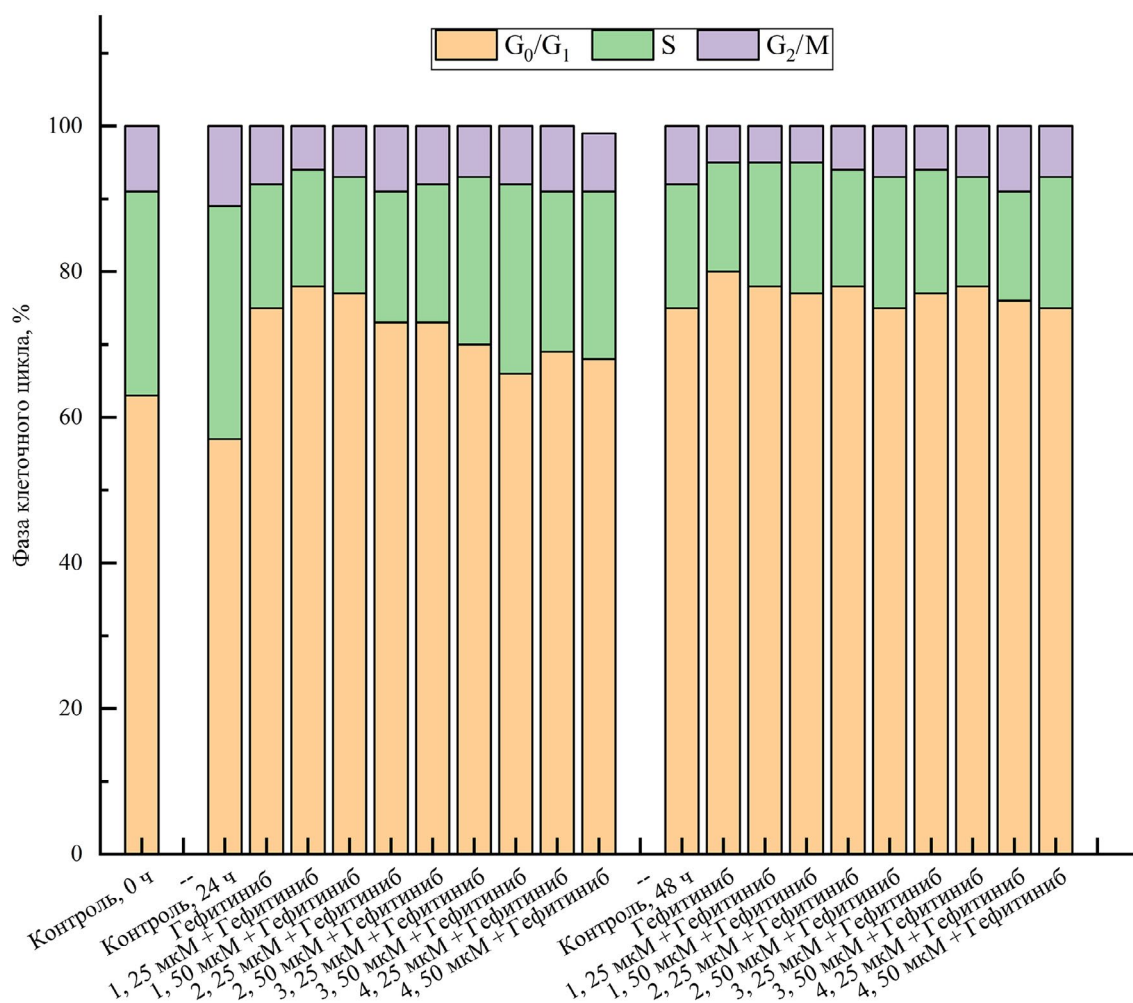


Рис. 5. Распределение клеток линии A549 по фазам клеточного цикла в присутствии ингибиторов КАЧ IX и гефитиниба (24 ч и 48 ч) в условиях физиологической гипоксии (1% O₂)

эффективно действуют на метастатический потенциал опухолевых клеток [24], использование ингибиторов КАЧ IX в противоопухолевой терапии как части комбинационной терапии имеет большие перспективы.

Влияние комбинированного действия ингибиторов КАЧ IX и гефитиниба на распределение клеток по фазам клеточного цикла клеток линии A549. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла, полученный методом проточной цитометрии, показал (рис. 5), что через 24 ч инкубации в условиях физиологической гипоксии происходит значительное накопление клеток в фазе G₀/G₁, инкубированных в присутствии индивидуального гефитиниба (до 75,7 ± 0,4% клеток) и в сочетании с ингибитором 1 (до 78,1 ± 1,2% клеток) по сравнению с контрольными клетками (57,7 ± 1,8%). Действие других ингибиторов КАЧ IX в сочетании с гефитинибом также оказывало цитостатический эффект на клетки линии A549. Клетки накапливались в фазе G₀/G₁, однако доля таких клеток была ниже по сравнению с

действием гефитиниба, в особенности в сочетании с ингибитором 3 (70,8 ± 1,0% (25 мкМ) и 67,3 ± 0,7% (50 мкМ) при уровне достоверности $p < 0,05$ и $p < 0,005$ соответственно), что свидетельствует о разной начальной динамике прохождения клеток по фазам клеточного цикла.

Через 48 ч в присутствии гефитиниба доля клеток в фазе G₀/G₁ возросла до 81,0 ± 1,2%. При совместном действии ингибиторов КАЧ IX и гефитиниба к 48 ч инкубации торможение клеток в фазах G₀/G₁ выравнивалось во всех образцах на уровне 77–80% (рис. 5).

Влияние комбинированного действия ингибиторов КАЧ IX и гефитиниба на активность каспаз 3/7 и апоптоз. На рис. 6 представлены точечные цитограммы контрольных образцов клеток линии A549 в присутствии ДМСО или 10 мкМ гефитиниба (рис. 6, а), а также ингибиторов 1 и 2, проявивших в сочетании с гефитинибом способность индуцировать апоптоз опухолевых клеток в условиях физиологической гипоксии (рис. 6, б и в).

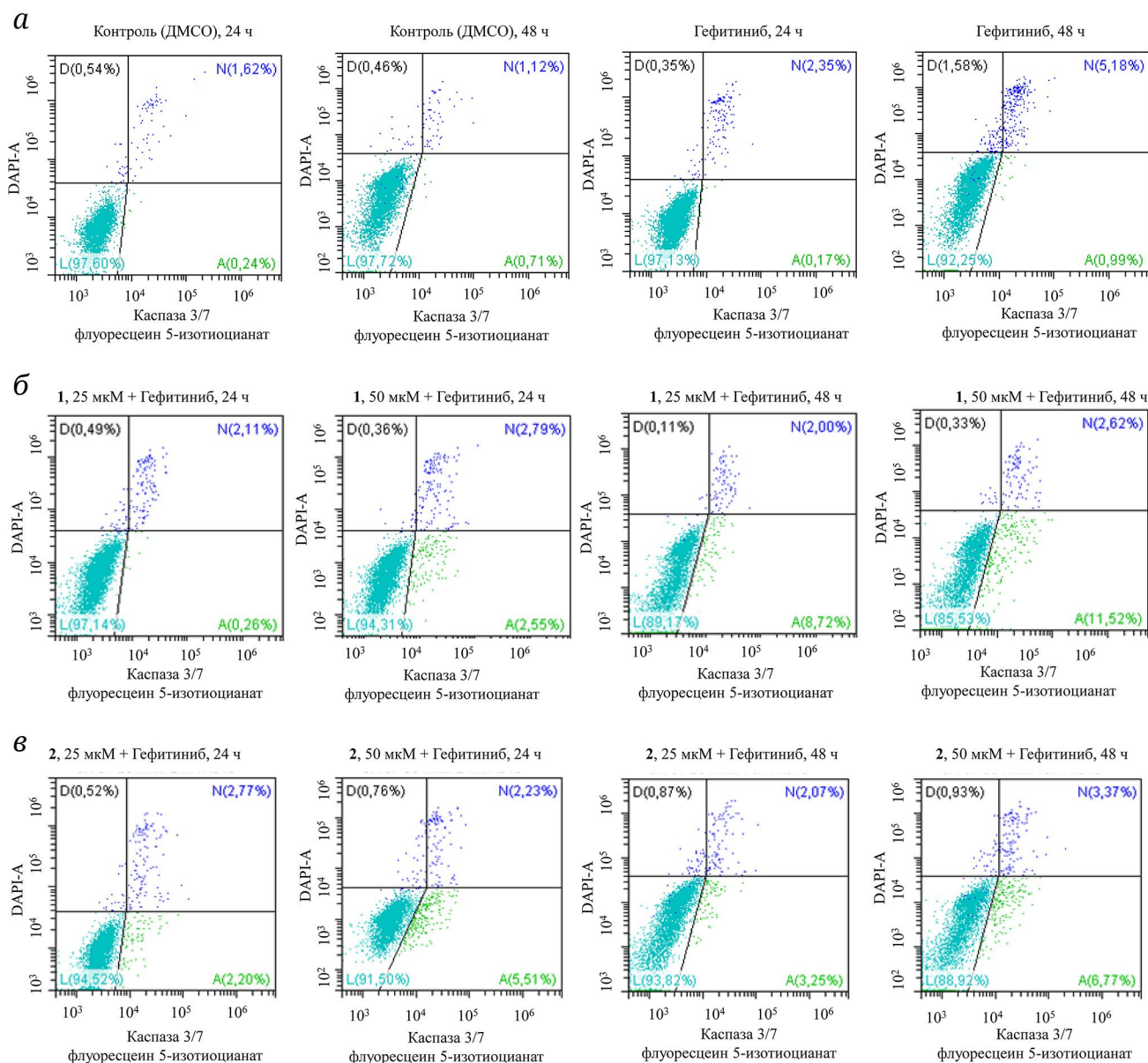


Рис. 6. Ингибиторы КАЧ IX в сочетании с гепитинибом вызывают каспаза 3/7-зависимый апоптоз клеток линии A549. *а* – Инкубация с гепитинибом (10 мкМ) в течение 24 ч и 48 ч; *б* – инкубация с гепитинибом (10 мкМ) и ингибитором 1 (25 и 50 мкМ) в течение 24 ч и 48 ч; *в* – инкубация с гепитинибом (10 мкМ) и ингибитором 2 (25 и 50 мкМ) в течение 24 ч и 48 ч. Типы клеток: D – погибшие клетки; N – поздние апоптотические клетки; L – живые клетки; A – ранние апоптотические клетки

Ранние апоптотические клетки позиционируются в нижнем правом квадрате и обозначены как A (каспазы 3/7⁺; DAPI⁻), поздние апоптотические клетки – в правом верхнем квадрате – как N (каспазы 3/7⁺; DAPI⁺). На цитограммах прослеживается дозо- и время-зависимое появление популяции ранних апоптотических клеток (A), которое свидетельствует об активации каспаз 3/7 в клетках линии A549 под действием ингибиторов 1 и 2 (рис. 6, б и в; табл. 3). Для ингибиторов 3 и 4 не наблюдалось появления ранних апоптотических клеток даже через 48 ч инкубации с модуляторами ответа (табл. 3).

Изучен комбинированный цитотоксический эффект гепитиниба и ингибиторов КАЧ IX (1–4), а также их влияние на пролиферацию, активацию каспаз 3/7 и клеточный цикл на примере клеточной линии аденокарциномы легкого человека A549 в условиях физиологической гипоксии. В условиях физиологической гипоксии для комбинации ингибитора 1 с гепитинибом и ингибитора 2 с гепитинибом рассчитаны значения CI, величины которых были меньше единицы, что свидетельствует о синергизме их действия. Установлено, что сочетание ингибиторов 1 и 2 с гепитинибом вызывает гибель клеток по механизму

Таблица 3. Цитометрический анализ активации каспаз 3/7 в клетках линии A549 в условиях физиологической гипоксии (1% O₂)

Тестируемый ингибитор, условия		Ранние апоптотические клетки, % (среднее ± SD)	Поздние апоптотические клетки, % (среднее ± SD)	Клеточная гибель, % (среднее ± SD)
ДМСО 24 ч		0,25 ± 0,05	1,53 ± 0,10	0,48 ± 0,18
ДМСО 48 ч		1,20 ± 0,47	1,34 ± 0,52	0,42 ± 0,14
Гефитиниб, 10 мкМ, 24 ч		0,17 ± 0,05	2,35 ± 0,41	0,51 ± 0,18
Гефитиниб, 10 мкМ, 48 ч		0,92 ± 0,14	3,78 ± 1,26	1,30 ± 0,35
№ 1	25 мкМ, 24 ч	0,28 ± 0,02	1,98 ± 0,12	0,40 ± 0,10
	25 мкМ, 48 ч	7,79 ± 0,81	3,16 ± 1,01	0,39 ± 0,28
	50 мкМ, 24 ч	2,09 ± 0,47	2,88 ± 0,22	0,26 ± 0,10
	50 мкМ, 48 ч	10,95 ± 0,69	2,90 ± 0,48	0,38 ± 0,13
№ 2	25 мкМ, 24 ч	1,77 ± 0,38	2,72 ± 0,11	0,48 ± 0,06
	25 мкМ, 48 ч	3,68 ± 0,37	2,55 ± 0,42	1,21 ± 0,30
	50 мкМ, 24 ч	4,66 ± 0,83	2,20 ± 0,37	1,24 ± 0,50
	50 мкМ, 48 ч	6,69 ± 0,55	3,03 ± 0,45	0,86 ± 0,07
№ 3	25 мкМ, 24 ч	0,23 ± 0,08	1,39 ± 0,45	0,87 ± 0,09
	25 мкМ, 48 ч	0,30 ± 0,13	2,04 ± 0,44	2,35 ± 0,53
	50 мкМ, 24 ч	0,26 ± 0,21	2,05 ± 1,33	1,41 ± 0,74
	50 мкМ, 48 ч	0,98 ± 0,65	2,05 ± 0,18	1,89 ± 0,23
№ 4	25 мкМ, 24 ч	0,44 ± 0,13	3,34 ± 1,23	0,42 ± 0,07
	25 мкМ, 48 ч	0,24 ± 0,09	3,16 ± 0,10	1,08 ± 0,24
	50 мкМ, 24 ч	0,33 ± 0,14	2,71 ± 0,74	0,46 ± 0,07
	50 мкМ, 48 ч	0,20 ± 0,11	4,80 ± 0,47	1,29 ± 0,36

каспаза 3/7-зависимого апоптоза и угнетает инвазивный потенциал клеток A549, из которых ингибитор 1 обладает наибольшим эффектом и может рассматриваться как перспективное соединение-лидер для дальнейших исследований.

Вклад авторов. А.С. Бунев – концепция, проведение экспериментов; А.А. Шетнев – синтез соединений; О.С. Шемчук – проведение экспериментов, статистическая обработка результатов, написание текста статьи; П.К. Кожухов – проведение экспериментов; Т.В. Шаронова – синтез соединений; И.И. Тюреева – проведение экспериментов, редактирование текста статьи; М.Г. Хотин – проведение экспериментов, редактирование текста статьи; С.В. Агеев – проведение экспериментов; Д.К. Холмуродова – обсуждение, проведение экспериментов; Ж.А. Ризаев – обсуждение, финансовые ресурсы; К.Н. Семенов – концепция, обсуждение

и руководство работой; В.В. Шаройко – концепция, руководство работой, редактирование финального текста статьи, финансовые ресурсы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-73-20264).

Благодарности. Исследование выполнено с использованием объекта инфраструктуры «Центр клеточных технологий» Института цитологии РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistry.moscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011) Global cancer statistics, *Cancer J. Clinic.*, **61**, 69-90, <https://doi.org/10.3322/CAAC.20107>.
2. Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. L., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. C., Christiani, M. D., Settleman, J., and Haber, D. A. (2004) Activating

- mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib, *New Eng. J. Med.*, **350**, 2129-2139, <https://doi.org/10.1056/NEJMOA040938>.
3. Pao, W., and Chmielecki, J. (2010) Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **10**, 760, <https://doi.org/10.1038/NRC2947>.
 4. Sim, E. H. A., Yang, I. A., Wood-Baker, R., Bowman, R. V., and Fong, K. M. (2018) Gefitinib for advanced non-small cell lung cancer, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **1**, <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006847.PUB2>.
 5. Sowa, T., Menju, T., Chen-Yoshikawa, T. F., Takahashi, K., Nishikawa, S., Nakanishi, T., Shikuma, K., Motoyama, H., Hijiya, K., Aoyama, A., Sato, T., Sonobe, M., Harada, H., and Date, H. (2017) Hypoxia-inducible factor 1 promotes chemoresistance of lung cancer by inducing carbonic anhydrase IX expression, *Cancer Med.*, **6**, 288-297, <https://doi.org/10.1002/CAM4.991>.
 6. Lie, M., Mazure, N. M., Hofman, V., Ammadi, R. E., Ortholan, C., Bonnetaud, C., Havet, K., Venissac, N., Mograbi, B., Mouroux, J., Pouyssegur, J., and Hofman, P. (2010) High levels of carbonic anhydrase IX in tumour tissue and plasma are biomarkers of poor prognostic in patients with non-small cell lung cancer, *Br. J. Cancer*, **102**, 1627, <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6605690>.
 7. Becker, H. M. (2020) Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer, *Br. J. Cancer*, **122**, 157, <https://doi.org/10.1038/S41416-019-0642-Z>.
 8. Lee, S. H., McIntyre, D., Honess, D., Hulikova, A., Pacheco-Torres, J., Cerdán, S., Swietach, P., Harris, A. L., and Griffiths, J. R. (2018) Carbonic anhydrase IX is a pH-stat that sets an acidic tumour extracellular pH *in vivo*, *Br. J. Cancer*, **119**, 622, <https://doi.org/10.1038/S41416-018-0216-5>.
 9. Debreova, M., Csaderova, L., Burikova, M., Lukacikova, L., Kajanova, I., Sedlakova, O., Kery, M., Kopacek, J., Zatovicova, M., Bizik, J., Pastorekova, S., and Svastova E. (2019) CAIX regulates invadopodia formation through both a pH-dependent mechanism and interplay with actin regulatory proteins, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2745, <https://doi.org/10.3390/IJMS20112745>.
 10. Succio, M., Amiranda, S., Sasso, E., Marciano, C., Finizio, A., De Simone, G., Garbi, C., and Zambrano, N. (2023) Carbonic anhydrase IX subcellular localization in normoxic and hypoxic SH-SY5Y neuroblastoma cells is assisted by its C-terminal protein interaction domain, *Heliyon*, **9**, e18885, <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2023.E18885>.
 11. Peppicelli, S., Andreucci, E., Ruzzolini, J., Bianchini, F., Nediani, C., Supuran, C. T., and Calorini, L. (2020) The carbonic anhydrase IX inhibitor SLC-0111 as emerging agent against the mesenchymal stem cell-derived pro-survival effects on melanoma cells, *J. Enzyme Inhibit. Med. Chem.*, **35**, 1185-1193, <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1764549>.
 12. Yap, T. A., Omlin, A., and De Bono, J. S. (2013) Development of therapeutic combinations targeting major cancer signaling pathways, *J. Clin. Oncol.*, **31**, 1592-1605, <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.6418>.
 13. Partridge, A. H., Burstein, H. J., and Winer, E. P. (2001) Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **2001**, 135-142, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003451>.
 14. Blagosklonny, M. V. (2005) Overcoming limitations of natural anticancer drugs by combining with artificial agents, *Trends Pharmacol. Sci.*, **26**, 77-81, <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2004.12.002>.
 15. Lu, Y., Liu, Y., Oeck, S., and Glazer, P. M. (2018) Hypoxia promotes resistance to EGFR inhibition in NSCLC cells via the histone demethylases, LSD1 and PLU-1, *Mol. Cancer Res.*, **16**, 1458-1469, <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0637>.
 16. Ma, J. S. Y., Kim, J. Y., Kazane, S. A., Choi, S., Yun, H. Y., Kim, M. S., Rodgers, D. T., Pugh H. M., Singer, O., Sun, S. B., Fonslow, B. R., Kochenderfer, J. N., Wright, T. M., Schultz, P. G., Young, T. S., Kim, C. H., and Cao, Y. (2016) Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E450-E458, <https://doi.org/10.1073/PNAS.1524193113>.
 17. Swinson, D. E. B., and O'Byrne, K. J. (2006) Interactions between hypoxia and epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer, *Clin. Lung Cancer*, **7**, 250-256, <https://doi.org/10.3816/CLC.2006.N.002>.
 18. Ono, M., Hirata, A., Kometani, T., Miyagawa, M., Ueda, S., Kinoshita, H., Fujii, T., and Kuwano M. (2004) Sensitivity to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation, *Mol. Cancer Ther.*, **3**, 465-472, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.465.3.4>.
 19. Tracy, S., Mukohara, T., Hansen, M., Meyerson, M., Johnson, B. E., and Jänne, P. A. (2004) Gefitinib induces apoptosis in the EGFR L858R non-small-cell lung cancer cell line H3255, *Cancer Res.*, **64**, 7241-7244, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1905>.
 20. Krasavin, M., Shetnev, A., Sharonova, T., Baykov, S., Kalinin, S., Nocentini, A., Sharoyko, V., Poli, G., Tuccinardi, T., Presnukhina, S., Tennikova, T. B., and Supuran, C. T. (2019) Continued exploration of 1,2,4-oxadiazole periphery for carbonic anhydrase-targeting primary arene sulfonamides: Discovery of subnanomolar inhibitors of

- membrane-bound hCA IX isoform that selectively kill cancer cells in hypoxic environment, *Eur. J. Med. Chem.*, **164**, 92-105, <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2018.12.049>.
21. Wu, D., and Yotnda, P. (2011) Induction and testing of hypoxia in cell culture, *J. Visual. Exp.*, **54**, 2899, <https://doi.org/10.3791/2899>.
 22. Paneerselvam, C., and Ganapasam, S. (2020) β -Escin alleviates cobalt chloride-induced hypoxia-mediated apoptotic resistance and invasion via ROS-dependent HIF-1 α /TGF- β /MMPs in A549 cells, *Toxicol. Res.*, **9**, 191-201, <https://doi.org/10.1093/TOXRES/TFAA019>.
 23. Bahadori, M. B., Vandghanooni, S., Dinparast, L., Eskandani, M., Ayatollahi, S. A., Ata, A., and Nazemiyeh, H. (2019) Triterpenoid corosolic acid attenuates HIF-1 stabilization upon cobalt (II) chloride-induced hypoxia in A549 human lung epithelial cancer cells, *Fitoterapia*, **134**, 493-500, <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2019.03.013>.
 24. Pastorekova, S., and Gillies, R. J. (2019) The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond, *Cancer Metastasis Rev.*, **38**, 65-77, <https://doi.org/10.1007/S10555-019-09799-0>.
 25. Hedlund, E. M. E., McDonald, P. C., Nemirovsky, O., Awrey, S., Jensen, L. D. E., and Dedhar, S. (2019) Harnessing induced essentiality: targeting carbonic anhydrase IX and angiogenesis reduces lung metastasis of triple negative breast cancer xenografts, *Cancers*, **11**, 1002, <https://doi.org/10.3390/CANCERS11071002>.

COMBINATION OF CARBONIC ANHYDRASE ISOFORM IX INHIBITORS AND GEFITINIB SUPPRESSES ON THE INVASIVE POTENTIAL OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER CELLS

A. S. Bunev¹, A. A. Shetnev², O. S. Shemchuk³, P. K. Kozhukhov³, T. V. Sharonova⁴,
I. I. Tyuryaeva^{4,5}, M. G. Khotin⁵, S. V. Ageev^{3,4}, D. K. Kholmurodova⁶, J. A. Rizaev⁶,
K. N. Semenov^{3,4,6}, and V. V. Sharoyko^{1,3,4,6*}

¹ Medicinal Chemistry Center, Togliatti State University, 445020 Togliatti, Russia

² Institute of Biophysics of the Future, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

³ Pavlov First St. Petersburg State Medical University, 197022 St. Petersburg, Russia

⁴ St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia

⁵ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, 194064 St. Petersburg, Russia

⁶ Scientific and Practice Center for Immunology, Allergology and Human Genomics,
Samarkand State Medical University, 100400 Samarkand, Uzbekistan

Human carbonic anhydrase isoform IX (CA IX) plays a key role in maintaining the pH homeostasis of malignant neoplasms, creating a favorable microenvironment for the growth, invasion and metastasis of tumor cells. Recent studies have established that inhibition of the activity of CA IX, expressed on the surface of tumor cells, significantly increases the effectiveness of classical chemotherapeutic agents and makes it possible to suppress the resistance of tumor cells to chemotherapy, as well as increase their sensitivity to the drugs used (including reducing the required dose of cytostatics). In this work, we studied the ability of new CA IX inhibitors based on substituted 1,2,4-oxadiazole-containing primary aromatic sulfonamides to potentiate the cytostatic effect of gefitinib (a selective inhibitor of the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor) under hypoxic conditions. In this work, we studied the combined effect of gefitinib and CA IX inhibitors – 4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)thiophene-2-sulfonamide (**1**), 4-(5-(thiophene-3-yl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)benzenesulfonamide (**2**), 4-(3-(pyridin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)thiophene-2-sulfonamide (**3**) and 4-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)benzenesulfonamide (**4**) on cytotoxicity, proliferation, activation of caspases 3/7 and cell cycle using the example of human lung adenocarcinoma cell line A549 under conditions of hypoxia. It was found that combination of compounds **1** and **2** with gefitinib inhibits the invasive potential of A549 cells, of which inhibitor **1** had the greatest effect and can be considered as a promising candidate for further research.

Keywords: combination therapy, tumor microenvironment, human carbonic anhydrase inhibitors, human lung adenocarcinoma cell line A549, cancer, hypoxia, sulfonamides, 1,2,4-oxadiazoles, gefitinib

ВЛИЯНИЕ ДОБАВКИ С- И N-КОНЦЕВОГО ПОЛИГИСТИДИНОВОГО ТЕГА НА АГРЕГАЦИЮ БЕЛКА NEP ВИРУСА ГРИППА А

© 2024 О.Н. Королева¹, Н.В. Кузьмина², А.П. Толстова³,
Е.В. Дубровин^{4,5*}, В.Л. Друза⁶

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия

² Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119071 Москва, Россия

³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: dubrovin@polly.phys.msu.ru

⁵ Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», 119049 Москва, Россия

⁶ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 25.01.2024

После доработки 06.11.2024

Принята к публикации 20.11.2024

Белок ядерного экспорта (NEP) вируса гриппа А, являющийся одним из ключевых компонентов жизненного цикла вируса, может рассматриваться в качестве перспективной модели для изучения особенностей образования амилоидов вирусными белками. С помощью атомно-силовой микроскопии проведены сравнительные исследования агрегационных свойств рекомбинантных вариантов NEP, в том числе белка природной структуры, а также модифицированных вариантов с N- и C-концевыми His₆-содержащими аффинными фрагментами. Все варианты белка в физиологических условиях способны образовывать агрегаты различной морфологии: мицеллоподобные наночастицы, гибкие протофибриллы, жесткие фибриллярные агрегаты амилоидного типа и др. Присоединенный к C-концу His₆-содержащий фрагмент оказывает наибольшее влияние на кинетику агрегации и морфологию наночастиц, что свидетельствует о важной роли C-концевого домена в процессе самосборки белка. Моделирование методом молекулярной динамики не выявило существенного влияния His₆-содержащих фрагментов на структуру белка, но продемонстрировало некоторые различия в подвижности этих фрагментов, что может объяснить наблюдаемые различия в кинетике агрегации различных вариантов NEP. Рассмотрены гипотетические механизмы образования и взаимопревращения различных агрегатов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус гриппа А, белок ядерного экспорта NEP, агрегация белков, полигистидин-содержащие концевые добавки, атомно-силовая микроскопия.

DOI: 10.31857/S0320972524120073 EDN: IFCIAD

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гриппа А является причиной острых респираторных заболеваний, приводящих зачастую к тяжелым осложнениям. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодное число заболеваний в мире приближается примерно к 1 млрд, из них с летальным исходом – при-

мерно 600 000–700 000 (Глобальная программа по гриппу Всемирной организации здравоохранения; <https://www.who.int/tools/flunet>). Выявление инфекционных факторов, влияющих на протекание заболевания и его тяжесть, является необходимым этапом разработки терапевтических подходов. Одним из чрезвычайно перспективных с этой точки зрения объектов в составе вируса гриппа А

Принятые сокращения: ACM – атомно-силовая микроскопия; МД – молекулярная динамика; NEP – белок ядерного экспорта; NEP-C и NEP-N – рекомбинантные белки NEP с (His)₆-содержащим фрагментом на C- и N-концах соответственно; RMSD – среднеквадратическое отклонение.

* Адресат для корреспонденции.

является малоизученный белок NEP (nuclear export protein – белок ядерного экспорта), который участвует в регуляции ряда важнейших процессов жизненного цикла вируса [1–5]. В предыдущих работах нами было обнаружено, что NEP склонен к самосборке в сферические агрегаты и фибриллярные структуры амилоидного типа [6, 7]. Были высказаны предположения относительно возможной роли этого явления на различных этапах размножения вируса [6, 8].

В литературе существует обширная информация по амилоидообразованию эукариотических белков, что в большинстве случаев сопряжено с развитием различных патологий [9, 10]. В то же время данные об агрегации вирусных белков крайне немногочисленны [11]. Однако недавние исследования указывают на то, что агрегаты вирусных белков могут служить факторами инфекционности [12]. В частности, особенности протекания вирусной инфекции Covid-19 увязывают с амилоидной агрегацией ряда белков SARS-CoV-2 [13–16]. В случае вируса гриппа А известно, что по крайней мере два белка, PB1-F2 и NS1, являющиеся ключевыми факторами вирулентности и участвующие в подавлении раннего иммунного ответа клеток, проявляют высокую склонность к агрегации амилоидного типа [17–19]. Причем для PB1-F2 экспериментально установлено, что агрегаты способствуют нарушению целостности мембран митохондрий [17, 20]. Еще одним показательным примером потенциально важной роли амилоидных агрегатов может служить белок NSs вируса лихорадки Рифт-Валли, агрегаты которого обнаружены в различных компартментах клетки-хозяина как на ранних, так и на поздних стадиях развития вирусной инфекции [21]. Таким образом, изучение молекулярных механизмов агрегации NEP позволит не только получить новые данные о функционировании вирусного аппарата, но и может послужить основой для разработки стратегий целенаправленного воздействия на этот процесс в рамках поиска новых терапевтических препаратов.

Для проведения различных структурно-функциональных исследований чрезвычайно важно располагать высокочистыми препаратами белков. Широкое распространение получил метод аффинной хроматографии с использованием концевых His₆-содержащих аффинных фрагментов [22]. Однако наличие таких дополнительных коротких последовательностей (тегов) может оказывать влияние на физико-химические и биологические свойства белка, а также на его функцию [23–25]. Влияние размера, положения и типа аффинного тега на процесс агрегации белков в настоящее время изучено недостаточно, и существующие данные весьма противоречивы [24, 26, 27]. Напри-

мер, в некоторых исследованиях показано, что положение тега (N-концевое или C-концевое) может влиять на склонность белка к агрегации [24, 25, 27–29], хотя в других случаях такого эффекта не наблюдается [28, 29]. Роль размера тега также остается неопределенной: в некоторых случаях его увеличение приводит к возрастанию склонности белка к агрегации, в то время как для других белков размер тега не оказывает значительного влияния [25, 28–30]. Эти аспекты требуют дальнейшего систематического изучения для разработки единой концепции влияния аффинных тегов на агрегацию белков.

Ранее нами были получены рекомбинантные варианты NEP с His₆-тегами на N- и C-концах (NEP-N и NEP-C), а также препарат, полностью соответствующий природной структуре (аминокислотная последовательность штамма A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)) [31]. Предварительные результаты показали склонность всех вариантов белка к агрегации [6, 7]. Целью данной работы являлось более детальное исследование влияния упомянутых концевых добавок на характер агрегации вариантов NEP с использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ). Оказалось, что вариант NEP-C демонстрирует наиболее высокие агрегационные свойства, что позволяет использовать этот вариант белка как удобную модель для изучения различных аспектов амилоидообразования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и электрофоретический анализ белка. Конструирование экспрессионных систем и выделение очищенных препаратов NEP, NEP-N и NEP-C описано в работах Golovko et al. [6, 31]. Концентрированные препараты белков (6–7 мкг/мкл) хранили при 4 °C в буферном растворе, содержащем 20 мМ Hepes (pH 7,2) и 0,5 М NaCl, и использовали в дальнейшем для изучения агрегации с варьированием условий инкубации. Аликвоты белковых препаратов (концентрация – ~1,5 мкг/мкл) непосредственно после выделения, а также после выдерживания при 4 °C в течение 3 мес. в буферном растворе, содержащем 20 мМ Hepes (pH 7,2) и 0,15 М NaCl, анализировали с помощью ДСН-ПААГ по методу Laemmli [32] с использованием 15%-ного разделяющего ПААГ. Гели окрашивали Кумасси G-250. В качестве белкового маркера молекулярной массы использовали PageRuler Prestained Protein Ladder («Thermo Scientific», США).

Атомно-силовая микроскопия. Для АСМ-исследования белка аликвоты 5–10 мкл концентрированного раствора белка разбавляли в 10–100 раз деионизованной водой или буфером, содержащим

10 mM Tris-HCl (pH 7,0) и 10 mM NaCl. Разбавленный белок (10 мкл) наносили на поверхность свежесколотой слюды на 5–10 мин, после чего высушивали в потоке воздуха. АСМ-исследования проводили на атомно-силовом микроскопе Nanoscope III A «Digital Instruments», США) в режиме прерывистого контакта на воздухе с использованием коммерческих кантилеверов HA_NC (константы жесткости – ~11,5 и 5,3 Н/м; резонансная частота – ~254 и 152 кГц; «Типснано», Россия). Обработку изображений проводили в программе Фемтоскан (Центр перспективных технологий, Россия) [33].

Молекулярная динамика. Полноразмерная структура для природной формы NEP была предсказана с помощью программы AlphaFold2 [34]. Далее, моделирование проводили в программной среде GROMACS [35] методом молекулярной динамики (МД) в воде в присутствии 150 mM NaCl в течение 100 нс при 300 K для получения равновесной конформации, после чего белок нагревали в течение 3 нс до 500 K методом имитации отжига. Далее, фиксировали положение остатков 64–121 и моделировали белок при 500 K в течение 20 нс. Это привело к частичному разрушению α -спиралей на *N*-концевых участках белка. Итоговую структуру использовали в качестве начальной для МД-моделирования в течение 200 нс. Модификации *N*- и *C*-концов проводили в графическом молекулярном редакторе. NEP-N был получен путем добавления аминокислотной последовательности MNNNNHSGGT к первому остатку, а NEP-C был получен путем добавления аминокислотной последовательности DPGSHNNNNHL к последнему остатку белка NEP штамма A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (запись в UniProt: P03508) в конформации, полученной нами по описанному выше протоколу.

Далее, белки моделировали в течение 200 нс в воде в присутствии 150 mM NaCl при температуре 300 K. Размеры ячейки составляли 729 нм³ для всех трех изоформ. Использовалось силовое поле CHARMM36 [36] и модель воды TIP3P. Продуктивная стадия моделирования проводилась в NPT-ансамбле с шагом интегрирования 2 фс. Для термостатирования использовалась модель V-rescale, для баростатирования – C-rescale. Радиусы обрезания кулоновских и ван-дер-ваальсовых сил составляли 1,2 нм.

Из траекторий продуктивного моделирования утилитой gmxsham получали ландшафты энергии Гиббса относительно первой и второй главных компонент. Из полученного ландшафта для каждой траектории извлекали все конформации, для которых энергия Гиббса имела минимальное значение. Репрезентативные структуры получали с помощью кластеризации по алгоритму DBSCAN.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения рекомбинантных вариантов полноразмерного белка NEP (121 а.о., 14 500 Да) как природной структуры, так и содержащих аффинные His₆-теги, NEP-N (MNNNNHSGGT на *N*-конце) и NEP-C (DPGSHNNNNHL на *C*-конце) (рис. 1, а), были использованы бактериальные экспрессионные системы, описанные ранее [31]. Чистота полученных препаратов, а также их склонность к агрегации были продемонстрированы электрофорезом в 15%-ном ДСН-ПААГ. На рис. 1, б показан анализ белковых растворов непосредственно после выделения (дорожки 1–3), а также после инкубации в течение 3 мес. при 4 °C (дорожки 4–6). Во всех случаях наблюдается накопление устойчивых к ДСН агрегатов, причем для NEP-C это накопление заметно выше, чем для других двух препаратов. Известно, что таким свойством – устойчивостью к ДСН – обладают агрегаты амилоидного типа. Также следует отметить, что заметной дегградации самих мономеров не наблюдается даже при длительной инкубации.

В настоящее время ведутся всесторонние исследования различных аспектов амилоидообразования как *in vitro*, так и *in vivo* с использованием широкого арсенала физико-химических методов, гено-инженерных, молекулярно-биологических, микробиологических и клеточных технологий [37, 38]. Одним из наиболее плодотворных подходов к изучению агрегации белков *in vitro* является атомно-силовая микроскопия, которая позволяет не только визуализировать объекты в нанометровом диапазоне, изучать морфологию и взаимопревращение наночастиц, но и получать количественные данные о ходе того или иного процесса (оценивать эффективность процесса, кинетику накопления продуктов, и т.д.) [39]. В связи с этим метод АСМ был выбран в качестве основного для изучения особенностей агрегации в исследуемой системе.

На рис. 2–4 приведены АСМ-изображения наночастиц, присутствующих в растворах NEP, NEP-N и NEP-C. Во всех случаях наблюдается гетерогенная смесь мономеров и более крупных частиц с различной морфологией. При этом в случае всех трех вариантов белка NEP наблюдаются заметные различия в скорости агрегации, в морфологии и размерах наночастиц, а также в соотношении образующихся продуктов.

Агрегация белка природной структуры NEP происходит относительно медленно с формированием различных по морфологии агрегатов, предположительно, по такому пути. В первые сутки преобладают момеры, а также малые олигомеры (рис. 2, а и б) высотой до ~10 нм (рис. 2, ж), которые в результате «слипания» формируют

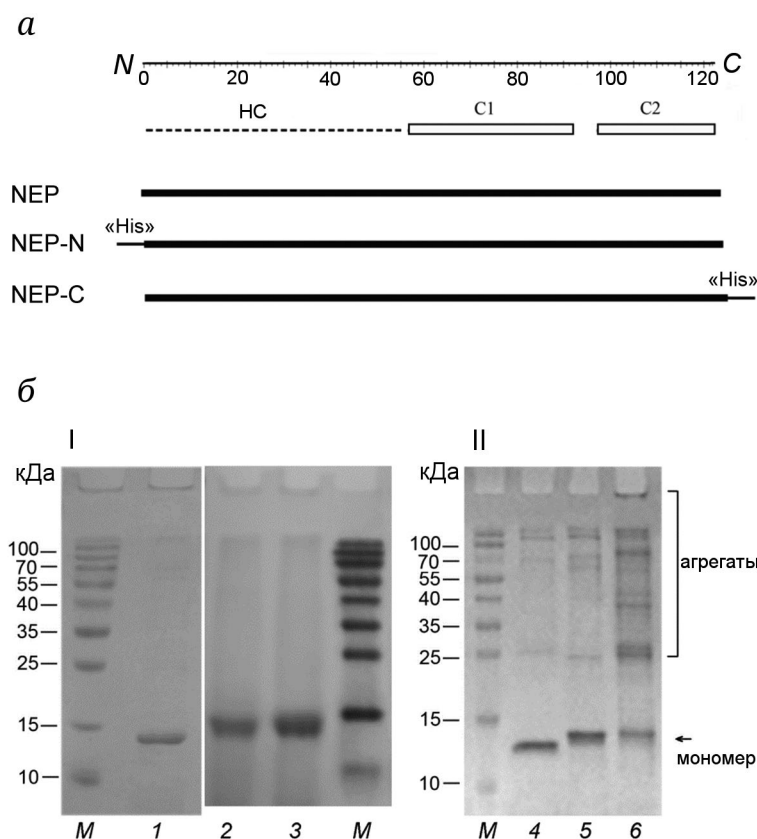


Рис. 1. Рекombинантные варианты белка NEP, исследованные в работе. *а* – Схематическое изображение. В структуре белков прямоугольниками отмечены α -спирали C1 и C2 (по данным рентгеноструктурного анализа С-концевого фрагмента NEP [24]), пунктирной линией – неструктурированная область (НС), надписями «His» – полигистидин-содержащие аффинные теги МННННННSGGT (для NEP-N) и DPGSHННННННL (для NEP-C). *б* – Электрофоретический анализ в 15%-ном ДСН-ПААГ свежевыделенных (I) и после выдерживания в течение 3 мес. (II) при 4 °С препаратов NEP (дорожки 1 и 4), NEP-N (дорожки 2 и 5) и NEP-C (дорожки 3 и 6); М – белковые маркеры молекулярной массы

агрегаты зернистой структуры (рис. 2, *в* и *г*). Последние могут принимать разнообразные формы: сферические (так называемые «фрамбоидные»; рис. 2, *в*), короткие вытянутые (фибриллярные) с неравномерной структурой (рис. 2, *в* и *г*), кольцевые (рис. 2, *г*). Помимо этого, постепенно в результате слияния зернистых структур образуются «гладкие» мицеллоподобные агрегаты диаметром от 15–40 нм (рис. 2, *б*) до 50–60 нм (рис. 2, *д*), а также жесткие фибриллярные структуры амиллоидного типа (рис. 2, *е*).

Значительная агрегация NEP-N наблюдается уже в первые сутки после выделения препарата (рис. 3, *а* и *б*). В смеси присутствует большое количество глобулярных частиц различного размера, высота которых варьирует от 1 нм, что соответствует мономерам белка, до 50 нм (рис. 3, *г*), что соответствует крупным агрегатам. Промежуточные по размерам частицы представляют собой различные мультимеры белка, причем часть из них образует зернистые структуры (конгломераты; рис. 3, *а*). Присутствует значительное количество вытянутых фибриллярных структур

(типа «бусы на нити» [40]), состоящих из слипшихся олигомеров с высотой «бусин» около 5,5–6 нм (рис. 3, *б*). Кроме того, в растворе накапливаются также жесткие равномерные палочкообразные фибриллы длиной до 1 мкм и высотой ~5 нм (рис. 3, *в*). Таким образом, наличие His₆-содержащего фрагмента на N-конце, по всей видимости, меняет кинетику агрегации NEP, но при этом формируются весьма сходные по структуре наночастицы: мультимеры, зернистые структуры, крупные сферические агрегаты, червеобразные и палочкообразные фибриллы.

Агрегация NEP-C протекает с заметно более высокой эффективностью, чем в случае других вариантов белка: в растворе уже в течение первых часов после выделения образуются в большом количестве крупные мицеллоподобные агрегаты (фракции с диаметром 10–30 нм; рис. 4, *а* и *д*), которые затем в течение 12–24 ч трансформируются в гибкие червеобразные фибриллы с морфологией «бусы на нити» длиной до 500 нм. При этом высота бусин (2,5–3,5 нм; рис. 4, *б*) меньше, чем в случае NEP-N (рис. 3, *б*).

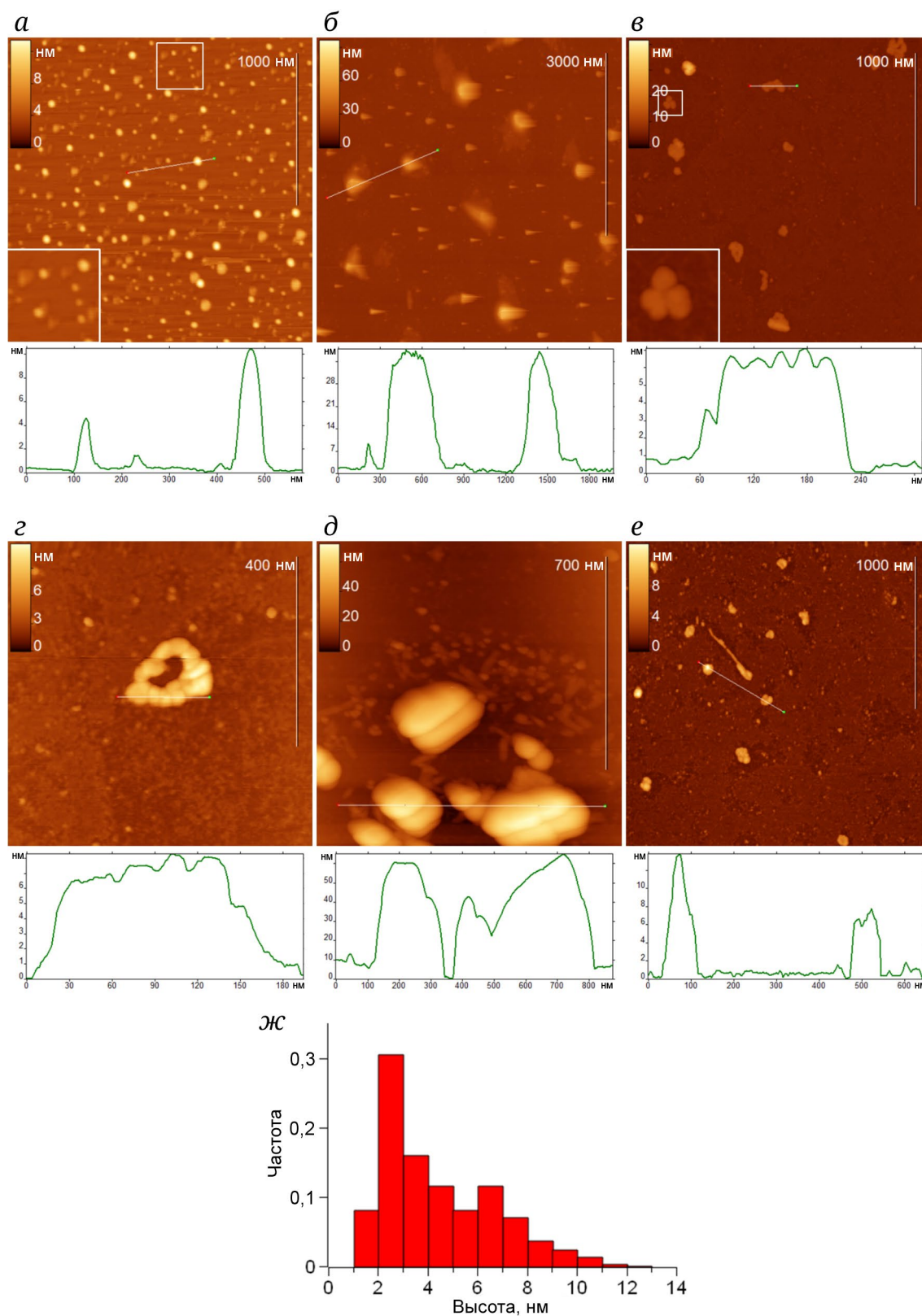


Рис. 2. АСМ-изображения природного белка NER и его агрегатов. *а* и *б* – Срок хранения препарата после выделения составляет несколько часов (т.е. исследованы в день выделения). *в–е* – Срок хранения препарата после выделения составляет 5 мес. *д* – Присутствует эффект двоения изображения. Снизу приведены профили поверхности вдоль линий на соответствующих АСМ-изображениях. Вставки на панелях (*а*) и (*в*) представляют собой увеличенные области поверхности, выделенные квадратом (размер вставок 300×300 и 150×150 нм² для (*а*) и (*в*) соответственно). *ж* – Гистограмма распределения высот объектов на панели (*а*)

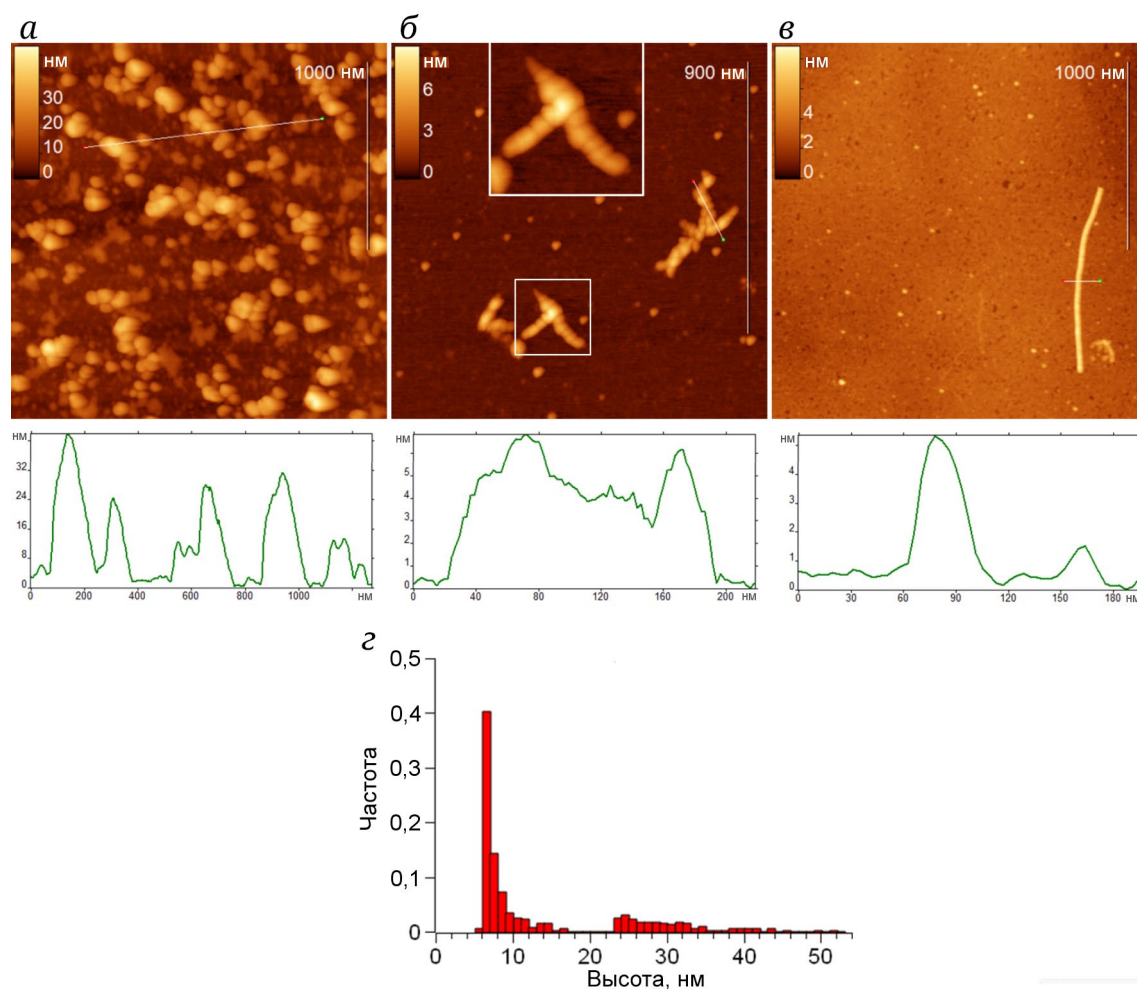


Рис. 3. АСМ-изображения белка NER-N и его агрегатов. Срок хранения препарата после выделения составлял 1 день (а и б) и 10 дней (в). Снизу приведены профили поверхности вдоль линий на соответствующих АСМ-изображениях. Вставка на панели (б) представляет собой увеличенную область поверхности, выделенную квадратом (размер вставки 250×250 нм²). г – Гистограмма распределения высот объектов на панели (а)

Многочисленные АСМ-изображения соединенных с фибриллами мицелл предполагают, что именно мицеллы генерируют фибриллы, причем наблюдаются также разветвленные структуры, т.е. когда несколько фибрилл соединены с одной мицеллой (рис. 4, б). В одной и той же смеси можно различить фибриллы с мицеллами, а также свободные фибриллы разной длины, что может свидетельствовать о протекании последовательных стадий образования фибрилл: зарождение короткого отростка, рост фибриллы, отдельно лежащие фибриллы (рис. 4, б и в). Подобные процессы были замечены и для других амилоидогенных белков, включая такие, как пептид бета-амилоид (Аβ), α-синуклеин, прион PrP мыши, транстиретин и др. [41–44]. На более поздних стадиях наблюдается присутствие палочкообразных агрегатов (рис. 4, г).

Полученные результаты схематично проиллюстрированы на рис. 5. Можно утверждать, что

на начальных этапах во всех случаях в растворах, помимо мономеров, наблюдаются малые олигомеры (от 2–3 до 10 нм). По мере дальнейшего выдерживания препаратов при 8–20 °С (период наблюдения составлял от 1 до 150 суток) накапливаются фракции более крупных агрегатов, имеющих сферическую форму, а также вытянутые фибриллярные структуры. Последние представлены по крайней мере двумя морфологическими типами: гибкие фибриллы (протофибриллы), а также более жесткие палочкообразные структуры (высотой ~5 нм), соответствующие по морфологии зрелым амилоидам [45, 46].

При анализе сходства и различий в характере агрегации исследуемых белков необходимо учитывать особенности структуры белка, а также возможные механизмы формирования различных агрегатов.

Особенности структуры белка NER. Согласно данным литературы, в молекуле NER различают

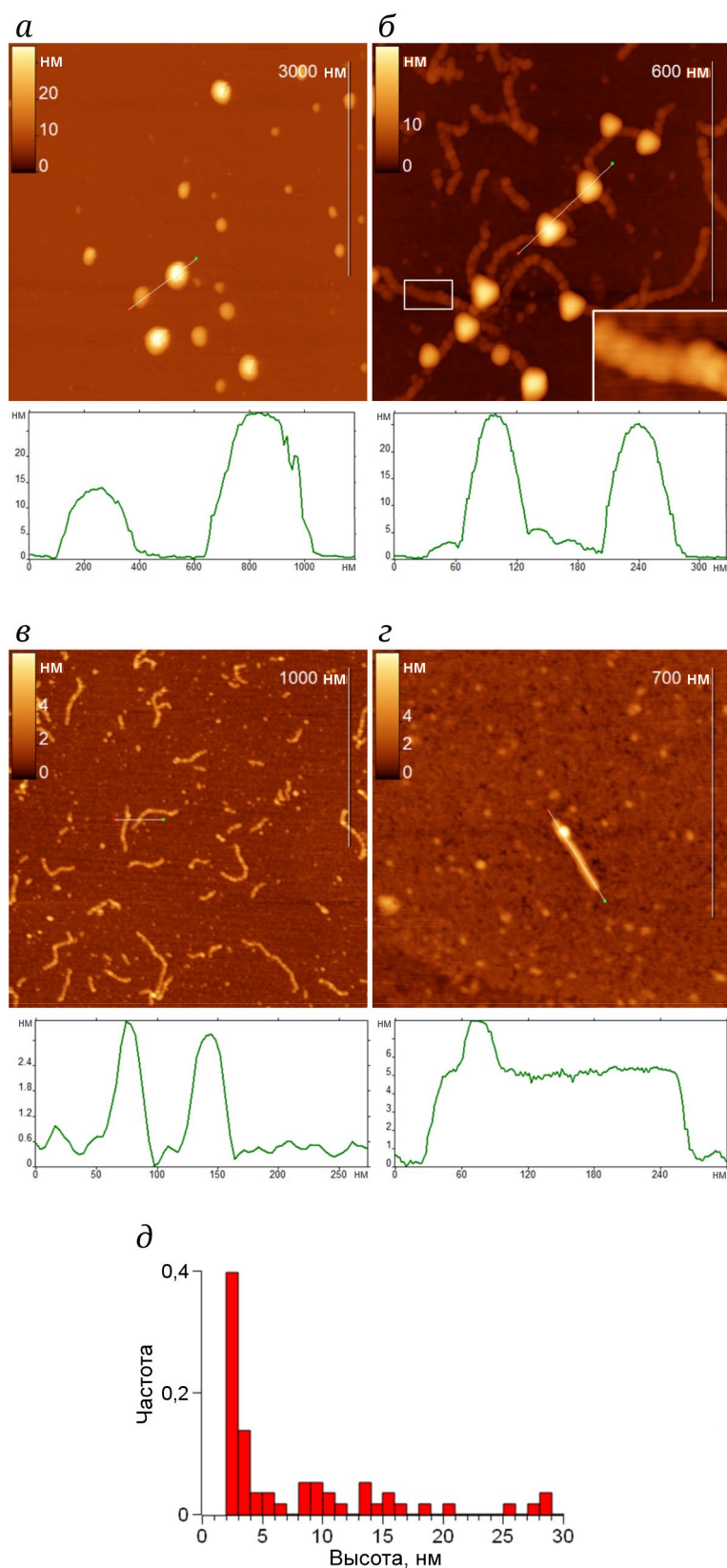


Рис. 4. АСМ-изображения белка NER-C и его агрегатов. Срок хранения препарата после выделения составлял 1 день (а), 8 дней (б и в) и 14 дней (з). Снизу приведены профили поверхности вдоль линий на соответствующих АСМ-изображениях. Вставка на панели (б) представляет собой увеличенную область поверхности, выделенную квадратом (размер вставки $65 \times 100 \text{ нм}^2$). д – Гистограмма распределения высот объектов на панели (а)

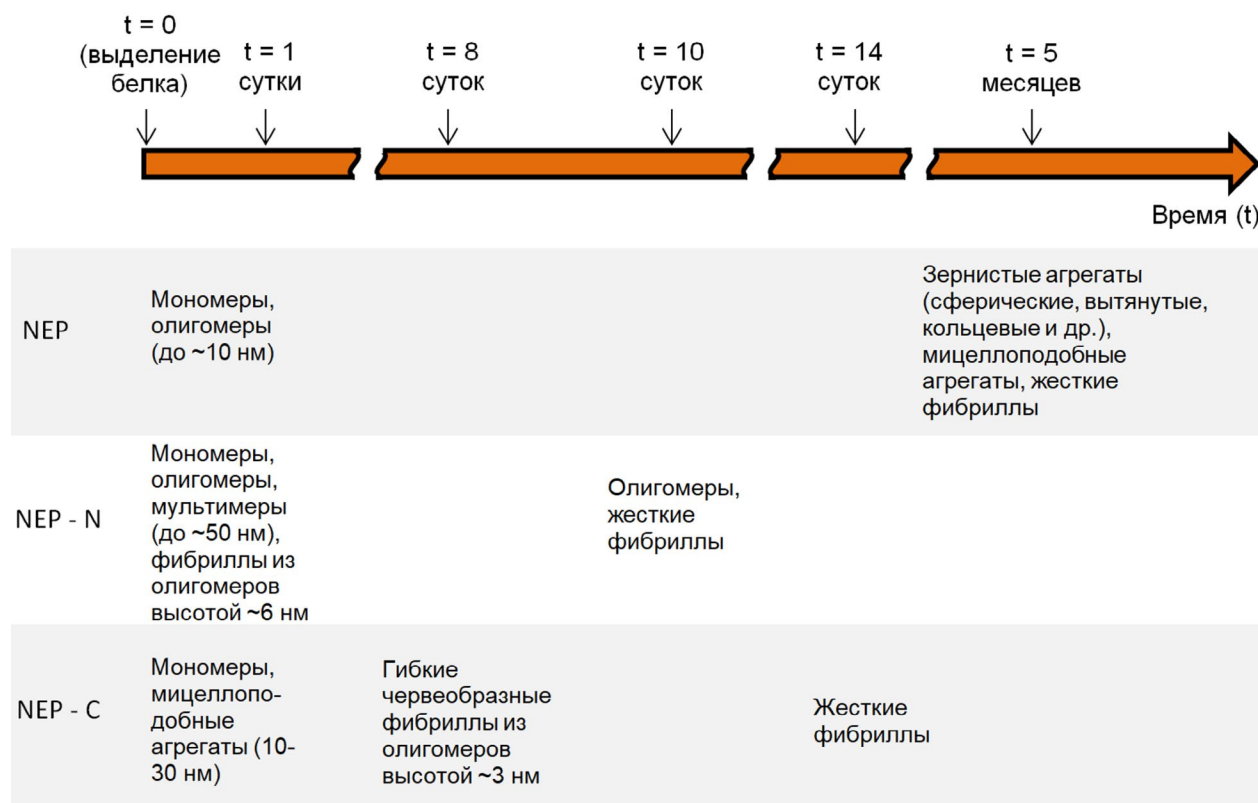


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая формирование различных агрегатов трех вариантов белка NEP с течением времени

протяженную неструктурированную N-концевую область и высокоструктурированную C-концевую домен, включающий амфифильную шпильку из двух антипараллельных α -спиралей: C1 (обогащена гидрофильными а.о.) и C2 (обогащена гидрофобными а.о.) [47] (рис. 1, а). Такая структура типична для большинства агрегирующих белков [38]. Кроме того, важным фактором образования амилоидных фибрилл является наличие так называемых амилоидогенных участков, обогащенных гидрофобными аминокислотными остатками [48]. Биоинформатический анализ последовательности NEP, проведенный нами ранее, показал, что наиболее амилоидогенной областью является C-концевая α -спираль, включающая высокогидрофобный участок 95–121 а.о. [7]. Таким образом, белок NEP обладает набором характерных структурных элементов, способствующих образованию структурированных агрегатов различной морфологии [49].

Для изучения влияния концевых His₆-содержащих фрагментов на стабильность структуры белковых мономеров и их агрегационные свойства было предпринято компьютерное моделирование методом МД поведения трех исследуемых в настоящей работе вариантов белка: NEP (121 а.о.), NEP-N (132 а.о.) и NEP-C (132 а.о.). Как упоминалось ранее, в литературе имеются данные рентгеноструктурного анализа только для C-концевого

домена белка NEP (PDB ID: 1PD3) [7], 63–116 а.о. Отсутствие таких данных для неупорядоченной N-концевой области не исключает возможности ее фолдинга при определенных условиях. Следует отметить, что ранее [6] нами уже были предприняты попытки смоделировать самосборку вариантов белка NEP. В частности, с использованием программы TASSER была реконструирована структура мономеров и продемонстрирована возможность образования коротких олигомеров-кластеров во всех случаях. При этом строгой закономерности в формировании кластеров не наблюдалось.

Современные достижения в области молекулярного моделирования, включая методы искусственного интеллекта, позволяют с гораздо большей степенью достоверности реконструировать структуру неупорядоченных областей. Примеры таких реконструкций имеются в литературе для ряда белков, таких как α -синуклеин, тау и TDP-43 [50, 51]. В данной работе мы применили подобные подходы для предсказания структуры недостающей части белка NEP с помощью программы AlphaFold2, которая решает задачи реконструкции пространственного фолдинга на основе первичной структуры [34, 52]. Предсказанная таким образом структура NEP представляет собой 4 попарно параллельных α -спирали, включающие остатки 8–21, 29–49, 55–86, 94–119 (рис. 6, а).

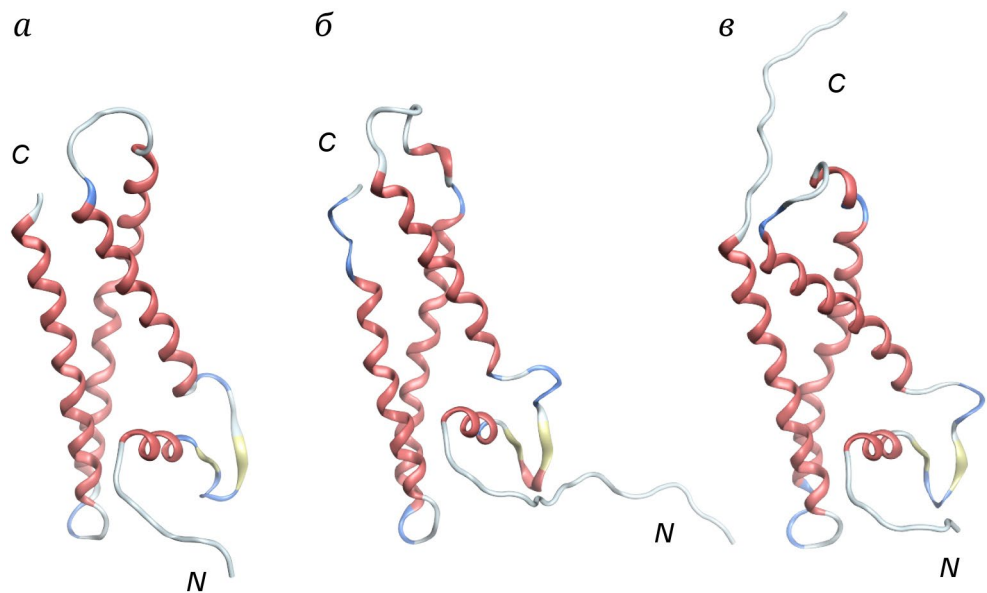


Рис. 6. Репрезентативные трехмерные структуры молекул NEP (а), NEP-N (б) и NEP-C (в), полученные в результате моделирования (200 нс) методом МД. Указано положение N- и C-концевых областей

Поскольку такая укладка противоречит экспериментальным данным, свидетельствующим о неупорядоченности структуры N-концевой части NEP, была предпринята попытка разрушить вторичную структуру в той части белка, которая соответствует неупорядоченному домену (1–63 а.о.). Для этого повышали температуру системы до 500 K, а затем проводили моделирование при этой температуре в течение 20 нс, зафиксировав координаты упорядоченной части (64–121 а.о.). Оказалось, что, в целом, α -спирали в области 1–63 а.о. обладают достаточно высокой стабильностью. Однако при нагреве наблюдается начало $\alpha \rightarrow \beta$ -перехода, характерного для амилоидных белков: между остатками 17–20 и 22–25 образовывалась β -складка [53].

Реконструированная модель природного белка NEP (рис. 6, а) была использована в качестве стартовой для получения структуры модифицированных форм NEP-N и NEP-C, несущих концевые

аффинные His₆-содержащие фрагменты. Результаты моделирования в течение 200 нс (рис. 6) демонстрируют, что все три изоформы белка достаточно стабильны, о чем свидетельствуют относительно низкие значения среднеквадратической флуктуации (RMSF) и среднеквадратического отклонения (RMSD) (табл. 1). При этом наибольшую подвижность демонстрировали аффинные теги. Так, значения RMSD были существенно выше для модифицированных форм NEP по сравнению с природной формой (рис. 6; табл. 1, строки 1–3). Это связано с присутствием неструктурированного аффинного тега, который вносит наибольший вклад в наблюдаемые различия. Следует отметить, что значения RMSD, подсчитанные для области 1–121 а.о., у NEP и NEP-N одинаковые, а у NEP-C даже ниже, чем у природной формы, что говорит о некотором стабилизирующем эффекте C-концевой His₆-последовательности на пространственную структуру белка NEP-C (табл. 1, строки 1, 4 и 5).

Таблица 1. Значения RMSD для структур вариантов белка NEP, полученных методом МД

Белок	Анализируемый фрагмент, а.о.	Число анализируемых конформаций	RMSD, Å; среднеквадратичное отклонение
NEP	1–121, весь белок	45	1,7
NEP-N	1–132, весь белок	83	3,3
NEP-C	1–132, весь белок	42	2,4
NEP-N	1–121, фрагмент	83	1,7
NEP-C	1–121, фрагмент	42	1,36

Данные МД подтвердили наличие β -шпильки в области 17–25 а.о. у всех трех изоформ (рис. 6). Присутствие *N*-концевого аффинного тега у N-NER в несколько раз повышало вероятность ее формирования.

Таким образом, результаты моделирования методом МД трех вариантов белка NER не выявили существенного влияния присоединенных концевых фрагментов на общую (основную) структуру белка, что соответствует полученным ранее данным по круговому дихроизму [31]. Однако наблюдаемые некоторые различия в подвижности этих фрагментов могут оказывать влияние на формирование надмолекулярных структур, в частности, на самосборку белка. О возможности агрегации по амилоидному типу всех трех белковых изоформ свидетельствует обнаруженная при моделировании тенденция к переходу α -спиралей в β -структуру в *N*-концевой части белка.

Возможные механизмы агрегации. Как уже упоминалось, наблюдаемые нами различия в эффективности агрегации и морфологии образующихся продуктов могут быть связаны с различными путями формирования последних. Рассмотрим возможные механизмы образования тех или иных агрегатов и потенциальное влияние концевых добавок в случае NER.

Мицеллоподобные агрегаты, известные также как «олигомеры», «мицеллы» и «амило-сфероиды», описаны для различных амилоидогенных белков [44, 54, 55]. Их образование связано с амфифильной природой белковых молекул [56]. В случае NER такой амфифильный домен локализован в *C*-концевой части (см. рис. 1, а), благодаря чему все варианты белка способны генерировать мицеллоподобные сферические агрегаты. Наибольшую эффективность в их образовании демонстрирует мутантный вариант NER-C. Это, вероятно, связано с влиянием полигистидин-содержащего фрагмента, присоединенного к *C*-концу, который может (локально) изменять геометрию молекулы или способствовать дополнительным межмолекулярным взаимодействиям.

Гибкие фибриллярные структуры, известные как протофибриллы (включающие варианты «бусы на нити» и «червеобразные фибриллы»), считаются предшественниками зрелых амилоидных фибрилл [47]. Механизм формирования этих протофибрилл до конца не ясен. Такие протофибриллы состоят из «бусин» диаметром от 2,5 до 6 нм. Предполагается, что они формируются путем агрегации мелких олигомеров [40, 57, 58], о чем также свидетельствуют близкие размеры олигомеров и «бусин». Недавно были представлены убедительные доказательства протекания такого процесса для белка ORF6 коронавируса SARS-CoV-2 [59].

Жесткие палочкообразные фибриллы высотой ~5 нм, обнаруживаемые в растворах всех трех белковых препаратов, могут соответствовать зрелым амилоидам [42, 46]. Как правило, образование таковых идет по механизму «нуклеации», который предполагает относительно медленное формирование в растворе олигомерного ядра-затравки (скорость-лимитирующая стадия) с последующей быстрой элонгацией фибриллы за счет последовательного присоединения мономеров из раствора [46, 60]. В случае белка NER-C, для которого характерна высокая эффективность агрегации, такие палочкообразные агрегаты появляются на более ранних этапах выдерживания белка, чем в случае других вариантов белка. А их общее содержание и линейные размеры становятся существенно больше. Это указывает на то, что образование амилоидов в этом случае может идти и по альтернативному пути, когда в качестве интермедиатов выступают сферические (мицеллоподобные) агрегаты и/или образуемые ими протофибриллы [46, 49, 60]. Так, высокая концентрация белка в крупных мицеллоподобных агрегатах может способствовать быстрому образованию первичных амилоидных ядер (ускоренная нуклеация) с последующей ускоренной элонгацией фибрилл как за счет утилизации материала самих мицелл, так и за счет присоединения молекул белка из раствора [61]. С другой стороны, образующиеся в большом количестве протофибриллы могут трансформироваться в зрелые амилоиды либо за счет конформационной перестройки белковых молекул и постепенным уплотнением (компактизацией) фибрилл [42, 48], либо в результате закручивания двух и более протофибрилл друг относительно друга [46]. В пользу этого говорит то, что высота (диаметр – ~5 нм) палочкообразных агрегатов (зрелых амилоидов) почти в 2 раза превышает диаметр червеобразных протофибрилл (~2,5–3,5 нм; рис. 4, в и г).

Присоединенный к *C*-концу His₆-содержащий фрагмент в наибольшей степени влияет на кинетику агрегации и морфологию образующихся наночастиц, что связано с тем, что *C*-концевой домен белка, по-видимому, является ключевым для формирования агрегатов. При этом усиление агрегационных свойств может происходить как за счет локального изменения конформации белка, так и в результате появления дополнительных контактов между белковыми молекулами. В то же время важную роль при образовании высокоструктурированных агрегатов может играть общая геометрия белковой молекулы, а именно соотношение размеров и взаимное расположение доменов (гидрофильных/гидрофобных, структурированных/неструктурированных и др.). На это косвенно указывают некоторые эффекты,

наблюдаемые для ряда известных амилоидогенных белков. В частности, вариант бета-амилоидного пептида A β -42, имеющий на С-конце два дополнительных аминокислотных остатка, агрегирует с большей скоростью, чем вариант A β -40 [62]. Более того, агрегационные свойства A β -42 еще больше усиливаются в результате дополнительного присоединения к С-концу фрагмента, содержащего His₆ [63]. Важность геометрических факторов подтверждается также выявленной корреляцией между числом повторяющихся остатков глутамина в составе некоторых ассоциированных с нейродегенеративными заболеваниями белков (хантингтина, атаксинов и др.) и их агрегационными свойствами [64].

Немногочисленные и достаточно противоречивые данные о влиянии позиции и размеров полигистидиновых тегов в составе некоторых рекомбинантных белков на их склонность к самоассоциации также могут свидетельствовать о роли именно соотношения размеров определенных доменов, участвующих в самосборке. В частности, в работе Ayoub et al. [30] для двух мембранных белков AdiC и протеородопсина было показано, что присоединение полигистидинового тега способствует олигомеризации белков, причем эта тенденция усиливается с увеличением размера присоединенного фрагмента. Аналогичные эффекты наблюдались и для капсидного белка вируса ящура [29], а также белка аквапорина AqpZ [28]. Причем в этих двух последних случаях положение полигистидин-содержащего фрагмента (на N- или С-конце) не оказывало значительного влияния на эффективность самосборки белков. Однако имеются работы, где склонность к агрегации зависит от положения тега. Например, в случае рекомбинантных вариантов аденилосукцинат-синтетазы *Helicobacter pylori* [24], пневмококкового поверхностного белка SP0845 [27] и фрагмента мерозойтного белка MSP1 малярийного плазмодия [26] N-концевое положение тега (в отличие от С-концевого) способствует агрегации. В одной из недавних работ, посвященной детальному исследованию влияния позиции и размеров различных встроенных участков на агрегацию и другие свойства ряда белков (sfGFP, mCherry и ADH), показано, что такое влияние чрезвычайно индивидуально и не позволяет вывести четкие закономерности [25]. Тем не менее все эти данные

не противоречат высказанной в настоящей работе гипотезе о том, что изменение геометрических параметров (линейный размер, объем) белковых доменов, вызванное встраиванием дополнительных фрагментов, приводит к тем или иным эффектам. Исследование особенностей структуры конкретного белка позволит лучше понять, как можно целенаправленно воздействовать на его свойства, включая агрегационные.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящей работе было впервые продемонстрировано влияние His₆-содержащих аффинных модулей (тегов) на агрегацию вирусного белка NEP в зависимости от их локализации на N- или С-конце. Установлено, что белок, содержащий такой модуль на С-конце, вблизи амилоидогенной области NEP, обнаруживает более высокую склонность к агрегации, в том числе амилоидного типа, что делает этот вариант белка очень удобной моделью для изучения различных аспектов амилоидообразования. Высказаны также гипотезы о возможном влиянии дополнительно присоединяемых участков на эффективность агрегации и морфологию образующихся агрегатов.

Вклад авторов. О.Н. Королева и В.Л. Друца – концепция и руководство работой; Н.В. Кузьмина и Е.В. Дубровин – проведение экспериментов; А.П. Толстова – моделирование методом молекулярной динамики; все авторы – обсуждение результатов исследования; О.Н. Королева, Е.В. Дубровин, А.П. Толстова – написание текста; В.Л. Друца – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2022-264) (уникальная научная установка «Сканирующий ион-проводящий микроскоп с конфокальным модулем», регистрационный номер 2512530).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gao, S., Wang, S., Cao, S., Sun, L., Li, J., Bi, Y., et al. (2014) Characteristics of nucleocytoplasmic transport of H1N1 influenza A virus nuclear export protein, *J. Virol.*, **88**, 7455-7463, <https://doi.org/10.1128/JVI.00257-14>.
2. Patel, H., and Kukol, A. (2019) Prediction of ligands to universally conserved binding sites of the influenza A virus nuclear export protein, *Virology*, **537**, 97-103, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.08.013>.

3. Gong, W., He, X., Huang, K., Zhang, Y., Li, C., Yang, Y., Zou, Z., and Jin, M. (2021) Interaction of NEP with G protein pathway suppressor 2 facilitates influenza A virus replication by weakening the inhibition of GPS2 to RNA synthesis and ribonucleoprotein assembly, *J. Virol.*, **95**, JVI.00008-21, <https://doi.org/10.1128/jvi.00008-21>.
4. Zhang, B., Liu, M., Huang, J., Zeng, Q., Zhu, Q., Xu, S., and Chen, H. (2022) H1N1 influenza A virus protein NS2 inhibits innate immune response by targeting IRF7, *Viruses*, **14**, 2411, <https://doi.org/10.3390/v14112411>.
5. Teo, Q. W., Wang, Y., Lv, H., Mao, K. J., Tan, T. J. C., Huan, Y. W., Rivera-Cardona, J., Shao, E. K., Choi, D., Dargani, Z. T., Brooke, C. B., and Wu, N. C. (2024) Deep mutational scanning of influenza A virus NEP reveals pleiotropic mutations in its N-terminal domain, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2024.05.16.594574>.
6. Golovko, A. O., Koroleva, O. N., Tolstova, A. P., Kuz'mina, N. V., Dubrovin, E. V., and Drutsa, V. L. (2018) Aggregation of influenza A virus nuclear export protein, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1411-1421, <https://doi.org/10.1134/S0006297918110111>.
7. Koroleva, O. N., Kuzmina, N. V., Dubrovin, E. V., and Drutsa, V. L. (2024) Atomic force microscopy of spherical intermediates on the pathway to fibril formation of influenza A virus nuclear export protein, *Microsc. Res. Technique*, **87**, 1131-1145, <https://doi.org/10.1002/jemt.24499>.
8. Gorai, T., Goto, H., Noda, T., Watanabe, T., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Takano, R., Neumann, G., Watanabe, S., and Kawaoka, Y. (2012) F₁F₀-ATPase, F-type proton-translocating ATPase, at the plasma membrane is critical for efficient influenza virus budding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 4615-4620, <https://doi.org/10.1073/pnas.1114728109>.
9. Willbold, D., Strodel, B., Schröder, G. F., Hoyer, W., and Heise, H. (2021) Amyloid-type protein aggregation and prion-like properties of amyloids, *Chem. Rev.*, **121**, 8285-8307, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00196>.
10. Hassan, M. N., Nabi, F., Khan, A. N., Hussain, M., Siddiqui, W. A., Uversky, V. N., and Khan, R. H. (2022) The amyloid state of proteins: a boon or bane? *Int. J. Biol. Macromol.*, **200**, 593-617, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.115>.
11. Hammarström, P., and Nyström, S. (2023) Viruses and amyloids – a vicious liaison, *Prion*, **17**, 82-104, <https://doi.org/10.1080/19336896.2023.2194212>.
12. Gondelaud, F., Lozach, P.-Y., and Longhi, S. (2023) Viral amyloids: new opportunities for antiviral therapeutic strategies, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **83**, 102706, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102706>.
13. Geng, H., Subramanian, S., Wu, L., Bu, H.-F., Wang, X., Du, C., De Plaen, I. G., and Tan, X.-D. (2021) SARS-CoV-2 ORF8 forms intracellular aggregates and inhibits IFN γ -induced antiviral gene expression in human lung epithelial cells, *Front. Immunol.*, **12**, 679482, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.679482>.
14. Charnley, M., Islam, S., Bindra, G. K., Engwirda, J., Ratcliffe, J., Zhou, J., Mezzenga, R., Hulett, M. D., Han, K., Berryman, J. T., and Reynolds, N. P. (2022) Neurotoxic amyloidogenic peptides in the proteome of SARS-CoV2: potential implications for neurological symptoms in COVID-19, *Nat. Commun.*, **13**, 3387, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30932-1>.
15. Bhardwaj, T., Gadhave, K., Kapuganti, S. K., Kumar, P., Brotzakis, Z. F., Saumya, K. U., Nayak, N., Kumar, A., Joshi, R., Mukherjee, B., Bhardwaj, A., Thakur, K. G., Garg, N., Vendruscolo, M., and Giri, R. (2023) Amyloidogenic proteins in the SARS-CoV and SARS-CoV-2 proteomes, *Nat. Commun.*, **14**, 945, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36234-4>.
16. Morozova, O. V., Manuvera, V. A., Barinov, N. A., Subcheva, E. N., Laktyushkin, V. S., Ivanov, D. A., Lazarev, V. N., and Klinov, D. V. (2024) Self-assembling amyloid-like nanostructures from SARS-CoV-2 S1, S2, RBD and N recombinant proteins, *Arch. Biochem. Biophys.*, **752**, 109843, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2023.109843>.
17. Vidic, J., Richard, C.-A., Péchoux, C., Da Costa, B., Bertho, N., Mazerat, S., Delmas, B., and Chevalier, C. (2016) Amyloid assemblies of influenza A virus PB1-F2 protein damage membrane and induce cytotoxicity, *J. Biol. Chem.*, **291**, 739-751, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652917>.
18. Kikkert, M. (2020) Innate immune evasion by human respiratory RNA viruses, *J. Innate Immun.*, **12**, 4-20, <https://doi.org/10.1159/000503030>.
19. Shaldzhyan, A. A., Zabrodskaya, Y. A., Baranovskaya, I. L., Sergeeva, M. V., Gorshkov, A. N., Savin, I. I., Shishlyannikov, S. M., Ramsay, E. S., Protasov, A. V., Kukhareva, A. P., and Egorov, V. V. (2021) Old dog, new tricks: influenza A virus NS1 and *in vitro* fibrillogenesis, *Biochimie*, **190**, 50-56, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.07.005>.
20. Cheung, P.-H. H., Lee, T.-W. T., Kew, C., Chen, H., Yuen, K.-Y., Chan, C.-P., and Jin, D.-Y. (2020) Virus subtype-specific suppression of MAVS aggregation and activation by PB1-F2 protein of influenza A (H7N9) virus, *PLOS Pathog.*, **16**, e1008611, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008611>.
21. Léger, P., Nachman, E., Richter, K., Tamietti, C., Koch, J., Burk, R., Kummer, S., Xin, Q., Stanifer, M., Bouloy, M., Boulant, S., Kräusslich, H.-G., Montagutelli, X., Flamand, M., Nussbaum-Krammer, C., and Lozach, P.-Y. (2020) NSs amyloid formation is associated with the virulence of Rift Valley fever virus in mice, *Nat. Commun.*, **11**, 3281, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17101-y>.

22. Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R., and Stüber, D. (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent, *Nat. Biotechnol.*, **6**, 1321-1325, <https://doi.org/10.1038/nbt1188-1321>.
23. Carson, M., Johnson, D. H., McDonald, H., Brouillette, C., and DeLucas, L. J. (2007) His-tag impact on structure, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **63**, 295-301, <https://doi.org/10.1107/S0907444906052024>.
24. Mišković, M. Z., Wojtyś, M., Winiewska-Szajewska, M., Wielgus-Kutrowska, B., Matković, M., Domazet Jurašin, D., Štefanić, Z., Bzowska, A., and Lešić Ašler, I. (2024) Location is everything: influence of his-tag fusion site on properties of adenylosuccinate synthetase from *Helicobacter pylori*, *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 7613, <https://doi.org/10.3390/ijms25147613>.
25. Karan, R., Renn, D., Allers, T., and Rueping, M. (2024) A systematic analysis of affinity tags in the haloarchaeal expression system, *Haloferax volcanii* for protein purification, *Front. Microbiol.*, **15**, 1403623, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1403623>.
26. Khan, F., Legler, P. M., Mease, R. M., Duncan, E. H., Bergmann-Leitner, E. S., and Angov, E. (2012) Histidine affinity tags affect MSP1₄₂ structural stability and immunodominance in mice, *Biotechnol. J.*, **7**, 133-147, <https://doi.org/10.1002/biot.201100331>.
27. Singh, M., Sori, H., Ahuja, R., Meena, J., Sehgal, D., and Panda, A. K. (2020) Effect of N-terminal poly histidine-tag on immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* surface protein SP0845, *Int. J. Biol. Macromol.*, **163**, 1240-1248, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.056>.
28. Mohanty, A. K., and Wiener, M. C. (2004) Membrane protein expression and production: effects of polyhistidine tag length and position, *Protein Express. Purif.*, **33**, 311-325, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.10.010>.
29. Sánchez, J. M., Carratalá, J. V., Serna, N., Unzueta, U., Nolan, V., Sánchez-Chardi, A., Voltà-Durán, E., López-Laguna, H., Ferrer-Miralles, N., Villaverde, A., and Vazquez, E. (2022) The poly-histidine Tag_{H6} mediates structural and functional properties of disintegrating, protein-releasing inclusion bodies, *Pharmaceutics*, **14**, 602, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030602>.
30. Ayoub, N., Roth, P., Ucurum, Z., Fotiadis, D., and Hirschi, S. (2023) Structural and biochemical insights into His-tag-induced higher-order oligomerization of membrane proteins by cryo-EM and size exclusion chromatography, *J. Struct. Biol.*, **215**, 107924, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2022.107924>.
31. Golovko, A. O., Koroleva, O. N., and Drutsa, V. L. (2017) Heterologous expression and isolation of influenza A virus nuclear export protein NEP, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1529-1537, <https://doi.org/10.1134/S0006297917120124>.
32. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
33. Yaminsky, I., Akhmetova, A., and Meshkov, G. (2018) Femtoscan online software and visualization of nano-objects in high-resolution microscopy, *Nanoindustry*, **11**, 414-416, <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2018.11.6.414.416>.
34. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, **596**, 583-589, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
35. Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., and Lindahl, E. (2015) GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX*, **1-2**, 19-25, <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
36. Huang, J., and MacKerell, A. D. (2013) CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data, *J. Comput. Chem.*, **34**, 2135-2145, <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>.
37. Hamrang, Z., Rattray, N. J. W., and Pluen, A. (2013) Proteins behaving badly: emerging technologies in profiling biopharmaceutical aggregation, *Trends Biotechnol.*, **31**, 448-458, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.05.004>.
38. Wang, W., and Roberts, C. J. (2018) Protein aggregation – mechanisms, detection, and control, *Int. J. Pharmaceut.*, **550**, 251-268, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.043>.
39. Müller, D. J., and Dufrêne, Y. F. (2008) Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology, *Nat. Nanotechnol.*, **3**, 261-269, <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.100>.
40. Walsh, D. M., Hartley, D. M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Selkoe, D. J., and Teplow, D. B. (1999) Amyloid β -protein fibrillogenesis: structure and biological activity of protofibrillar intermediates, *J. Biol. Chem.*, **274**, 25945-25952, <https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25945>.
41. Goldsbury, C., Frey, P., Olivieri, V., Aeby, U., and Müller, S. A. (2005) Multiple assembly pathways underlie amyloid- β fibril polymorphisms, *J. Mol. Biol.*, **352**, 282-298, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.029>.
42. Brown, J. W. P., Meisl, G., J. Knowles, T. P., K. Buell, A., M. Dobson, C., and Galvagnion, C. (2018) Kinetic barriers to α -synuclein protofilament formation and conversion into mature fibrils, *Chem. Commun.*, **54**, 7854-7857, <https://doi.org/10.1039/C8CC03002B>.

43. Singh, J., Sabareesan, A. T., Mathew, M. K., and Udgaonkar, J. B. (2012) Development of the structural core and of conformational heterogeneity during the conversion of oligomers of the mouse prion protein to worm-like amyloid fibrils, *J. Mol. Biol.*, **423**, 217-231, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.06.040>.
44. Diociaiuti, M., Bonanni, R., Cariati, I., Frank, C., and D'Arcangelo, G. (2021) Amyloid prefibrillar oligomers: the surprising commonalities in their structure and activity, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6435, <https://doi.org/10.3390/ijms22126435>.
45. Cao, Y., Adamcik, J., Diener, M., Kumita, J. R., and Mezzenga, R. (2021) Different folding states from the same protein sequence determine reversible vs irreversible amyloid fate, *J. Am. Chem. Soc.*, **143**, 11473-11481, <https://doi.org/10.1021/jacs.1c03392>.
46. Taylor, A. I. P., and Staniforth, R. A. (2022) General principles underpinning amyloid structure, *Front. Neurosci.*, **16**, 878869, <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.878869>.
47. Akarsu, H., Burmeister, W. P., Petosa, C., Petit, I., Müller, C. W., Ruigrok, R. W. H., and Baudin, F. (2003) Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2), *EMBO J.*, **22**, 4646-4655, <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg449>.
48. Ulamec, S. M., Brockwell, D. J., and Radford, S. E. (2020) Looking beyond the core: the role of flanking regions in the aggregation of amyloidogenic peptides and proteins, *Front. Neurosci.*, **14**, 611285, <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.611285>.
49. Morel, B., and Conejero-Lara, F. (2019) Early mechanisms of amyloid fibril nucleation in model and disease-related proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1867**, 140264, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140264>.
50. Pietrek, L. M., Stelzl, L. S., and Hummer, G. (2023) Structural ensembles of disordered proteins from hierarchical chain growth and simulation, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **78**, 102501, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102501>.
51. Pietrek, L. M., Stelzl, L. S., and Hummer, G. (2020) Hierarchical ensembles of intrinsically disordered proteins at atomic resolution in molecular dynamics simulations, *J. Chem. Theory Comput.*, **16**, 725-737, <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00809>.
52. Alderson, T. R., Pritišanac, I., Kolarić, Đ., Moses, A. M., and Forman-Kay, J. D. (2023) Systematic identification of conditionally folded intrinsically disordered regions by AlphaFold2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **120**, e2304302120, <https://doi.org/10.1073/pnas.2304302120>.
53. Ding, F., Borreguero, J. M., Buldyrey, S. V., Stanley, H. E., and Dokholyan, N. V. (2003) Mechanism for the α -helix to β -hairpin transition, *Proteins Struct. Funct. Bioinform.*, **53**, 220-228, <https://doi.org/10.1002/prot.10468>.
54. Matsumura, S., Shinoda, K., Yamada, M., Yokojima, S., Inoue, M., Ohnishi, T., Shimada, T., Kikuchi, K., Masui, D., Hashimoto, S., Sato, M., Ito, A., Akioka, M., Takagi, S., Nakamura, Y., Nemoto, K., Hasegawa, Y., Takamoto, H., Inoue, H., et al. (2011) Two distinct amyloid β -protein (A β) assembly pathways leading to oligomers and fibrils identified by combined fluorescence correlation spectroscopy, morphology, and toxicity analyses, *J. Biol. Chem.*, **286**, 11555-11562, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.181313>.
55. Ahmed, I., and Jones, E. M. (2019) Importance of micelle-like multimers in the atypical aggregation kinetics of N-terminal serum amyloid A peptides, *FEBS Lett.*, **593**, 518-526, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13334>.
56. Lombardo, D., Kiselev, M. A., Magazù, S., and Calandra, P. (2015) Amphiphiles self-assembly: basic concepts and future perspectives of supramolecular approaches, *Adv. Condensed Matter Physics*, **2015**, e151683, <https://doi.org/10.1155/2015/151683>.
57. Modler, A., Fabian, H., Sokolowski, F., Lutsch, G., Gast, K., and Damaschun, G. (2004) Polymerization of proteins into amyloid protofibrils shares common critical oligomeric states but differs in the mechanisms of their formation, *Amyloid*, **11**, 215-231, <https://doi.org/10.1080/13506120400014831>.
58. Hill, S. E., Robinson, J., Matthews, G., and Muschol, M. (2009) Amyloid protofibrils of lysozyme nucleate and grow via oligomer fusion, *Biophys. J.*, **96**, 3781-3790, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.01.044>.
59. Nishide, G., Lim, K., Tamura, M., Kobayashi, A., Zhao, Q., Hazawa, M., Ando, T., Nishida, N., and Wong, R. W. (2023) Nanoscopic elucidation of spontaneous self-assembly of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) open reading frame 6 (ORF6) protein, *J. Phys. Chem. Lett.*, **14**, 8385-8396, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.3c01440>.
60. Lee, C.-T., and Terentjev, E. M. (2017) Mechanisms and rates of nucleation of amyloid fibrils, *J. Chem. Physics*, **147**, 105103, <https://doi.org/10.1063/1.4995255>.
61. Sabaté, R., and Estelrich, J. (2005) Evidence of the existence of micelles in the fibrillogenesis of β -amyloid peptide, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 11027-11032, <https://doi.org/10.1021/jp050716m>.
62. Selkoe, D. J., and Podlisny, M. B. (2002) Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease, *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.*, **3**, 67-99, <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.3.022502.103022>.

63. Jia, L., Wang, W., Sang, J., Wei, W., Zhao, W., Lu, F., and Liu, F. (2019) Amyloidogenicity and cytotoxicity of a recombinant C-terminal His₆-tagged A β ₁₋₄₂, *ACS Chem. Neurosci.*, **10**, 1251-1262, <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00333>.
64. Adegbuyiro, A., Sedighi, F., Pilkington, A. W., Groover, S., and Legleiter, J. (2017) Proteins containing expanded polyglutamine tracts and neurodegenerative disease, *Biochemistry*, **56**, 1199-1217, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00936>.

THE EFFECT OF C- AND N-TERMINAL POLYHISTIDIN TAG ON AGGREGATION OF INFLUENZA A VIRUS NUCLEAR EXPORT PROTEIN

O. N. Koroleva¹, N. V. Kuzmina², A. P. Tolstova³, E. V. Dubrovin^{4,5*}, and V. L. Drutsa⁶

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

² Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

³ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

⁴ Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: dubrovin@polly.phys.msu.ru

⁵ National University of Science and Technology MISIS, 119049, Moscow, Russia

⁶ A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

The nuclear export protein (NEP) of the influenza A virus, being one of the key components of the virus life cycle, is a promising model for studying the characteristics of formation of amyloids by viral proteins. Using atomic force microscopy, comparative studies of the aggregation properties of recombinant NEP variants, including the protein of natural structure, as well as modified variants with N- and C-terminal affinity His₆-tags, were carried out. All protein variants under physiological conditions are capable of forming aggregates of various morphologies: micelle-like nanoparticles, flexible protofibrils, rigid amyloid fibrils, etc. The His₆-tag attached to the C-terminus has the greatest effect on the aggregation kinetics and morphology of nanoparticles, which indicates the important role of the C-terminal domain in the process of protein self-assembly. Molecular dynamics simulation hasn't revealed the substantial influence of His₆-containing fragments on the protein structure but demonstrated some variations in the mobility of these fragments that may explain the observed differences in the aggregation kinetics of different NEP variants. Hypothetical mechanisms for the formation and interconversion of various aggregates are considered.

Keywords: influenza A virus, nuclear export protein NEP, protein aggregation, poly(His)-tags, atomic force microscopy

РОЛЬ НЕКАНОНИЧЕСКИХ СТЭКИНГ-ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ ОСНОВАНИЙ РНК В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ РИБОСОМЫ

© 2024 В.Г. Метелев¹, Е.Ф. Баулин^{2#}, А.А. Богданов^{1,3,4*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва, Россия

² Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Московская область, Россия

³ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: bogdanov@belozersky.msu.ru

⁴ ФГБУН Государственный научный центр РФ Институт биоорганической химии
имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 21.10.2024

После доработки 21.10.2024

Принята к публикации 04.11.2024

Идентификация и анализ повторяющихся элементов (мотивов) в макромолекулах ДНК, РНК и белков является важным этапом изучения структуры и функций этих биополимеров. В настоящей работе исследовалась функциональная роль NA-BSE (от англ. non-adjacent base-stacking element), широко распространённого мотива в третичной структуре разнообразных РНК, в РНК-РНК-взаимодействиях на различных этапах работы рибосомы в ходе трансляции генетической информации. Описаны мотивы этого типа, обратимо формирующиеся при декодировании мРНК, перемещении субъединиц рибосом друг относительно друга, продвижении мРНК и тРНК по рибосоме в процессе транслкации. Отдельно рассмотрено EF-G-зависимое образование NA-BSE с участием нуклеотидных остатков 5S рРНК и 23S рРНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стэкинг-взаимодействия, третичная структура РНК, рибосомные РНК, A-, P-, E-сайт тРНК, РНК-мотивы.

DOI: 10.31857/S0320972524120086 EDN: IFCGHM

ВВЕДЕНИЕ

Рибонуклеиновые кислоты (РНК) выполняют в клетке разнообразные функции: матричные, регуляторные и ферментативные. Функционируя преимущественно в виде комплексов с белками, РНК составляют структурную основу этих комплексов, проявляя при этом ярко выраженную способность к обратимым конформационным превращениям [1, 2]. Ранее в ходе анализа межплоскостных (стэкинг) взаимодействий гетероциклических оснований нуклеотидов, не являющихся соседями в нуклеотидной последовательности самых разнообразных РНК [3, 4], мы показали,

что с их помощью образуется мотив, широко распространённый в третичной структуре РНК. Он был обозначен как NA-BSE (от англ. non-adjacent base-stacking element). Роль этих элементов в образовании и поддержании 3D структур различных РНК была нами недавно достаточно подробно охарактеризована [4]. В настоящей работе рассмотрена роль NA-BSE в функционировании РНК. При этом объектом нашего анализа была рибосомная РНК (рРНК) в составе рибосом (т.е. в комплексе с рибосомными белками, тРНК, мРНК и факторами трансляции), поскольку объём информации о пространственной структуре этих важнейших макромолекулярных комплексов в различных

Принятые сокращения: н.о. – нуклеотидные остатки; BIE – base-intercalated element; NA-BSE – non-adjacent base-stacking element; PDB – Protein Data Bank, банк данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот.

Текущий адрес – Институт молекулярной и клеточной биологии в Варшаве, 02-109 Варшава, Польша.

* Адресат для корреспонденции.

функциональных состояниях в банках структурных данных (прежде всего в RCSB PDB) существенно превышает таковой для всех остальных РНК вместе взятых. Важно также, что доля нуклеотидных остатков (н.о.), образующих NA-BSE, в самих рРНК достаточно велика и приближается к 20% [3, 4].

Конформационные превращения рибосом, происходящие в ходе биосинтеза белка, можно подразделить на две группы: глобальные и локальные. В первом случае малая и большая субъединицы рибосомы на каждом шаге синтеза полипептидной цепи белка совершают обратимое перемещение друг относительно друга. Кроме того, при этом происходит обратимое смещение друг относительно друга крупных доменов, из которых состоят субъединицы рибосомы [5, 6]. Эти глобальные перемещения крупных сегментов рибосомы сопровождаются обратимыми локальными специфическими перестройками как контактов между н.о. в самих рРНК, так и их контактов с тРНК и мРНК. В настоящей работе рассматривается участие NA-BSE в этих структурных превращениях. Предполагается, что подобные структурные превращения лежат в основе механизмов передачи функциональных сигналов как в самой работающей рибосоме, так и в РНК других классов [7, 8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Как и в нашей предыдущей работе [4], мы определили NA-BSE как максимальный набор из k рибонуклеотидов N_1, \dots, N_k , такой, что для каждого $i < k$ основания несмежных остатков N_i и N_{i+1} образуют неканоническое стэкинг-взаимодействие оснований. Для построения набора данных NA-BSE мы использовали данные по структуре рибосом, внесённые в Protein Data Bank (PDB) [9], полученные с разрешением лучше 3,0 Å. Для этого мы отобрали записи, помеченные ключевым словом «LSU» (Large SUBunit) в классах эквивалентности репрезентативного набора RNA3DHub (версия 3.347, разрешение до 3,0 Å) [10]. Выбранный набор включал 677 записей PDB. Для аннотирования NA-BSE использовалась программа DSSR (версия 2.0 [11]), элементы вторичной структуры РНК аннотировали с помощью Python-библиотеки `urllib2` [12], а затем NA-BSE аннотировали с помощью пользовательских скриптов Python. Результирующий набор данных включал только NA-BSE из цепей РНК длиной ≥ 25 нуклеотидов, при этом учитывались только стэкинг-взаимодействия оснований, имеющие угол основание-основание $< 30^\circ$ и расстояние между ближайшими атомами двух оснований $< 4,0$ Å.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Базы данных и статистика. Полученная база данных включает в себя 362 543 NA-BSE различных размеров, образованных за счёт стэкинг-взаимодействий между гетероциклическими основаниями 816 186 н.о., не являющимися непосредственными соседями в полинуклеотидных цепях РНК (табл. П1 Приложения). 81,2% (294 342) NA-BSE состоит из двух нуклеотидов, 13,6% (49 281) – из трёх нуклеотидов, 4,2% (15 225) – из четырёх нуклеотидов и 1% включает пять или более остатков (3417 – пять, 273 – шесть, четыре – семь и один NA-BSE – восемь остатков). 58,2% NA-BSE были мотивами, состоящими только из пуринов, 35,3% включали как пурины, так и пиримидины, 5% были образованы пиримидинами и 1,5% NA-BSE включали модифицированные основания. Только 1,3% (4577 из 362 543) NA-BSE включали межмолекулярные взаимодействия (табл. П2 Приложения). NA-BSE типа I, образованные исключительно основаниями одного участка цепи внутри элемента вторичной структуры РНК (стебля или петли), составили 28% набора данных. NA-BSE типа II, образованные разными участками цепи одной и той же петли или стебля, составили почти половину всех мотивов (46,8%), а NA-BSE, включающие дальнедействующие (long-range) взаимодействия между различными элементами вторичной структуры РНК (тип LR), составили 15,9% набора данных. Остальные 9,3% NA-BSE включали смесь различных типов стэкинг-взаимодействий оснований. 6,6% всех NA-BSE включали мотивы, ранее названные нами мотивами BIE (base-intercalated element) и BWE (base-wedged element) [3], причём BIE встречался в четыре раза чаще. Почти все мотивы (98,3%) были дополнительно стабилизированы взаимодействиями между основанием и фосфатом [13]. 24% NA-BSE были стабилизированы взаимодействием одного н.о. с O4'-атомом рибозы другого н.о. [14]. Более половины (56,2%) всех NA-BSE включали канонические (смежные) стэкинг-взаимодействия оснований, образованные фланкирующими остатками с двух сторон, а 35,3% мотивов включали канонический стэкинг оснований, образованный только с одной стороны, без предпочтения какой-либо из сторон. 92,3% всех NA-BSE образовывали канонические (35,6% всех пар оснований) и неканонические (64,4%) пары оснований с другими остатками. Интересно, что 70% неканонических пар оснований находились в *транс*-ориентации, согласно номенклатуре Леонтиса–Вестхофа [15], однако мы не наблюдали существенного предпочтения ни одной из трёх «граней» оснований («грань» Уотсона–Крика, Хугстена или остатка рибозы) ни среди пар оснований в *транс*-, ни в *цис*-положении.

Образование NA-BSE с участием тРНК, мРНК и рРНК в декодирующем центре рибосомы и в процессе транслокации. В ходе процесса транслокации т.н. А-тРНК, поступившая в А-сайт рибосомы в аминокислотированной форме, после завершения пептидилтрансферазной реакции (ПТР) перемещается из этого сайта в Р-сайт уже в виде пептидил-тРНК. Она замещает в этом сайте деацилированную Р-тРНК (которая до окончания ПТР несла на себе синтезирующийся пептид), вытесняя её в Е-сайт. При этом находившаяся в Е-сайте деацилированная тРНК покидает рибосому, а тРНК, ранее располагавшаяся в Р-сайте, занимая её место, образует с Е-сайтом несколько специфических тРНК-рРНК-контактов. Этот процесс сопровождается перемещением мРНК в мРНК-связывающем канале малой субъединицы рибосомы строго на один кодон. Отметим, что каждый шаг таких перемещений проходит через одно или несколько промежуточных состояний. Не вдаваясь в детали механизма работы рибосомы как молекулярной машины, подчеркнём ещё раз ключевую роль межнуклеотидных РНК-РНК-взаимодействий во всех этих процессах.

NA-BSE в декодирующем центре рибосомы.

Прямое участие рРНК в декодировании генетической информации изучено во многих деталях [16–21]. В частности, убедительно доказано, что основания трёх н.о. рРНК малой субъединицы рибосомы, G530, A1492 и A1493, стабилизируют выбор рибосомой той тРНК, которая соответствует кодону мРНК, находящемуся в А-сайте (здесь и везде в тексте статьи, если специально не огово-

рено, указана нумерация нуклеотидов, принятая для рРНК рибосомы *Escherichia coli*) [16]. Это осуществляется с помощью А-минорных взаимодействий этих н.о. с малым желобком кодон-антикодовой спирали (рис. 1, а). При этом адениновые основания н.о. A1492 и A1493 находятся в стэкинге друг с другом, а положение G530, как следует из анализа, проведённого в этой работе, стабилизировано его включением в NA-BSE, состоящий из трёх нуклеотидов G529–C518–G530 (рис. 1).

Однако в свободной от тРНК рибосоме или в рибосоме, в А-сайте которой отсутствует «правильная» тРНК, A1492 теряет контакт с A1493, переключаясь на образование NA-BSE с аденином н.о. A1913 рРНК большой субъединицы рибосомы (рис. 1, б). Этот вновь образованный NA-BSE становится элементом «моста» между малой и большой субъединицами рибосомы (см. ниже). G530 находится в такой свободной рибосоме в *syn*-конформации, в то время как при взаимодействии с кодон-антикодовым комплексом его конформация – *anti*. Ясно, что при перемещении тРНК из А-сайта в Р-сайт, т.е. при разрушении одного кодон-антикодового комплекса и в преддверии образования нового, исходная структура двух рассмотренных выше NA-BSE должна восстанавливаться. Таким образом, приведённые здесь данные отчётливо демонстрируют способность анализируемых в этой работе мотивов разрушаться и образовываться вновь (флуктуировать) в ответ на изменение функционального состояния рибосомы.

Другое важное наблюдение, которое следует из анализа приведённых выше данных, заклю-

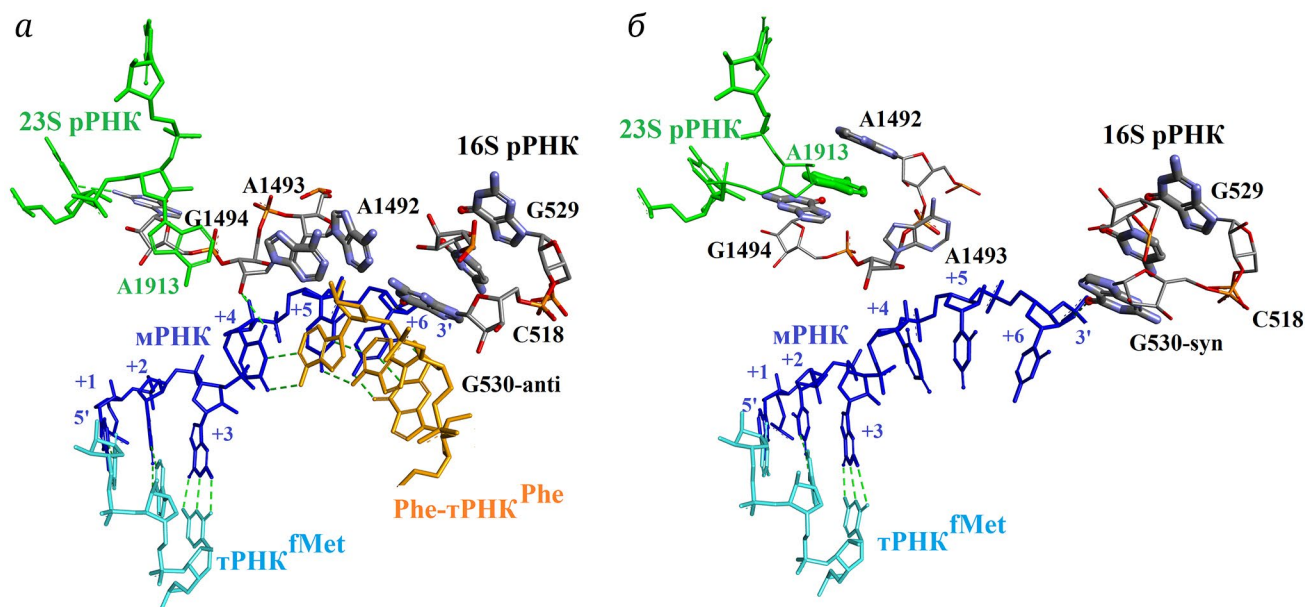


Рис. 1. Образование NA-BSE в декодирующем центре рибосомы *E. coli*. а – В кодон-антикодовые взаимодействия вовлечены как А-, так и Р-сайты рибосомы (PDB ID: 5UYM); б – А-сайт рибосомы свободен (PDB ID: 5UYK) (подробности – в тексте). Построение пространственных структур РНК, их анализ и создание всех иллюстраций было осуществлено с помощью программы Discovery Studio Visualizer v.21.1.0.20298

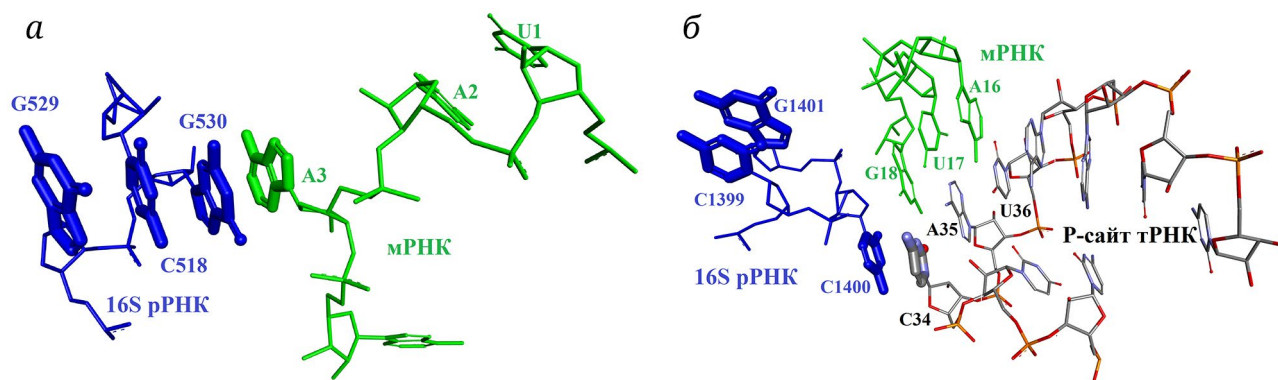


Рис. 2. Образование стопкообразного NA-BSE с участием G530 16S рРНК и А3 стоп-кодона мРНК, расположенного в А-сайте рибосомы (PDB ID: 4V67, а). Универсальный способ фиксации тРНК в Р-сайте рибосомы путём образования NA-BSE из С34 тРНК и С1400 16S рРНК, экспонированного из её полинуклеотидной цепи вследствие образования NA-BSE С1399–G1401 (PDB ID: 7K00, б)

чается в том, что гетероциклическое основание в NA-BSE (в данном случае гуанин в G530) способно совершить поворот вокруг гликозидной связи фактически на 180° и вновь образовать стэкинг-контакт со своим прежним соседом (ср. конформации G530 на рис. 1, а и б).

Более того, было показано [22, 23], что когда в А-сайте рибосомы находится стоп-кодон, т.е. наступает стадия терминации трансляции, G530 вступает в стэкинг-взаимодействие с н.о. А3 этого кодона и образует с ним NA-BSE. Это, в свою очередь, приводит к временному образованию «стопки», состоящей из четырёх нуклеотидов (и, соответственно, из трёх NA-BSE), характеризующейся сильным перекрытием плоскостей гетероциклических оснований (рис. 2, а).

Таким образом, здесь происходит фиксация мРНК, которая продолжается до тех пор, пока не произойдут все события, составляющие процесс терминации трансляции.

И, наконец, ещё один консервативный NA-BSE, функция которого состоит в стабилизации кодон-антикодоновых взаимодействий, образуется с помощью стэкинг-контакта между С1400 рРНК малой субъединицы рибосомы и 5'-концевого нуклеотида в антикодоне Р-тРНК (например, как это показано на рис. 2, б, с С34 формилметиониновой тРНК *E. coli*) [24]. Необходимо заметить, что для того, чтобы этот контакт мог реализоваться, н.о. С1400 должен быть вытеснен из полинуклеотидной цепи 16S рРНК нуклеотидами С1399 и G1401, в свою очередь, также образующими NA-BSE [24] (рис. 2, б).

Контакты рРНК с мРНК вне декодирующего центра рибосомы, образованные NA-BSE. Ранее при анализе структурных мотивов в РНК, обозначенных нами как В1Е и В2Е [3], которые входят в рассматриваемое здесь более обширное семейство NA-BSE [4], мы описали мотив, образуемый н.о. А1503 рРНК малой субъединицы рибосомы

с н.о. –1 и –2 мРНК. Он был обнаружен более десяти лет назад Noller et al. [25]. Авторы высказали предположение о том, что этот контакт необходим для поддержания правильной рамки считывания мРНК рибосомой в процессе транслкации. Недавно в той же лаборатории удалось получить убедительное доказательство этой гипотезы: в мутантных рибосомах *E. coli*, в 16S рРНК которых отсутствовало адениновое (и какое-либо другое) основание в положении 1503, сдвиг рамки считывания мРНК наблюдался примерно вдвое чаще, чем в рибосомах дикого типа [26]. Было показано также, что точное расположение сайта связывания остатка А1503 16S рРНК с мРНК зависит от функционального состояния рибосомы (ср., например, файлы с PDB ID: 4V9K и 4V8D).

По-видимому, аналогичную роль выполняют в процессе транслкации NA-BSE, образуемые нуклеотидами мРНК и консервативными н.о. С1397, U1196 и G926 рРНК малых субъединиц рибосом, приведёнными в табл. П2.

NA-BSE в составе «мостиков», соединяющих малую и большую субъединицы рибосомы. Известно, что субъединицы рибосомы связаны друг с другом при помощи т.н. «мостов», которые образуются за счёт белок-белковых, РНК-белковых и РНК-РНК-взаимодействий. Количество таких «мостов» варьирует от 12 до 17 у рибосом различных организмов (для обзора см. работу Liu и Fredrick [27]). Межсубъединичные контакты, образуемые в «мостиках» только н.о. рРНК, поддерживаются в большинстве случаев связями между 2'-гидроксильной группой рибозы и фосфатными группами (с участием ионов магния), а также с помощью А-минорных мотивов. Однако в двух случаях ключевую роль в образовании таких «мостов» играют NE-BSE.

Межсубъединичный контакт А1492-А1913, образующийся, когда А-сайт рибосомы свободен, рассмотрен нами выше (рис. 1, б). Он обозначается

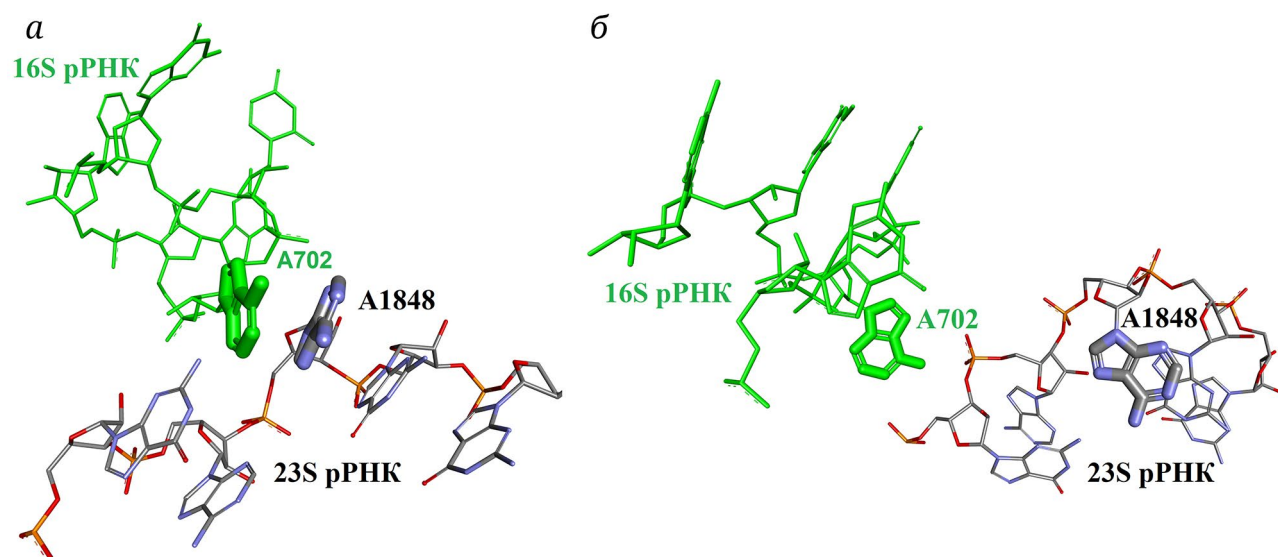


Рис. 3. Образование (PDB ID: 7SS9, а) и разрушение (PDB ID: 7SSL, б) «моста» В7 между субъединицами рибосомы *E. coli*

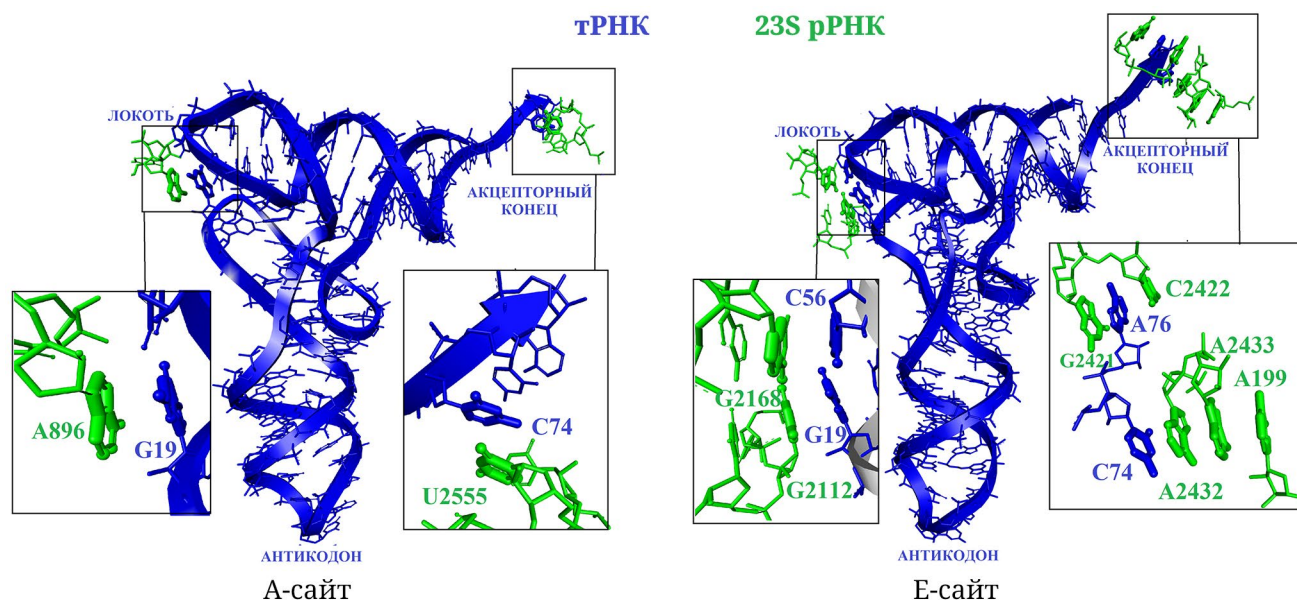


Рис. 4. NA-BSE, образующиеся в процессе транслокации тРНК по рибосоме в её А- и Е-сайтах

как «мост» В2а/d. Ярко выраженная относительная подвижность образующих его остатков адениловых кислот особенно отчётливо демонстрирует зависимость образования таких «мостов» от функционального состояния рибосомы.

Как показывает анализ данных, суммированных в табл. П2, второй «мост», обозначаемый как В7 и построенный из NA-BSE A702–A1848, сохраняется в процессе транслокации и в большинстве промежуточных функциональных состояний рибосомы и разрушается лишь тогда, когда величина угла поворота субъединиц друг относительно друга достигает максимальной величины (ср., например, относительное расположение этих

нуклеотидов в структурах с PDB ID: 7SS9 и 7SSL (рис. 3)).

Роль NA-BSE в организации контактов между тРНК и рРНК большой субъединицы рибосомы. Здесь мы рассмотрим NA-BSE, которые временно возникают за счёт стэкинг-контактов нуклеотидных оснований рРНК и тРНК в ходе перемещения последней из одного сайта рибосомы в другой, т.е. в процессе транслокации. тРНК в двух из трёх основных состояний, А и Е, сопровождающих её перемещение по рибосоме, показана на рис. 4.

NA-BSE, возникающий в Р-сайте тРНК-рибосомного комплекса, мы рассмотрели выше (рис. 2, б).

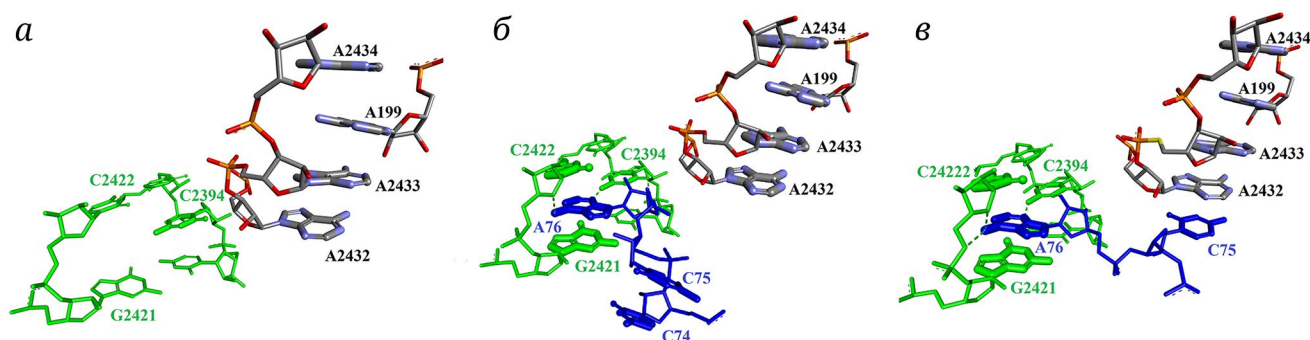


Рис. 5. NA-BSE, образующиеся при связывания 3'-конца деацилированной тРНК с Е-сайтом рибосомы *E. coli*. а – «Карман» для связывания акцепторного конца тРНК в вакантной рибосоме (PDB ID: 6PJ6); б – NA-BSE G2421–A76–C2422, деацилированная тРНК находится в рибосоме в промежуточном Р/Е-состоянии (PDB ID: 8SYL); в – образование плоской конформации C75–A76 и стопкообразного NA-BSE с участием остатка C75 тРНК перед диссоциацией тРНК из рибосомы (PDB ID: 7K00)

Оказалось, что как в А-, так и в Е-сайте такие мотивы образуются с участием двух важных функциональных элементов тРНК: т.н. «локтя» и 3'-концевой акцепторной области. В макромолекуле тРНК элемент её 3D структуры, называемый «локтем», формируется за счёт ряда специфических межнуклеотидных взаимодействий Т- и D-петлевых одноцепочечных участков. Как мы показали ранее [3], NA-BSE также участвуют в формировании этого функционального центра тРНК. При этом плоскости двух гетероциклических оснований (в большинстве случаев G19 и C56) оказываются сближенными и экспонированными в раствор. Они задействованы практически во всех РНК-белковых и РНК-РНК-комплексах, которые можно наблюдать в процессе функционирования тРНК в клетке [28].

Когда тРНК находится в А-сайте рибосомы, одно из этих оснований, а именно G19, образует стэкинг-контакт с A896 рРНК большой субъединицы рибосомы [19] (рис. 4).

Кроме того, в большинстве функциональных комплексов рибосомы н.о. C74 тРНК, расположенный по соседству с её 3'-акцепторным концом, образует NA-BSE с U2555 рРНК большой субъединицы рибосомы (рис. 4). Нуклеотид U2555 входит в состав т.н. А-петли этой рРНК – одного из компонентов пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) рибосомы. Его замена на пуриновые нуклеотиды сказывается на точности работы рибосомы [29]. В то же время мутация U2555C приводит к повышению термостабильности рибосом *E. coli* [30].

При перемещении пептидил-тРНК из А-сайта в Р-сайт оба NA-BSE разрушаются. При этом «локоть» тРНК в новых РНК-РНК-взаимодействиях не участвует (он взаимодействует главным образом с белком L5), а тРНК и рРНК образуют лишь рассмотренный нами ранее NA-BSE C34–C1400 (см. рис. 2, б).

Транслокация тРНК из Р-сайта в Е-сайт (происходящая, как мы уже отмечали, после заверше-

ния ПТР) сопровождается образованием наибольшего числа NA-BSE. Во-первых, в промежуточном состоянии этого перехода, когда кодон-антикодовый комплекс в Р-сайте ещё сохраняется, адениновое основание 3'-концевого остатка тРНК (в большинстве тРНК это A76) размещается в специальном «кармане» с образованием, по сути дела, двойного NA-BSE. При этом A76 не интеркалирует между основаниями соседних н.о. рРНК (как в случае ВІЕ), а размещается в «кармане» (полости), который уже предсуществует в рибосоме (рис. 5).

Его можно обнаружить и в вакантной, не связанной с тРНК и не функционирующей рибосоме, выделенной из любого организма, а также из митохондрий и хлоропластов (рис. 5, а). Положение остатков G2421 и C2422 (непосредственных соседей в нуклеотидной последовательности рРНК, с основаниями каждого из которых аденин в A76 находится в стэкинге) в её 3D структуре стабилизировано образованием уотсон-криковской пары G2421–C2395 и неканонической пары C2422–U2393 соответственно. Между этими парами в противоположной цепи рРНК находится н.о. C2394. Положение A76, кроме стэкинг-взаимодействий, стабилизировано тремя полноценными Н-связями с основанием C2394 и сахаро-фосфатным остовом, также формирующими «карман» (рис. 5, б, в). Интересно, что образование этого NA-BSE можно наблюдать не только в случае полноразмерной тРНК, но и используя сравнительно короткий «акцепторный» фрагмент тРНК [31].

На следующем промежуточном этапе перемещения деацилированной тРНК из Р- в Е-сайт в игру вступает ещё один важный РНК-белковый домен большой субъединицы рибосомы, т.н. «L1-выступ», в организации которого белок L1 играет ключевую роль [32]. Первоначально NA-BSE образуется за счёт стэкинг-взаимодействия G19 тРНК с G2112 23S рРНК (рис. 6, а; PDB ID: 7ST6).

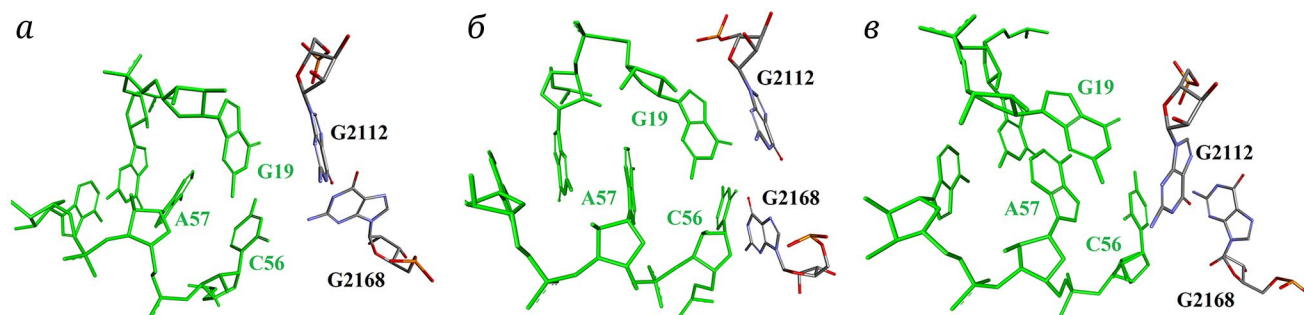


Рис. 6. Относительное расположение остатков G19 и C56 «локтя» тРНК и G2112 и G2168 «L1-выступа» 23S рРНК, а – на начальном этапе перемещения тРНК из Р-сайта в Е-сайт рибосомы (PDB ID: 7ST6); б – при полном перемещении тРНК в Е-сайт (PDB ID: 7SSN); в – на начальном этапе диссоциации тРНК из Е-сайта (PDB ID: 7ST2)

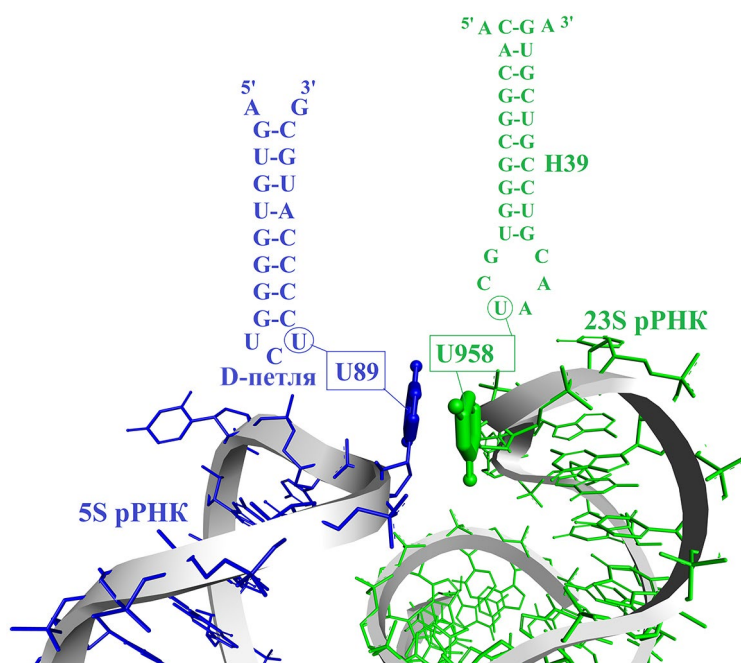


Рис. 7. NA-BSE, образованный нуклеотидными остатками D-петли 5S рРНК и т.н. «петли 960», замыкающей спираль H39 23S рРНК в рибосоме *E. coli* (PDB ID: 5MDV)

Когда же тРНК полностью переходит в Е-сайт, она закрепляется в нем ещё одним NA-BSE, образуемым остатками C56 тРНК и G2168 рРНК (рис. 6, б; PDB ID: 7SSN). И, наконец, эти контакты «локтя» с «L1-выступом» разрушаются перед тем, как тРНК покинет рибосому (рис. 6, в; PDB ID: 7ST2).

Что же касается акцепторного конца тРНК, то в случае рибосом эубактерий в районе «кармана» большой субъединицы образуется NA-BSE из остатков C75 тРНК и A2432 рРНК, который, в свою очередь, является фланкирующим нуклеотидом стопкообразного NA-BSE A2433–A199–A2434. Этот последний мотив выполняет в рибосоме роль соединяющего звена между сильно удалёнными друг от друга элементами вторичной структуры рРНК. При этом н.о. A76 и C75 тРНК, расположенной в Е-сайте рибосом бактерий, образуют весьма необычную структуру, в которой гетеро-

циклические основания лежат в одной плоскости (рис. 5, б). Интересно, что контакт акцепторного конца тРНК с 23S рРНК, образованный двумя NA-BSE, оказывается настолько прочным, что её плоская 3'-концевая структура сохраняется, когда вся остальная часть макромолекулы тРНК покидает рибосому [24] (рис. 5, в).

Заметим, что образование стэкинг-контакта между C75 и A2432 и, соответственно, плоской структуры C75–A76 в рибосомах архей, а также в цитоплазматических и митохондриальных рибосомах эукариот невозможно вследствие стерических препятствий, создаваемых одним из белков, расположенных в этом районе рибосомы.

Взаимодействие D-петли 5S рРНК с рРНК большой субъединицы рибосомы. Среди мотивов, временно возникающих в процессе транслкации, мы хотели бы более подробно рассмотреть

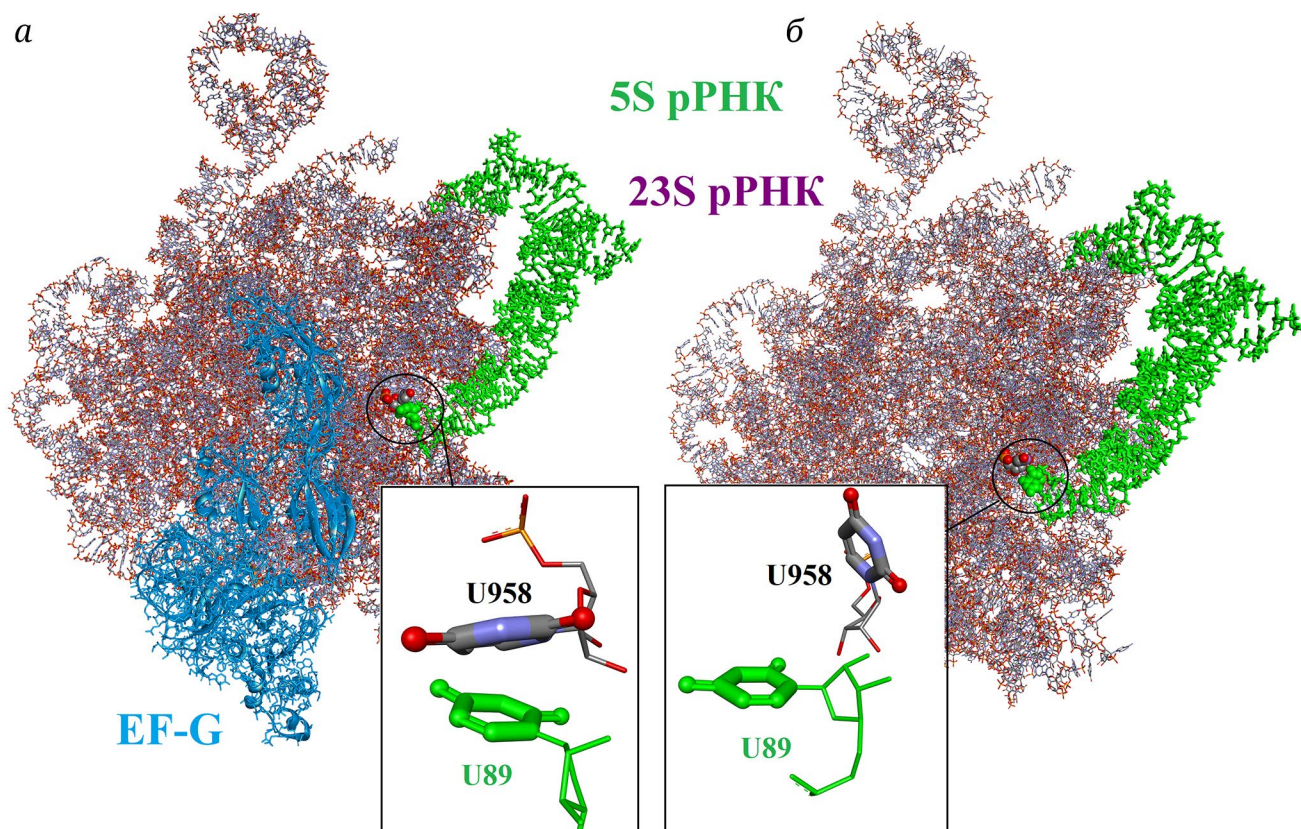


Рис. 8. Взаимное расположение нуклеотидных остатков U89 тРНК и U958 23S рРНК, а – в присутствии (PDB ID: 7SSL) и б – в отсутствии (PDB ID: 7SSW) элонгационного фактора EF-G в рибосоме *E. coli*

NA-BSE, образующийся в ряде третичных структур рибосом *E. coli* (табл. П2) из н.о. U89 D-петли 5S рРНК и U958 «петли 960» 23S рРНК (рис. 7).

Возможность для его образования открывает-ся благодаря наличию в макромолекуле 5S рРНК этих рибосом другого, но уже постоянного NA-BSE, состоящего из G86 и C88, стэкинг-взаимодействие оснований которых приводит к экспонированию из D-петли двух остатков уридиловой кислоты – U87 и U89.

Наличие непосредственного контакта двух остатков уридиловой кислоты, показанных на рис. 8, хорошо согласуется с полученными ранее экспериментальными данными. Во-первых, рассматриваемые здесь одноцепочечные участки двух разных рРНК в рибосоме *E. coli* могут быть ковалентно связаны реагентами, избирательно сшивающими основания рядом расположенных н.о. РНК [33]. Во-вторых, мутации в «петле 960» 23S рРНК приводят к изменению реакционной способности соседнего с U89 остатка C90 D-петли 5S рРНК [34].

Почему же этот мотив представляет особый интерес? Известно, что 5S рРНК является обязательным компонентом цитоплазматических рибосом всех про- и эукариот. Рибосомы этих классов полностью лишены способности синтезировать

белки, если 5S рРНК-белковый комплекс в них по каким-то причинам отсутствует. Сегодня, когда доступными стали сотни 3D структур 5S рРНК в составе рибосом, полученные с атомным или близким к атомному разрешением, проблему пространственной структуры 5S рРНК можно считать полностью решённой. В то же время ответ на вопрос о функциональной роли 5S рРНК в рибосоме остаётся открытым.

В литературе были высказаны две не противоречащие друг другу гипотезы, согласно которым, во-первых, 5S рРНК и специфичные к ней рибосомные белки выполняют роль сигнал-передающего звена между ГТРАЗным центром и ПТЦ рибосомы [33–36] и, во-вторых, 5S рРНК обеспечивают правильную сборку больших субъединиц рибосом в процессе их биогенеза [37–39]. Ясно, что для проверки любой из этих гипотез, а также для дальнейшего выяснения деталей механизма функционирования 5S рРНК в рибосоме необходима надёжная информация о её контактах с другими РНК рибосомного комплекса. С другой стороны, в большинстве доступных на сегодня третичных структур 70S рибосом *E. coli* н.о. U89 D-петли 5S рРНК и U958 «петли 960» 23S рРНК стэкинг-структур не образуют, хотя они и расположены вблизи друг от друга.

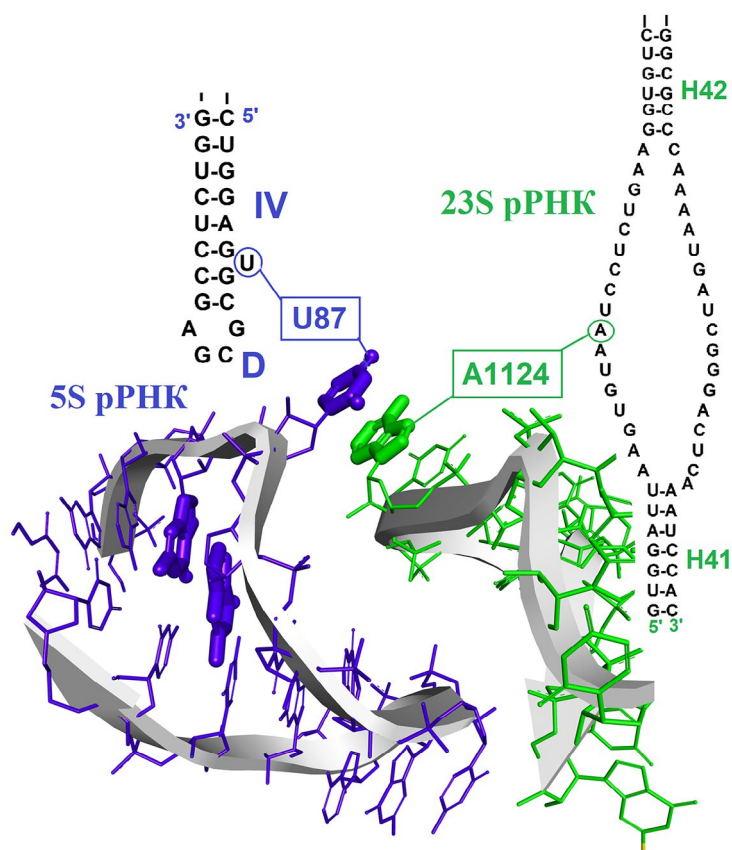


Рис. 9. Контакт в виде NA-BSE примыкающей к D-петле двойной спирали IV 5S рРНК и н.о. A1124 двойной петли 23S рРНК рибосом *Haloarcula marismortui*

Возникает естественное предположение о том, что D-петля 5S рРНК и «петля 960» 23S рРНК в рибосомах бактерий только временно контактируют друг с другом посредством NA-BSE, подобно многим другим рассмотренным нами выше мотивам этого типа, несущим функциональную нагрузку. При этом такой контакт существует лишь в определённом функциональном состоянии рибосомы. Это предположение достаточно убедительно подтверждается примером, показанным на рис. 8 [40]: в рибосоме, которая в процессе транслокации связана с EF-G (рис. 8, а), образуется NA-BSE U89–U985. Этот мотив разрушается после того, как фактор элонгации покидает рибосому (рис. 8, б).

И действительно, в базах данных, которые мы использовали в настоящей работе (табл. П1 и П2), NA-BSE U89–U985 наблюдаются только в комплексах рибосомы с факторами трансляции. Как правило, положение EF-G на рибосоме в них было «заморожено» ингибиторами ГТРАЗной активности фактора с помощью GMP-PCP или фусидовой кислоты (см., например, структуры с PDB ID: 4V90 и 5MDV). Как видно из рис. 8, прямой контакт между фактором элонгации EF-G и 5S рРНК в рибосоме отсутствует. Таким образом, EF-G катализирует образование NA-BSE U89–U985 аллостерически.

Что же касается NA-BSE, образование которого показано на рис. 7, то он формируется на рибосоме *E. coli* в присутствии фактора терминации трансляции RF2, который также является ГТРАЗой (PDB ID: 5MDV).

Отметим, что экспонированные остатки уридиловой кислоты спирали IV, расположенные рядом с D-петлёй 5S рРНК рибосом некоторых архей, а также всех низших и высших эукариот (сведения о которых содержатся в базе данных П1) образуют постоянные NA-BSE-контакты с одним из остатков аденина большой петли, соединяющей спирали H41 и H42 рРНК большой субъединицы рибосом так, как это показано на примере рибосом *Haloarcula marismortui* (рис. 9).

К сожалению, для рибосом этих организмов в литературе нет данных, которые позволили бы сравнить взаимное расположение этих нуклеотидов в присутствии или отсутствии белковых факторов трансляции, обладающих ГТРАЗной активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы рассмотрели сравнительно небольшую группу NA-BSE, весьма

распространённого мотива в 3D структуре РНК. В этой группе представлены мотивы, которые образуются в процессе функционирования рибосомы на всех этапах синтеза полипептидной цепи белков (за исключением мотивов, расположенных в ПТЦ рибосомы, которые были рассмотрены нами ранее [3]). Эту группу составляют лишь менее 1% NA-BSE, участвующих в формировании третичной структуры рРНК (ср. табл. П1 и П2). Особенность этих мотивов состоит в том, что они образуются временно на определённом этапе функционирования рибосомы и диссоциируют при переходе к следующему этапу. Можно думать, что сигналами диссоциации служат ещё недостаточно изученные факторы, управляющие работой рибосомы как молекулярной машины. Ряд н.о. и их комбинаций, из которых состоят функциональные NA-BSE (например, н.о. D- и Т-петель тРНК, формирующие их «локти»), весьма консервативны и у всех организмов состоят из одних и тех же гетероциклических оснований. В других случаях консервативность проявляется на уровне сохранения пуриновых и пиримидиновых оснований в соответствующих позициях. В третьих случаях (как, например, в 5'-положении «кармана», предназначенного для связывания 3'-концевого нуклеотида акцепторного конца тРНК в Е-сайте рибосомы) консервативность отсутствует. Однако для формирования полноценного NA-BSE взаимная ориентация н.о., из которых он собирается, должна быть строго

заданной. Это достигается как стэкинг-взаимодействием н.о. мотива с основаниями фланкирующих н.о., так и спариванием с находящимися по соседству комплементарными основаниями.

Нет сомнений в том, что расширение наших знаний о процессах образования и распада NA-BSE в РНК и их комплексов с белками будет способствовать более глубокому пониманию механизма функционирования этих ключевых для жизни клетки макромолекул.

Вклад авторов. В.М. проанализировал данные и подготовил все рисунки. Е.Б. выполнил вычислительную работу и конформационный анализ. А.Б. разработал проект. Все авторы внесли значительный вклад в написание рукописи.

Благодарности. Авторы благодарят рецензентов за внимательное прочтение рукописи и конструктивные предложения.

Финансирование. Статья выполнена в рамках работ по теме № 121031300037-7 госзадания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ganser, L. R., Kelly, M. L., Herschlag, D., and Al-Hashimi, H. M. (2019) The roles of structural dynamics in the cellular functions of RNAs, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 474-489, <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0136-0>.
2. Wu, M. T., and D'Souza, V. (2020) Alternate RNA structures, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **12**, a032425, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032425>.
3. Baulin, E., Metelev, V., and Bogdanov, A. (2020) Base-intercalated and base-wedged stacking elements in 3D-structure of RNA and RNA-protein complexes, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 8675-8685, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa610>.
4. Метелев В. Г., Баулин Е. Ф., Богданов А. А. (2023) Множественные неканонические стэкинг-взаимодействия гетероциклических оснований как один из главных факторов организации третичной структуры, *Биохимия*, **88**, 975-985, <https://doi.org/10.31857/S0320972523060076>.
5. Spirin, A. S. (1985) Ribosomal translocation: facts and models, *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **32**, 75-114, [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60346-3](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60346-3).
6. Noller, H. F., Lancaster, L., Mohan, S., and Zhou, J. (2017) Ribosome structural dynamics in translocation: yet another functional role for ribosomal RNA, *Quart. Rev. Biophys.*, **50**, e12, <https://doi.org/10.1017/S0033583517000117>.
7. Sweeney, B. A., Roy, P., and Leontis, N. B. (2015) An introduction to recurrent nucleotide interactions in RNA, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **6**, 17-45, <https://doi.org/10.1002/wrna.1258>.
8. Korostelev, A. A. (2022) The structural dynamics of translation, *Annu. Rev. Biochem.*, **91**, 245-267, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-071921-122857>.
9. Kouranov, A., Xie, L., de la Cruz, J., Chen, L., Westbrook, J., Bourne, P. E., and Berman, H. M. (2006) The RCSB PDB information portal for structural genomics, *Nucleic Acids Res.*, **34**, D302-D305, <https://doi.org/10.1093/nar/gkj120>.
10. Leontis, N., and Westhof, E. (2012) RNA 3D structure analysis and prediction, in *Nucleic Acids and Molecular Biology*, https://doi.org/10.1007/978-3-642-25740-7_13.

11. Lu, X.-Jun, Bussemaker, H. J., and Olson, W. K. (2015). DSSR: an integrated software tool for dissecting the spatial structure of RNA, *Nucleic Acids Res.*, **43**, e142, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv716>.
12. Bohdan, D. R., Voronina, V. V., Bujnicki, J. M., and Baulin, E. F. (2023) A comprehensive survey of long-range tertiary interactions and motifs in non-coding RNA structures, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 8367-8382, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad605>.
13. Zirbel, C. L., Sponer, J. E., Sponer, J., Stombaugh, J., and Leontis, N. B. (2009) Classification and energetics of the base-phosphate interactions in RNA, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 4898-4918, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp468>.
14. Chawla, M., Chermak, E., Zhang, Q., Bujnicki, J. M., Oliva, R., and Cavallo, L. (2017) Occurrence and stability of lone pair- π stacking interactions between ribose and nucleobases in functional RNAs, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 11019-11032, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx757>.
15. Leontis, N. B., and Westhof, E. (2001) Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs, *RNA*, **7**, 499-502, <https://doi.org/10.1017/S1355838201002515>.
16. Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Tarry, M. J., Carter, A. P., and Ramakrishnan, V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit, *Science*, **292**, 897-902, <https://doi.org/10.1126/science.1060612>.
17. Ogle, J. M., and Ramakrishnan, V. (2005) Structural insights into translation fidelity, *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 129-177, <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.061903.155440>.
18. Abdi, N. M., and Frederick, K. (2005) Contribution of 16S rRNA nucleotides forming the 30S subunit A and P sites to translation in *Escherichia coli*, *RNA*, **11**, 1624-1632, <https://doi.org/10.1261/rna.2118105>.
19. Jenner, L., Demeshkina, N., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010) Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 1072-1078, <https://doi.org/10.1038/nsmb.1880>.
20. Loveland, A. B., Demo, G., Grigorieff, N., and Korostelev, A. A. (2017) Ensemble cryo-EM elucidates the mechanism of translation fidelity, *Nature*, **546**, 113-117, <https://doi.org/10.1038/nature22397>.
21. Rodnina, M. V., Fischer, N., Maracci, C., and Stark, H. (2017) Ribosome dynamics during decoding, *Phil. Trans. R. Soc.*, **372**, 20160182, <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0182>.
22. Korostelev, A., Asahara, H., Lancaster, L., Laurberg, M., Hirschi, A., Zhu, J., Trakhanov, S., Scott, W. G., and Noller, H. F. (2008) Crystal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 19684-19689, <https://doi.org/10.1073/pnas.0810953105>.
23. Brown, A., Shao, S., Murray, J., Hegde, R. S., and Ramakrishnan, V. (2015) Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes, *Nature*, **524**, 493-496, <https://doi.org/10.1038/nature14896>.
24. Watson, Z. L., Ward, F. R., Méheust, R., Ad, O., Schepartz, A., Banfield, J. F., and Cate, J. H. (2020) Structure of the bacterial ribosome at 2 Å resolution, *Elife*, **9**, e60482, <https://doi.org/10.7554/eLife.60482>.
25. Zhou, J., Lancaster, L., Donohue, J. P., and Noller, H. F. (2013) Crystal structures of EF-G-ribosome complexes trapped in intermediate states of translocation, *Science*, **340**, 1236086, <https://doi.org/10.1126/science.1236086>.
26. Smart, A., Lancaster, L., Donohue, J. P., Niblett, D., and Noller, H. F. (2024) Implication of nucleotides near the 3' end of 16S rRNA in guarding the translational reading frame, *Nucleic Acids Res.*, **52**, 5950-5958, <https://doi.org/10.1093/nar/gkae143>.
27. Liu, Q., and Fredrick, K. (2016) Intersubunit bridges of the bacterial ribosome, *J. Mol. Biol.*, **428**, 2146-2164, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.009>.
28. Zhang, J., and Ferré-D'Amaré, A. R. (2016) The tRNA elbow in structure, recognition and evolution, *Life*, **6**, 3, <https://doi.org/10.3390/life6010003>.
29. O'Connor, M., and Dahlberg, A. E. (1993) Mutations at U2555, a tRNA-protected base in 23S rRNA, affect translational fidelity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9214-9218, <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.9214>.
30. Nissley, A. J., Penev, P. I., Watson, Z. L., Banfield, J. F., and Cate, J. H. D. (2023) Rare ribosomal RNA sequences from archaea stabilize the bacterial ribosome, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 1880-1894, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1273>.
31. Schmeing, T. M., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2003) Structures of deacylated tRNA mimics bound to the E site of the large ribosomal subunit, *RNA*, **9**, 1345-1352, <https://doi.org/10.1261/rna.5120503>.
32. Mohan, S., and Noller, H. F. (2017) Recurring RNA structural motifs underlie the mechanics of L1 stalk movement, *Nat. Commun.*, **8**, 14285, <https://doi.org/10.1038/ncomms14285>.
33. Dontsova, O., Tishkov, V., Dokudovskaya, S., Bogdanov, A., Doering, T., Rinke-Appel, J., Thamm, S., Greuer, B., and Brimacombe, R. (1994) Stem-loop IV of 5S rRNA lies close to the peptidyltransferase center, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4125-4129, <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4125>.
34. Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A., Dahlberg, A. E., and Dontsova, O. A. (2000) Mutations at position A960 of *E. coli* 23S ribosomal RNA influence the structure of 5S ribosomal RNA and the peptidyltransferase region of 23S ribosomal RNA, *J. Mol. Biol.*, **299**, 379-389, <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3739>.

35. Smith, M. W., Meskauskas, A., Wang, P., Sergiev, P. V., and Dinman, J. D. (2001) Saturation mutagenesis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell Biol.*, **21**, 8264-8275, <https://doi.org/10.1128/MCB.21.24.8264-8275.2001>.
36. Kouvela, E. C., Gerbanas, G. V., Xaplanteri, M. A., Petropoulos, A. D., Dinos, G. P., and Kalpaxis, D. L. (2007) Changes in the conformation of 5S rRNA cause alterations in principal functions of the ribosomal nanomachine, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5108-5119, <https://doi.org/10.1093/nar/gkm546>.
37. Huang, S., Aleksashin, N. A., Loveland, A. B., Klepacki, D., Reier, K., Kefi, A., Szal, T., Remme, J., Jaeger, L., Vázquez-Laslop, N., Korostelev, A. A., and Mankin, A. S. (2020) Ribosome engineering reveals the importance of 5S rRNA autonomy for ribosome assembly, *Nat. Commun.*, **11**, 2900, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16694-8>.
38. Davis, J. H., Tan, Y. Z., Carragher, B., Potter, C. S., Lyumkis, D., and Williamson, J. R. (2016) Modular assembly of the bacterial large ribosomal subunit, *Cell*, **167**, 1610-1622, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.020>.
39. Thoms, M., Lau, B., Cheng, J., Fromm, L., Denk, T., Kellner, N., Flemming, D., Fischer, P., Falquet, L., Berninghausen, O., Beckmann, R., and Hurt, E. (2023) Structural insights into coordinating 5S RNP rotation with ITS2 pre-RNA processing during ribosome formation, *EMBO Rep.*, **24**, e57984, <https://doi.org/10.15252/embr.202357984>.
40. Carbone, C. E., Loveland, A. B., Gamper, H. B., Jr., Hou, Y. M., Demo, G., and Korostelev, A. A. (2021) Time-resolved cryo-EM visualizes ribosomal translocation with EF-G and GTP, *Nat. Commun.*, **12**, 7236, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27415-0>.

THE ROLE OF NONCANONICAL STACKING INTERACTIONS OF HETEROCYCLIC RNA BASES IN RIBOSOME FUNCTIONING

V. G. Metelev¹, E. F. Baulin^{2#}, and A. A. Bogdanov^{1,3,4*}

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

³ A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: bogdanov@belozersky.msu.ru

⁴ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia

Identification and analysis of recurrent elements (motifs) in DNA, RNA and protein macromolecules is an important step in studying the structure and functions of these biopolymers. In this paper, we investigated the functional role of NA-BSE (Non-Adjacent Base-Stacking Element), a widespread motif in the tertiary structure of various RNAs, in RNA-RNA interactions at various stages of ribosome function during translation of genetic information. Motifs of this type, reversibly formed during mRNA decoding, movement of ribosome subunits relative to each other, and movement of mRNA and tRNA along the ribosome during translocation, are described. EF-G-dependent formation of NA-BSE involving nucleotide residues of 5S rRNA and 23S rRNA is considered in particular.

Keywords: stacking interactions, tertiary RNA structure, ribosomal RNA, A-, P-, E-site of tRNA, RNA motifs

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 8-ОКСО-1,*N*⁶-ЭТЕНОАДЕНИНА НА РАБОТУ РНК-ПОЛИМЕРАЗ ВИРУСА SARS-CoV-2 И БАКТЕРИИ *Escherichia coli*

© 2024 И.В. Петушков^{1,2*#}, А.В. Аралов^{3,4#}, И.А. Иванов^{3,5}, М.С. Баранов^{3,6},
Т.С. Зацепин⁷, А.В. Кульбачинский^{1,2*}

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
123182 Москва, Россия; электронная почта: telomer1@rambler.ru, avkulb@yandex.ru

² Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия

³ ФГБУН ГНЦ РФ «Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук,
117997 Москва, Россия

⁴ Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, 117198 Москва, Россия

⁵ Общество с ограниченной ответственностью «Органикум», 127486 Москва, Россия

⁶ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
117997 Москва, Россия

⁷ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.10.2024

После доработки 29.11.2024

Принята к публикации 01.12.2024

Бактериальные и вирусные РНК-полимеразы являются перспективными мишенями для разработки новых ингибиторов транскрипции. Одним из потенциальных блокаторов синтеза РНК является 7,8-дигидро-8-оксо-1,*N*⁶-этенoadенин (охо-εА) – синтетическое соединение, которое представляет собой комбинацию двух модификаций аденина: 8-оксоаденина (охо-А) и 1,*N*⁶-этенoadенина (εА). В данном исследовании мы синтезировали охо-εА-трифосфат (охо-εАТР) и показали, что он может включаться РНК-зависимой РНК-полимеразой вируса SARS-CoV-2 в состав синтезируемой РНК напротив матричных остатков А и G в присутствии ионов Mn²⁺. В случае РНК-полимеразы *Escherichia coli* включение происходит напротив остатков А в матричной цепи ДНК. В случае нахожденияохо-εА вместо аденина в матричной цепи ДНК происходит полная остановка транскрипции в месте модификации. В то же времяохо-εАТР не подавляет синтез РНК обеими РНК-полимеразами в присутствии немодифицированных нуклеотидов, то есть не может эффективно конкурировать с природными субстратами. Таким образом,охо-εА-модификация значительно нарушает матричные свойства нуклеотида при синтезе РНК РНК-полимеразами разных классов, и соответствующие производные нуклеотидов не являются потенциальными противовирусными или антибактериальными ингибиторами транскрипции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: модифицированные нуклеиновые основания, РНК-полимераза, транскрипция, ингибиторы транскрипции, SARS-CoV-2.

DOI: 10.31857/S0320972524120099 EDN: IFBLLS

ВВЕДЕНИЕ

Производные природных азотистых оснований, нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот находят широкое применение в фундаментальных исследованиях, а также при созда-

нии терапевтических агентов, т.к. модификации приводят к появлению и/или улучшению широкого набора свойств по сравнению с природными аналогами. Недавняя пандемия, вызванная РНК-содержащим вирусом SARS-CoV-2, стимулировала поиск новых нуклеозидных ингибиторов вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp), а также показала необходимость дальнейшей работы в данном направлении для создания эффективных

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

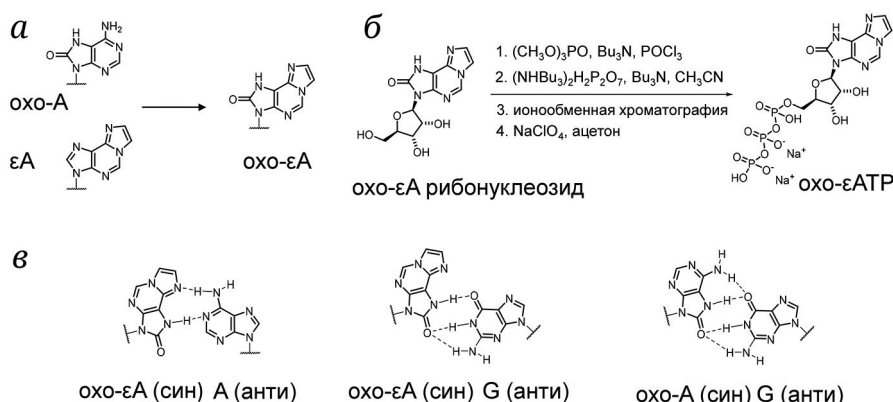


Рис. 1. Структура охо-εА-модификации (а), химический синтез охо-εАТР (б) и предполагаемые пары охо-εА:А, охо-εА:G и охо-А:G (в)

препаратов при появлении устойчивых линий и/или новых вирусов. Одним из возможных кандидатов на роль ингибитора RdRp является 7,8-дигидро-8-оксо-1, N^6 -этенoadенин (охо-εА), который является комбинацией двух модификаций аденина: 7,8-дигидро-8-оксоаденина (охо-А) и 1, N^6 -этенoadенина (εА) (рис. 1, а). Ранее было показано, что ДНК, содержащая охо-εА, может реплицироваться клеточными ДНК-полимеразами, которые включают напротив него остатки А [1]. В составе ДНК-дуплекса азотистое основание охо-εА находится преимущественно в син-конформации и спаривается с аденином, образуя пару, схожую по параметрам с АТ-парой [1]. Это позволяет ожидать, что охо-εА-трифосфат может потенциально включаться в РНК.

Геном вируса SARS-CoV-2 представляет собой одноцепочечную молекулу РНК размером 29,9 тысяч нуклеотидов, которая реплицируется и транскрибируется RdRp, имеющей сложное строение [2]. RdRp SARS-CoV-2 состоит из каталитической субъединицы nsp12 и двух вспомогательных факторов, nsp7 и nsp8. Активный центр RdRp локализован в nsp12 и содержит 2 остатка аспартата, D760 и D761, необходимых для связывания двух ионов двухвалентных металлов, играющих ключевую роль при катализе [3]. Существуют данные о том, что RdRp SARS-CoV-2 является самой быстрой из всех вирусных полимераз (скорость включения 600 нт/с) [4], что объясняет высокую частоту ошибок (частота включения некомплементарных оснований $10^{-1} - 10^{-3}$) [5]. Такая высокая ошибочность требует наличия корректирующей активности, осуществляемой 3'-5' экзорибонуклеазой nsp14, которая регулируется вирусным белком nsp10 [6]. С другой стороны, такая высокая частота ошибок способствует высокой скорости адаптации

вирусов в условиях отбора [7–9]. Несмотря на низкую точность, RdRp является чувствительным к структуре субстратов ферментом. Так, она требует обязательного наличия 2'-ОН-группы на 3'-конце как РНК-продукта, так и включаемого нуклеотида [10, 11]. Вместе с тем RdRp способна включать в растущую цепь РНК фосфорилированные формы некоторых синтетических нуклеозидов, на основе которых получены лекарственные препараты: софосбувир [12, 13], ремдесивир [14, 15] и молнупиравир [16]. Включение модифицированных остатков в РНК-продукт может блокировать его дальнейшее удлинение [13, 17, 18], а их наличие в РНК-матрице может затруднять последующий синтез комплементарного РНК-продукта или увеличивать число ошибок [16, 19–21]. Кроме того, было показано, что некоторые природные модификации РНК-матрицы, такие как N^1 -метил-аденозин, N^3 -метилуридин и 2'-О-метилгуанозин, являются практически непреодолимыми препятствиями для RdRp [11, 22].

В отличие от большинства вирусных РНК-зависимых РНК-полимераз, бактериальные, архейные и эукариотические ДНК-зависимые РНК-полимеразы (РНКП) являются многосубъединичными белками [23]. Они также нуждаются в ионах Me^{2+} для катализа [24, 25]. Данные белки также относительно часто допускают ошибки при транскрипции (частота $10^{-3} - 10^{-5}$) [26, 27], но делают их реже, чем коронавирусы RdRp. Как и вирусные RdRp, клеточные РНКП способны включать некоторые модифицированные аналоги нуклеотидов [28–30]. Кроме того, РНКП реагируют на наличие модифицированных нуклеотидов в ДНК-матрице. В зависимости от природы модификации азотистого основания в матричной цепи ДНК, РНКП может включить неправильный остаток

Принятые сокращения: РНКП – ДНК-зависимая РНК-полимераза; охо-εА – 7,8-дигидро-8-оксо-1, N^6 -этенoadенин; охо-εАТР – 7,8-дигидро-8-оксо-1, N^6 -этенoadенозинтрифосфат; RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза вируса SARS-CoV-2.

в растущую цепь РНК напротив повреждения или остановиться в повреждённом участке, что делает РНКП важным сенсором повреждений в ДНК [31]. Наличие остатка охo-А в матричной цепи ДНК является серьёзным препятствием для архейной РНКП [32], а наличие εА блокирует активность бактериальной РНКП [33]. Как будет влиять комбинация этих двух модификаций на работу РНКП, неизвестно.

Цель исследования: изучить влияние охo-εА в составе нуклеозидтрифосфата или матричной цепи на синтез РНК вирусной и прокариотической РНК-полимеразами. Задачи работы: 1. Установить, способна ли RdRp включать охo-εА-трифосфат (7,8-дигидро-8-оксо-1, N⁶-этенoadенозинтрифосфат, охo-εАТР) в синтезируемую РНК напротив различных матричных нуклеотидов, а также установить, приводит ли включение остатка охo-εА к дальнейшему ингибированию синтеза РНК. 2. Проверить, способна ли РНКП *E. coli* использовать охo-εАТР в качестве субстрата, а также исследовать влияние охo-εА в матричной ДНК на синтез РНК-транскрипта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химический синтез. Оборудование и реактивы. Все реагенты были приобретены у компании «Sigma-Aldrich» (США). Растворители были приобретены у компании «ХИММЕД» (Россия). ¹H, ¹³C и ³¹P ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Bruker Avance III 600 («Bruker», Германия) при 600, 150 и 243 МГц соответственно. Мультиплетность указана с использованием следующих сокращений: с (синглет), д (дублет) и м (мультиплет). Константы спин-спинового взаимодействия (*J*) указаны в Гц. Ионнообменную хроматографию проводили на приборе Akta Explorer 100 («Cytiva», Швеция).

Синтез и очистка охo-εАТР (динатриевая соль). К рибонуклеозиду охo-εА [34] (0,62 г, 2,0 ммоль) в сосуде Шленка (100 мл) в инертной атмосфере добавляли свежеперегнанные триметилфосфат ((CH₃O)₃PO, 8,0 мл) и трибутиламин (Bu₃N, 0,95 мл). Смесь интенсивно перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин и охлаждали до -10 °С. К охлаждённой реакционной смеси в инертной атмосфере добавляли оксихлорид фосфора (POCl₃, 0,33 мл, 3,6 ммоль) и перемешивали при -10 °С в течение 1 ч. Затем к смеси добавляли охлаждённую до -20 °С фосфорилирующую смесь, полученную интенсивным перемешиванием смеси ацетонитрила (CH₃CN, 20 мл), Bu₃N (2,8 мл, 11,8 ммоль) и пиродифосфата бис(трибутиламония) ((NH₄Bu₃)₂H₂P₂O₇, 1,2 г, 2,2 ммоль) в инертной атмосфере в течение 20 мин. После переме-

шивания в течение 1 ч при -10 °С к реакционной смеси добавляли холодную воду (65 мл) и перемешивали в течение 1 ч при 0 °С. Смесь переносили в делительную воронку и промывали хлористым метилом (15 мл × 5). Водный слой отделяли и добавляли к нему водный раствор аммиака до pH 7,0. Полученный раствор охo-εАТР хранили в холодильнике до очистки ионнообменной хроматографией. Очистку проводили методом ионнообменной хроматографии на колонке 50 × 250 мм, упакованной сорбентом НЕМА-БИО 1000 DEAE 70 мкм (Германия), в градиенте 50–600 мМ концентраций бикарбоната триэтиламония (pH 7,6). Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали, затем остаток повторно растворяли в воде и упаривали для удаления остатков буфера. Полученный продукт переводили в натриевую соль переосаждением из водного раствора десятикратным объёмом 3%-ного раствора перхлората натрия (NaClO₄) в ацетоне. Осадок промывали сухим ацетоном и сушили под вакуумом. Выход 0,52 г (0,86 ммоль, 43%). ¹H ЯМР (600 МГц, D₂O): δ 9,10 (с, 1H), 8,02 (д, *J* = 1,2 Гц, 1H), 7,63 (д, *J* = 1,2 Гц, 1H), 6,06 (д, *J* = 5,6 Гц, 1H), 5,36 (дд, *J* = 5,6 Гц, *J* = 5,7 Гц, 1H), 4,80–4,75 (м, 1H), 4,40–4,35 (м, 2H), 4,32–4,26 (м, 1H). ¹³C ЯМР (150 МГц, D₂O): δ 154,1, 135,8, 135,4, 133,8, 132,9, 112,2, 108,4, 86,1, 82,9 (д, *J* = 8,4 Гц, 1C), 70,5, 69,9, 65,3 (д, *J* = 5,2 Гц, 1C). ³¹P ЯМР (243 МГц, D₂O): δ -6,10 (д, *J* = 19,7 Гц, 1P), -10,79 (д, *J* = 18,8 Гц, 1P), -21,65 (дд, *J* = 19,7 Гц, *J* = 18,8 Гц, 1P). Спектры ЯМР приведены в Приложении.

Синтез ДНК-олигонуклеотидов с охo-εА 2'-дезоксирибонуклеотидом. Синтез охo-εА 2'-дезоксирибонуклеотид 3'-фосфорамидита и модифицированных ДНК-олигонуклеотидов проводили, как описано ранее [1]. Вкратце, модифицированные ДНК-олигонуклеотиды были получены с использованием фосфорамидитного твердофазного метода и синтезатора MerMade 12 («Bioautomation», США). Защищённые 2'-дезоксирибонуклеозид 3'-фосфорамидиты, Unylinker-CPG (500 Å) и S-этилтио-1Н-тетразол были приобретены в «ChemGenes» (США). В синтезе использовали стандартный протокол удаления защитных групп обработкой водным насыщенным раствором аммиака при 55 °С в течение ночи. Растворы упаривали, и аликвоты анализировали с помощью ВЭЖХ (чистота > 95%). Анализ и очистку олигонуклеотидов с помощью ВЭЖХ проводили с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1260 («Agilent», США), оснащённой автосемплером и коллектором фракций на колонке 4,6 × 250 мм Jupiter C18 (5 мкм, «Phenomenex», США); буфер А: 0,05 М ацетат аммония (pH 7,0), 5% ацетонитрила; буфер В: 0,03 М ацетат аммония, 80% ацетонитрила (pH 7,0); градиент В: 0 → 15% (1 объём колонки), 15 → 50% (10 объёмов колонки); скорость потока 1 мл/мин; температура 45 °С.

Экспрессия и выделение белков. RdRp SARS-CoV-2 получали путём гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* BL-21(DE3) и очистки путём Ni-аффинной и анионообменной хроматографий, как описано ранее [11]. Кор-фермент РНКП *E. coli* экспрессировали в клетках того же штамма с использованием вектора pVS10 и очищали путём осаждения полиэтиленгликолем с последующей гепариновой, Ni-аффинной и анионообменной хроматографией, как описано ранее [35].

Реакции синтеза РНК *in vitro* с RdRp SARS-CoV-2. Анализ способности RdRp включать охо-εАТР проводили с использованием РНК-олигонуклеотидов («ДНК-синтез», Россия), соответствующих праймеру и РНК-матрице. Радиоактивную метку вводили на 5'-конец праймера путём кинирования с помощью Т4 полинуклеотидкиназы («New England Biolabs», США) в присутствии 0,8 МБк γ-³²P]-АТР (ИБХ РАН, Россия), согласно протоколу производителя. РНК-субстрат получали путём смешения меченого праймера и матричной цепи до конечных концентраций 2 мкМ и 2,2 мкМ соответственно в транскрипционном буфере (ТБ) следующего состава: 10 мМ Tris-HCl, pH 7,9, 10 мМ KCl, 0,1 мМ ЭДТА (все реактивы производства «Sigma-Aldrich»). Смесь прогревали при 95 °С 3 мин, затем охлаждали до 85 °С за 2 мин и плавно остужали до 25 °С со средней скоростью охлаждения 0,5 °С/мин. РНК-субстрат разводили ТБ и смешивали с RdRp до конечных концентраций 25 нМ и 500 нМ соответственно и инкубировали смесь при 30 °С 10 мин. Реакцию запускали путём добавления смеси NTP («Illustra», Великобритания), MgCl₂ («Sigma-Aldrich») или MnCl₂ («Sigma-Aldrich») до конечных концентраций 10 мкМ и 1,1 мМ соответственно. При тестировании охо-εАТР добавляли до 100 мкМ. Транскрипцию проводили при 30 °С от 30 с до 10 мин. Реакцию останавливали путём добавления равного объёма стоп-раствора, содержащего формамид («Вектон», Россия) и гепарин (100 мкг/мл, «Sigma-Aldrich»). Пробы прогревали при 95 °С в течение 3 мин. Продукты транскрипции разделяли путём электрофореза в 15%-ном ПААГ (19 : 1, компоненты производства «Sigma-Aldrich») в денатурирующих условиях (7,5 М мочевины, «Roth», Германия) в буфере ТВЕ. Детекцию продуктов транскрипции проводили при помощи фосфоримиджера Typhoon 9500 («GE Healthcare», США).

Транскрипция *in vitro* с РНКП *E. coli*. Анализ способности РНКП включать охо-εАТР и проходить охо-εА в матричной цепи ДНК проводили с использованием РНК- и ДНК-олигонуклеотидов, соответствующих РНК-транскрипту, матричной и нематричной цепи. Немодифицированные олигонуклеотиды были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). В РНК вводили 5'-концевую

радиоактивную метку, как описано выше. Меченый РНК-олигонуклеотид смешивали с матричной цепью ДНК до конечных концентраций 1 и 2 мкМ соответственно в транскрипционном буфере (ТБ2) следующего состава: 40 мМ Tris-HCl, pH 7,9, 40 мМ KCl, 0,1 мМ ЭДТА («Sigma-Aldrich»). Смесь прогревали при 65 °С 3 мин, затем плавно остужали до 25 °С со средней скоростью охлаждения 0,5 °С/мин. Собранный дуплекс разводили ТБ2 до 250 нМ, добавляли кор-фермент РНКП *E. coli* до 1 мкМ (в опытах по включению охо-εАТР) или до 2 мкМ (в опытах по прохождению через охо-εdA). Смесь инкубировали при 37 °С 10 мин. Затем добавляли нематричную цепь до конечной концентрации 2,5 мкМ, и образцы инкубировали при 37 °С 15 мин. Собранный элонгационный комплекс разводили в 10 раз буфером ТБ2. Реакцию запускали путём добавления смеси NTP («Illustra», Великобритания), MgCl₂ или MnCl₂ («Sigma-Aldrich») до конечных концентраций 10 мкМ и 10 мМ соответственно. При тестировании охо-εАТР добавляли до 100 мкМ. Транскрипцию проводили при 37 °С 30 с. Реакцию останавливали путём добавления равного объёма стоп-буфера, содержащего 8 М мочевины («Roth»), 30 мМ ЭДТА («Sigma-Aldrich»), 2× ТВЕ. Продукты транскрипции разделяли путём электрофореза, как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Химический синтез охо-εАТР. Соединение было получено, исходя из 7,8-дигидро-8-оксо-1,N⁶-этенoadенозина (охо-εА рибонуклеозид) [34] и следуя описанной методике с незначительными модификациями [36] (рис. 1, б). Вкратце, обработка охо-εА рибонуклеозида POCl₃ в присутствии Bu₃N в (CH₃O)₃PO в качестве растворителя приводила к дихлорфосфоридату нуклеозида. Реакция полученного промежуточного соединения с (NHBu₃)₂H₂P₂O₇ и последующий гидролиз образовавшегося циклического промежуточного продукта давали неочищенный охо-εАТР, который очищали ионообменной хроматографией и высаживали раствором NaClO₄ в ацетоне, получая целевой продукт с выходом 43%.

Включение охо-εАТР RdRp в растущую цепь РНК. На первом этапе нашего исследования мы протестировали способность RdRp SARS-CoV-2 включать трифосфорилированную форму охо-εА (охо-εАТР) в растущую цепь РНК. Для этого мы использовали разработанную ранее модельную систему (рис. 2, а), которая хорошо зарекомендовала себя при изучении биохимической активности RdRp и влияния ингибиторов на работу данного фермента [11, 37–39]. В реакциях исполь-

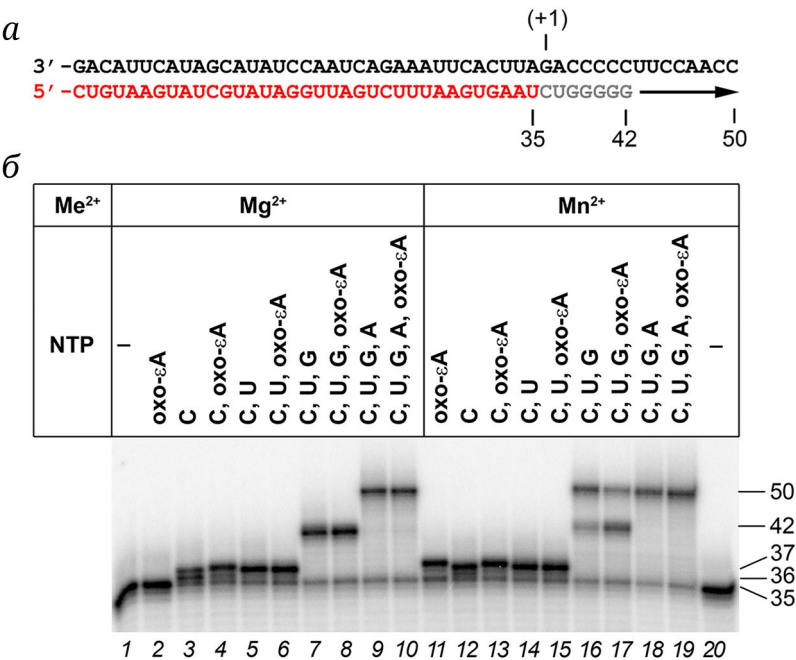


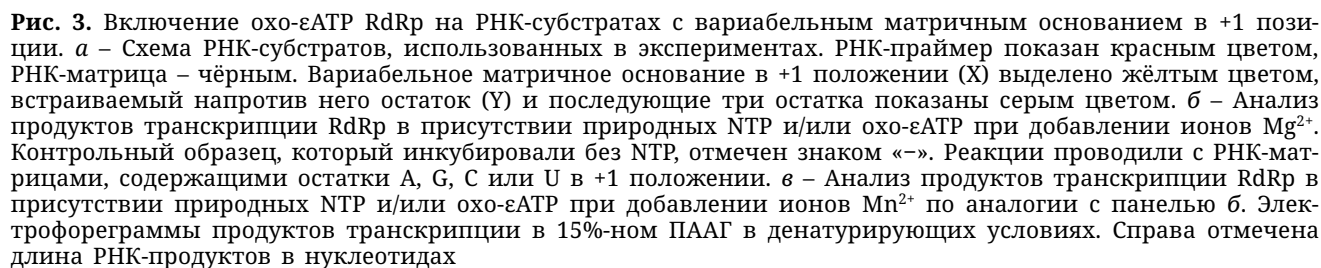
Рис. 2. Анализ включения охо-εАТР RdRp SARS-CoV-2. **а** – Схема РНК-субстрата, использованного в экспериментах. РНК-праймер показан красным цветом, РНК-матрица – чёрным, первое матричное основание отмечено «+1». Остатки, включаемые RdRp при удлинении праймера, изображены серым цветом (показаны 7 остатков, включаемых при добавлении ограниченного набора NTP), направление транскрипции указано стрелкой. **б** – Анализ продуктов транскрипции RdRp в присутствии разных наборов NTP и охо-εАТР при добавлении ионов Mg²⁺ (левая панель) и Mn²⁺ (правая панель). Контрольные образцы, которые инкубировали без NTP, отмечены знаком «-». Справа отмечена длина РНК-продуктов в нуклеотидах. Электрофореграмма продуктов транскрипции в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях

зовали препарат RdRp, содержащий каталитическую субъединицу nsp12 и слитые друг с другом субъединицы nsp7 и nsp8. РНК-субстрат состоял из двух комплементарных РНК-олигонуклеотидов: РНК-праймера, содержащего радиоактивную метку на 5'-конце, и РНК-матрицы. RdRp инкубировали с РНК-субстратом для образования комплекса, добавляли нуклеотиды и проводили реакцию в течение 10 мин при 30 °С. При добавлении RdRp и полного набора немодифицированных NTP происходит эффективное удлинение исходного праймера в присутствии как ионов Mg²⁺, так и Mn²⁺ (рис. 2, б, дорожки 9 и 18).

Путём добавления различного набора NTP можно установить эффективность включения тестируемого соединения напротив разных матричных азотистых оснований. В +1 положении матрицы находится остаток G (рис. 2, а). Добавление только охо-εАТР в присутствии ионов Mg²⁺ не приводит к удлинению РНК-праймера (дор. 2). В контрольном опыте при добавлении СТР (дор. 3) большая часть праймера удлиняется на 1–2 нуклеотида (вероятно, за счёт включения СТР напротив остатков G и А, что соответствует опубликованным данным о достаточно низкой точности RdRp SARS-CoV-2 [5]). В присутствии ионов Mn²⁺ RdRp приобретает способность включать два остатка охо-εА напротив остатков G и А в РНК-

матрице (дор. 11) и также включает два остатка С напротив G и А (дор. 12).

При совместном добавлении СТР и охо-εАТР в присутствии обоих катионов происходит последовательное включение остатка С и охо-εА, что видно по более медленной электрофоретической подвижности 37 нт РНК-продукта (дор. 4 и 13) по сравнению с реакциями, содержащими только СТР (дор. 3 и 12). Таким образом, охо-εА в этих условиях включается напротив матричного остатка А с большей эффективностью, чем СТР (который тоже присутствовал в реакциях на дор. 4 и 13). При добавлении СТР и UTP, как и ожидалось, происходит удлинение РНК на 2 нуклеотида и образование 37 нт продукта (дор. 7, 14). При добавлении смеси СТР, UTP и охо-εАТР дальнейшего удлинения 37 нт продукта не наблюдается (дор. 6 и 15). Таким образом, остаток охо-εАр не включается RdRp напротив матричного С в следующем положении. При добавлении СТР, UTP, GTP в присутствии Mg²⁺ наблюдается формирование остановленного комплекса с РНК-транскриптом размером 42 нт (дор. 7), который не удлиняется при добавлении в реакцию охо-εАТР (дор. 8). Таким образом, RdRp не включает охо-εАТР напротив матричного U в следующем положении. Любопытно, что в присутствии ионов Mn²⁺ значительная часть элонгационных комплексов продолжает



Для более детального анализа включения охo-εАТР мы модифицировали использованную тест-систему. Чтобы проверить включение охo-εАТР напротив каждого из матричных нуклеотидов в одинаковых условиях, были синтезированы 4 идентичных РНК-матрицы с вариабельным матричным нуклеотидом в +1 положении. Кроме

В этом случае в контрольных реакциях каждый из нуклеотидов включается не только напротив соответствующего матричного остатка, но и в следующей позиции, напротив матричного U

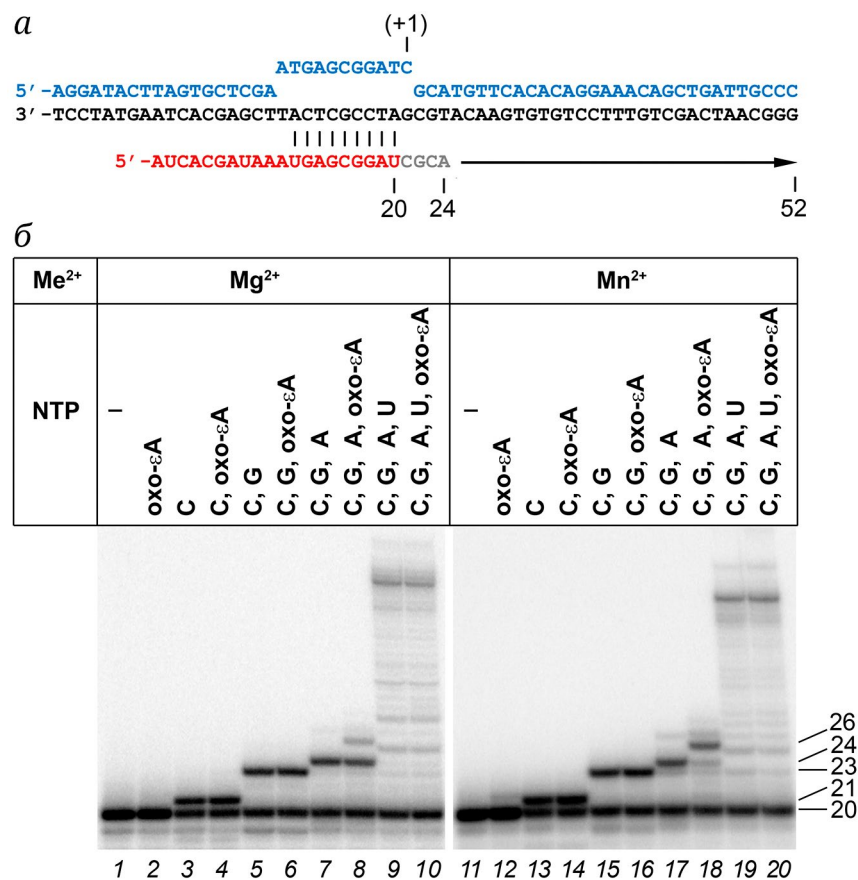


Рис. 4. Анализ включения охо-εАТР РНКП *E. coli*. **а** – Схема элонгационного комплекса, использованного в экспериментах. РНК-олигонуклеотид показан красным цветом, матричная цепь ДНК – чёрным цветом, нематричная цепь – синим. Показана точка начала включения нуклеотидных остатков (+1), первые 4 включённых нуклеотидных остатка отмечены серым цветом, направление транскрипции указано стрелкой. **б** – Анализ продуктов транскрипции в присутствии разных наборов NTP и охо-εАТР при добавлении ионов Mg²⁺ (левая панель) и Mn²⁺ (правая панель). Контрольные образцы, которые инкубировали без NTP, отмечены знаком «-». Электрофореграмма продуктов транскрипции в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Справа отмечена длина РНК-продуктов в нуклеотидах

(рис. 3, в, дор. 2, 7, 10, 12). В реакциях с охо-εАТР модифицированный нуклеотид с высокой эффективностью включается напротив матричных остатков А и G (рис. 3, в, дор. 3, 7) и не включается напротив С и U (дор. 11, 13). В случае матриц А и G в присутствии охо-εАТР и АТР происходит дальнейшее удлинение РНК-праймера (в сумме на 4 нуклеотида), что показывает возможность совместного включения охо-εАТР и АТР в синтезируемую РНК.

Включение охо-εАТР РНКП в растущую цепь РНК. Чтобы понять, является ли способность RdRp включать охо-εАТР универсальным явлением, мы протестировали активность клеточной РНКП, которая неродственна RdRp, в аналогичных реакциях. В отличие от RdRp, РНКП синтезирует РНК, двигаясь по двунитевой ДНК и осуществляя плавление цепей ДНК по мере синтеза. В этом случае для анализа транскрипции с использованием олигонуклеотидов был получен синтетический элонгационный комплекс, который содержал

кор-фермент РНКП *E. coli*, короткий РНК-транскрипт, матричную и нематричную цепи ДНК (рис. 4, а) [40–42]. Как можно видеть на рис. 4, б, охо-εАТР не включается напротив остатка dG в матричной цепи в присутствии обоих протестированных катионов (дор. 2, 12). При добавлении СТР или СТР и GТР происходит удлинение РНК на 1 или 3 нуклеотида (до 21 или 23 нт), но при этом добавление охо-εАТР не приводит к дальнейшему росту транскрипта (дор. 3–6, 13–16). Таким образом, охо-εАТР также не может включаться напротив остатков dC и dT в следующих положениях матрицы. При добавлении СТР, GТР и АТР транскрипция в контрольных реакциях останавливается после добавления 4 нуклеотидов, в соответствии с последовательностью матрицы (синтезируется РНК длиной 24 нт; дор. 7, 17). В присутствии охо-εАТР наблюдается дополнительное удлинение РНК ещё на два нуклеотида (до 26 нт), которое происходит более эффективно в присутствии ионов Mn²⁺ (дор. 8 и 18).

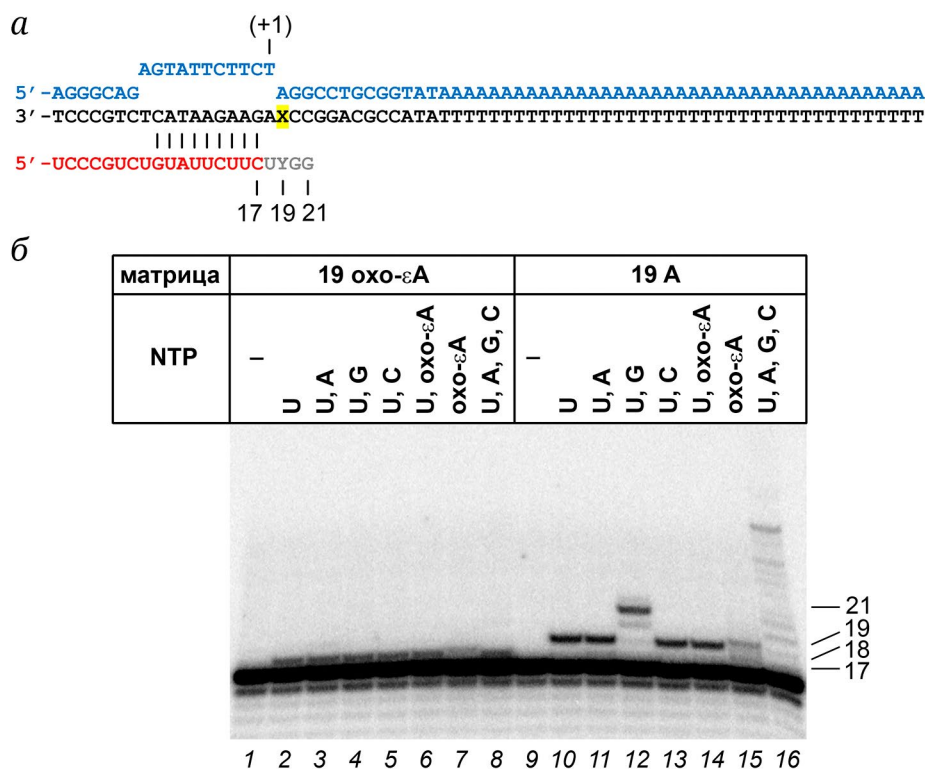


Рис. 5. Анализ прохождения РНКП *E. coli* остатка охo-εА в матричной цепи ДНК. **а** – Схема элонгационного комплекса, использованного в экспериментах. РНК-олигонуклеотид показан красным цветом, матричная цепь – чёрным цветом, нематричная цепь – синим. Позиция охo-εА или контрольного dA отмечена буквой X и выделена жёлтым цветом. Показана точка начала включения нуклеотидных остатков (+1), первые 4 включённых нуклеотидных остатка отмечены серым цветом, буквой У показан остаток, включаемый напротив охo-εА или dA. **б** – Анализ продуктов транскрипции при прохождении РНКП через охo-εА в +2 положении матричной цепи (левая панель) или через контрольный dA (правая панель). Контрольный образец, который инкубировали без NTP, отмечен знаком «-». Электрофореграмма продуктов транскрипции в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Справа отмечена длина РНК-продуктов в нуклеотидах

Вероятно, при этом происходит включение остатка охo-εА в 25 положении РНК напротив матричного остатка dA и дальнейшее удлинение РНК ещё на один нуклеотид из-за включения G напротив матричного dC в 26 положении. Так как после этого транскрипция останавливается, то охo-εАТР не является функциональным аналогом UTP. Наконец, при совместном добавлении охo-εАТР и полного набора NTP разницы между экспериментом и контролем с полным набором NTP не наблюдается (дор. 9, 10, 19, 20).

Включение NTP напротив охo-εА 2'-дезоксирибонуклеотида РНКП. На заключительном этапе нашего исследования мы протестировали противоположную ситуацию, когда модифицированный остаток охo-εА находится в матричной цепи ДНК, а синтез РНК клеточной РНКП происходит с использованием немодифицированных NTP. Для этого по аналогии с предыдущим пунктом были собраны синтетические элонгационные комплексы, содержащие остаток охo-εА 2'-дезоксирибонуклеотида в +2 положении матричной цепи ДНК относительно 3'-конца РНК-праймера (в +1 положении при этом находится остаток dA;

рис. 5, а). В качестве контроля использовали ДНК-олигонуклеотид, содержащий немодифицированный остаток dA в +2 положении. В случае контрольной матрицы РНКП добавляет в растущую цепь РНК комплементарные NTP: UTP (происходит удлинение 17 нт РНК на 2 нт, до 19 нт; рис. 5, б, дор. 10), UTP и GTP (удлинение на 4 нт, до 21 нт; дор. 12) или все четыре NTP (дор. 16). В соответствии с предыдущими экспериментами также наблюдается слабое включение охo-εАТР напротив матричного dA (дор. 15). В случае элонгационного комплекса, содержащего охo-εА в +2 положении матричной цепи ДНК, во всех реакциях наблюдается включение лишь первого остатка UTP напротив матричного dA, после чего синтез останавливается и дальнейшего включения NTP напротив охo-εА не происходит (рис. 5, в, дор. 2–8).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы обнаружили, что синтетический аналог аденозина охo-εА в форме трифосфорилированного нуклеозида включается в растущую цепь РНК

двумя неродственными РНК-полимеразами. Это говорит о том, что охo-εАТР способен проникать в область активного центра ферментов благодаря своему небольшому размеру и сходству с природными аналогами.

При этом, так как Уотсон–Криковские взаимодействия блокированы этено-модификацией, охo-εАТР, вероятно, принимает син-конформацию и спаривается с пуриновым азотистым основанием матричного нуклеотидного остатка в +1 положении, формируя пару, аналогичную охo-εА:А [1] или частично напоминающую охo-А:G [43] в ДНК-контексте (рис. 1, в). Этим объясняются наблюдаемые предпочтения к включению охo-εАТР напротив пуриновых нуклеотидов матрицы. В присутствии ионов Mg^{2+} RdRp SARS-CoV-2 медленно включает охo-εАТР напротив остатка А (сравн. включение на 4 дорожке рис. 2 за 10 мин и на 3 дорожке рис. 3 за 30 с). Ситуация сильно меняется в присутствии ионов Mn^{2+} , когда наблюдается включение как напротив остатка А, так и G. В случае РНКП *E. coli* включение охo-εАМР происходит только напротив остатка dА, причём эффективность такого включения также увеличивается в присутствии ионов Mn^{2+} . Такая разница, вероятно, связана с особенностями структуры активного центра клеточных РНКП, обеспечивающей большую точность синтеза РНК, т.к. пара охo-εА-dА более похожа на каноническую, чем пара охo-εА-dG (рис. 1, в).

Стимулирующее действие ионов марганца на включение охo-εАМР, наблюдаемое в случае обеих РНК-полимераз, вероятно, объясняется разницей в химических свойствах и размерах катионов Mn^{2+} и Mg^{2+} . Ранее методами анализа быстрой кинетики для RdRp полиовируса было продемонстрировано, что контроль правильности включения комплементарного NTP в присутствии ионов Mg^{2+} осуществляется на двух стадиях: ре-ориентации трифосфата входящего NTP и переноса фосфорилла [44]. В присутствии ионов Mn^{2+} RdRp теряет способность использовать этап переноса фосфорилла для контроля точности из-за одинаковой скорости для комплементарного и некомплементарного NTP [45], что приводит к снижению точности RdRp в присутствии Mn^{2+} [46–48]. Мы предполагаем, что такое поведение при включении синтетических и некомплементарных NTP связано с разницей в размерах данных катионов. Ион Mn^{2+} имеет меньший радиус, чем Mg^{2+} , что освобождает место в активном центре и позволяет неканонической паре разместиться в активном центре в благоприятном для катализа положении. Также для РНКП *E. coli* показано, что в присутствии ионов Mn^{2+} быстрее идут реакции экзо- и эндонуклеазного расщепления РНК [49], которые осуществляются в том же активном цен-

тре фермента, что и синтез РНК [25]. Это указывает на возможность Mn^{2+} менять нуклеофильные свойства участников реакции (в данном случае молекулы воды) [49]. Также имеются данные о том, что связывание иона Mn^{2+} приводит к увеличению гибкости белковой молекулы RdRp [50], что может дополнительно способствовать включению NTP, формирующего пару, отличную от канонической. Для более детального понимания наблюдаемого явления необходимы дальнейшие исследования. В то же время замена стандартного катиона Mg^{2+} на Mn^{2+} может быть использована для ферментативного включения модифицированных NTP в растущую цепь РНК в прикладных задачах.

Так как ранее было показано, что охo-εА может «проходить» ДНК-полимеразами в клетке [1], можно было ожидать, что РНКП также будет способна включать нуклеотиды напротив матричного охo-εА. Однако было обнаружено, что при наличии остатков охo-εА 2'-дезоксирибонуклеотида в матричной цепи происходит полное блокирование работы РНКП даже с ионами Mn^{2+} . Наблюдаемая разница (включение охo-εАТР в РНК, но остановка синтеза напротив матричного охo-εА 2'-дезоксирибонуклеотида), вероятно, также является следствием устройства активного центра РНКП. После транслокации нуклеотидный остаток в +1 положении матричной цепи ДНК закреплён в активном центре [51], в то время как входящий NTP может находиться в разных конфигурациях [51], т.е. является более подвижным, чем матричное основание, что позволяет занять положение, благоприятное для катализа.

Хотя исследованные РНК-полимеразы способны включать охo-εАТР в синтезируемую РНК, нам не удалось увидеть ингибирующего действия охo-εАТР на включение немодифицированных нуклеотидов. Несмотря на 10-кратный избыток охo-εАТР над природными NTP, изученные РНК-полимеразы не включают тестируемое соединение в присутствии полного набора NTP, и охo-εАТР не подавляет включение комплементарных нуклеотидов. Таким образом, охo-εА не является потенциальным противовирусным или антибактериальным ингибитором транскрипции. Однако охo-εА может являться прототипом для получения более эффективных ингибиторов транскрипции путём дальнейших модификаций. Учитывая флуоресцентные свойства [1], охo-εА может также быть использован в качестве метки при изучении механизмов взаимодействий RdRp с РНК и нуклеотидными субстратами. На конкретном примере можно сделать предположение о том, что одновременная модификация азотистого основания на Уотсон–Криковской и Хугстиновской стороне заместителями,

приводящими к перераспределению доноров и акцепторов водородных связей и сдвигающими равновесие в сторону син-конформации, делает такие модифицированные нуклеотиды слабыми ингибиторами вирусных и бактериальных РНКП.

Вклад авторов. А.В. Аралов, А.В. Кульбачинский, И.В. Петушков – концепция работы; А.В. Аралов, И.А. Иванов, М.С. Баранов и Т.С. Зацепин – химический синтез и очистка охо-εАТФ и модифицированных ДНК-олигонуклеотидов; И.В. Петушков – проведение экспериментов; А.В. Аралов, А.В. Кульбачинский, И.В. Петушков – обсуждение результатов и написание статьи.

Финансирование. Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Благодарности. Авторы благодарят А. Макарову, Е. Шилкина, Е. Болдинову (ИБГ РАН) за ценную дискуссию.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aralov, A. V., Gubina, N., Cabrero, C., Tsvetkov, V. B., Turaev, A. V., Fedeles, B. I., Croy, R. G., Isaakova, E. A., Melnik, D., Dukova, S., Ryazantsev, D. Y., Khrulev, A. A., Varizhuk, A. M., Gonzalez, C., Zatsepin, T. S., and Essigmann, J. M. (2022) 7,8-Dihydro-8-oxo-1,N6-ethenoadenine: an exclusively Hoogsteen-paired thymine mimic in DNA that induces A→T transversions in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 3056-3069, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac148>.
2. Kim, D., Lee, J.-Y., Yang, J.-S., Kim, J. W., Kim, V. N., and Chang, H. (2020) The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome, *Cell*, **181**, 914-921.e910, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>.
3. Hillen, H. S., Kokic, G., Farnung, L., Dienemann, C., Tegunov, D., and Cramer, P. (2020) Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase, *Nature*, **584**, 154-156, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2368-8>.
4. Shannon, A., Selisko, B., Le, N. T., Huchting, J., Touret, F., Piorkowski, G., Fattorini, V., Ferron, F., Decroly, E., Meier, C., Coutard, B., Peersen, O., and Canard, B. (2020) Rapid incorporation of Favipiravir by the fast and permissive viral RNA polymerase complex results in SARS-CoV-2 lethal mutagenesis, *Nat. Commun.*, **11**, 4682, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18463-z>.
5. Yin, X., Popa, H., Stapon, A., Bouda, E., and Garcia-Diaz, M. (2023) Fidelity of ribonucleotide incorporation by the SARS-CoV-2 replication complex, *J. Mol. Biol.*, **435**, 167973, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.167973>.
6. Moeller, N. H., Shi, K., Demir, O., Belica, C., Banerjee, S., Yin, L., Durfee, C., Amaro, R. E., and Aihara, H. (2022) Structure and dynamics of SARS-CoV-2 proofreading exoribonuclease ExoN, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, <https://doi.org/10.1073/pnas.2106379119>.
7. Drake, J. W., and Holland, J. J. (1999) Mutation rates among RNA viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13910-13913, <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13910>.
8. Jenkins, G. M., Rambaut, A., Pybus, O. G., and Holmes, E. C. (2002) Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis, *J. Mol. Evol.*, **54**, 156-165, <https://doi.org/10.1007/s00239-001-0064-3>.
9. Sanjuan, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., and Belshaw, R. (2010) Viral mutation rates, *J. Virol.*, **84**, 9733-9748, <https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10>.
10. Jones, A. N., Mourao, A., Czarna, A., Matsuda, A., Fino, R., Pyrc, K., Sattler, M., and Popowicz, G. M. (2022) Characterization of SARS-CoV-2 replication complex elongation and proofreading activity, *Sci. Rep.*, **12**, 9593, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13380-1>.
11. Petushkov, I., Esiyunina, D., and Kulbachinskiy, A. (2023) Effects of natural RNA modifications on the activity of SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase, *FEBS J.*, **290**, 80-92, <https://doi.org/10.1111/febs.16587>.
12. Sacramento, C. Q., Fintelman-Rodrigues, N., Temerozo, J. R., da Silva, A. P. D., Dias, S., da Silva, C. D. S., Ferreira, A. C., Mattos, M., Pao, C. R. R., de Freitas, C. S., Soares, V. C., Hoelz, L. V. B., Fernandes, T. V. A., Branco, F. S. C., Bastos, M. M., Boechat, N., Saraiva, F. B., Ferreira, M. A., Jockusch, S., Wang, X., Tao, C., Chien, M., Xie, W., Patel, D., et al. (2021) *In vitro* antiviral activity of the anti-HCV drugs daclatasvir and sofosbuvir against SARS-CoV-2, the aetiological agent of COVID-19, *J. Antimicrob. Chemother.*, **76**, 1874-1885, <https://doi.org/10.1093/jac/dkab072>.
13. Jockusch, S., Tao, C., Li, X., Chien, M., Kumar, S., Morozova, I., Kalachikov, S., Russo, J. J., and Ju, J. (2020) Sofosbuvir terminated RNA is more resistant to SARS-CoV-2 proofreader than RNA terminated by Remdesivir, *Sci. Rep.*, **10**, 16577, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73641-9>.

14. Kokic, G., Hillen, H. S., Tegunov, D., Dienemann, C., Seitz, F., Schmitzova, J., Farnung, L., Siewert, A., Hobartner, C., and Cramer, P. (2021) Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir, *Nat. Commun.*, **12**, 279, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20542-0>.
15. Yin, W. M. C., Luan, X., Shen, D. D., Shen, Q., Su, H., Wang, X., Zhou, F., Zhao, W., Gao, M., Chang, S., Xie, Y. C., Tian, G., Jiang, H. W., Tao, S. C., Shen, J., Jiang, Y., Jiang, H., Xu, Y., Zhang, S., Zhang, Y., and Xu, H. E. (2020) Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir, *Science*, **368**, 1499-1504, <https://doi.org/10.1126/science.abc1560>.
16. Kabinger, F. S. C., Schmitzová, J., Dienemann, C., Kokic, G., Hillen, H. S., Höbartner, C., and Cramer, P. (2021) Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **28**, 740-746, <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00651-0>.
17. Wang, J., Shi, Y., Reiss, K., Maschietto, F., Lolis, E., Konigsberg, W. H., Lisi, G. P., and Batista, V. S. (2022) Structural insights into binding of remdesivir triphosphate within the replication–transcription complex of SARS-CoV-2, *Biochemistry*, **61**, 1966-1973, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00341>.
18. Gordon, C. J., Tchesnokov, E. P., Woolner, E., Perry, J. K., Feng, J. Y., Porter, D. P., and Götte, M. (2020) Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency, *J. Biol. Chem.*, **295**, 6785-6797, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013679>.
19. Gordon, C. J., Tchesnokov, E. P., Schinazi, R. F., and Götte, M. (2021) Molnupiravir promotes SARS-CoV-2 mutagenesis via the RNA template, *J. Biol. Chem.*, **297**, 100770, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100770>.
20. Tchesnokov, E. P., Gordon, C. J., Woolner, E., Kocinkova, D., Perry, J. K., Feng, J. Y., Porter, D. P., and Götte, M. (2020) Template-dependent inhibition of coronavirus RNA-dependent RNA polymerase by remdesivir reveals a second mechanism of action, *J. Biol. Chem.*, **295**, 16156-16165, <https://doi.org/10.1074/jbc.AC120.015720>.
21. Luo, X., Wang, X., Yao, Y., Gao, X., and Zhang, L. (2022) Unveiling the “template-dependent” inhibition on the viral transcription of SARS-CoV-2, *J. Phys. Chem. Lett.*, **13**, 7197-7205, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.2c01314>.
22. Apostle, A., Yin, Y., Chillar, K., Eriyagama, A., Arneson, R., Burke, E., Fang, S., and Yuan, Y. (2023) Effects of epitranscriptomic RNA modifications on the catalytic activity of the SARS-CoV-2 replication complex, *Chembiochem*, **24**, <https://doi.org/10.1002/cbic.202300095>.
23. Iyer, L. M., and Aravind, L. (2012) Insights from the architecture of the bacterial transcription apparatus, *J. Struct. Biol.*, **179**, 299-319, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.12.013>.
24. Steitz, T. A. (1998) A mechanism for all polymerases, *Nature*, **391**, 231-232, <https://doi.org/10.1038/34542>.
25. Sosunov, V., Sosunova, E., Mustaev, A., Bass, I., Nikiforov, V., and Goldfarb, A. (2003) Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase, *EMBO J.*, **22**, 2234-2244, <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg193>.
26. James, K., Gamba, P., Cockell, S. J., and Zenkin, N. (2017) Misincorporation by RNA polymerase is a major source of transcription pausing *in vivo*, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 1105-1113, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw969>.
27. Imashimizu, M., Oshima, T., Lubkowska, L., and Kashlev, M. (2013) Direct assessment of transcription fidelity by high-resolution RNA sequencing, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 9090-9104, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt698>.
28. Mäkinen, J., Shin, Y., Vieras, E., Virta, P., Metsä-Ketelä, M., Murakami, K., and Belogurov, G. (2021) The mechanism of the nucleo-sugar selection by multi-subunit RNA polymerases, *Nat. Commun.*, **12**, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21005-w>.
29. Nedialkov, Y. A., and Burton, Z. F. (2013) Translocation and fidelity of *Escherichia coli* RNA polymerase, *Transcription*, **4**, 136-143, <https://doi.org/10.4161/trns.25527>.
30. Nudler, E., Gusarov, I., and Bar-Nahum, G. (2003) Methods of Walking with the RNA Polymerase, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, pp. 160-169.
31. Agapov, A., Olina, A., and Kulbachinskiy, A. (2022) RNA polymerase pausing, stalling and bypass during transcription of damaged DNA: from molecular basis to functional consequences, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 3018-3041, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac174>.
32. Gehring, A. M., and Santangelo, T. J. (2017) Archaeal RNA polymerase arrests transcription at DNA lesions, *Transcription*, **8**, 288-296, <https://doi.org/10.1080/21541264.2017.1324941>.
33. Pupov, D., Ignatov, A., Agapov, A., and Kulbachinskiy, A. (2019) Distinct effects of DNA lesions on RNA synthesis by *Escherichia coli* RNA polymerase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **510**, 122-127, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.062>.
34. Guseva, E. A., Kamzeeva, P. N., Sokolskaya, S. Y., Slushko, G. K., Belyaev, E. S., Myasnikov, B. P., Golubeva, J. A., Alferova, V. A., Sergiev, P. V., and Aralov, A. V. (2024) Modified (2'-deoxy)adenosines activate autophagy primarily through AMPK/ULK1-dependent pathway, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **113**, 129980, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2024.129980>.

35. Svetlov, V., and Artsimovitch, I. (2015) Purification of bacterial RNA polymerase: tools and protocols, *Methods Mol. Biol.*, **1276**, 13-29, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2392-2_2.
36. Kore, A. R., Shanmugasundaram, M., Senthilvelan, A., and Srinivasan, B. (2012) Gram-scale chemical synthesis of 2'-deoxynucleoside-5'-O-triphosphates, *Curr. Protocols Nucleic Acid Chem.*, **49**, 13.10.11-13.10.12, <https://doi.org/10.1002/0471142700.nc1310s49>.
37. Kamzeeva, P., Petushkov, I., Knizhnik, E., Snoeck, R., Khodarovich, Y., Ryabukhina, E., Alferova, V., Eshtukov-Shcheglov, A., Belyaev, E., Svetlova, J., Vedekhina, T., Kulbachinskiy, A., Varizhuk, A., Andrei, G., and Aralov, A. (2023) Phenotypic test of benzo[4,5]imidazo[1,2-c]pyrimidinone-based nucleoside and non-nucleoside derivatives against DNA and RNA viruses, including coronaviruses, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 14540, <https://doi.org/10.3390/ijms241914540>.
38. Miropolskaya, N., Kozlov, M., Petushkov, I., Prostova, M., Pupov, D., Esyunina, D., Kochetkov, S., and Kulbachinskiy, A. (2023) Effects of natural polymorphisms in SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase on its activity and sensitivity to inhibitors *in vitro*, *Biochimie*, **206**, 81-88, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.10.007>.
39. Matyugina, E., Petushkov, I., Surzhikov, S., Kezin, V., Maslova, A., Ivanova, O., Smirnova, O., Kirillov, I., Fedyakina, I., Kulbachinskiy, A., Kochetkov, S., and Khandazhinskaya, A. (2023) Nucleoside analogs that inhibit SARS-CoV-2 replication by blocking interaction of virus polymerase with RNA, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 3361, <https://doi.org/10.3390/ijms24043361>.
40. Zhilina, E., Miropolskaya, N., Bass, I., Brodolin, K., and Kulbachinskiy, A. (2011) Characteristics of sigma-dependent pausing in RNA polymerases from *E. coli* and *T. aquaticus*, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1348-1358, <https://doi.org/10.1134/S0006297911100038>.
41. Zhilina, E., Esyunina, D., Brodolin, K., and Kulbachinskiy, A. (2012) Structural transitions in the transcription elongation complexes of bacterial RNA polymerase during sigma-dependent pausing, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 3078-3091, <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1158>.
42. Petushkov, I., Esyunina, D., and Kulbachinskiy, A. (2017) σ^{38} -dependent promoter-proximal pausing by bacterial RNA polymerase, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 3006-3016, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1213>.
43. Leonard, G. A., Guy, A., Brown, T., Teoule, R., and Hunter, W. N. (1992) Conformation of guanine-8-oxoadenine base pairs in the crystal structure of d(CGCGAATT(O8A)GCG), *Biochemistry*, **31**, 8415-8420, <https://doi.org/10.1021/bi00151a004>.
44. Arnold, J. J., and Cameron, C. E. (2004) Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): pre-steady-state kinetic analysis of ribonucleotide incorporation in the presence of Mg^{2+} , *Biochemistry*, **43**, 5126-5137, <https://doi.org/10.1021/bi035212y>.
45. Arnold, J. J., Gohara, D. W., and Cameron, C. E. (2004) Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): pre-steady-state kinetic analysis of ribonucleotide incorporation in the presence of Mg^{2+} , *Biochemistry*, **43**, 5138-5148, <https://doi.org/10.1021/bi035213q>.
46. Huang, Y., Beaudry, A., McSwiggen, J., and Sousa, R. (1997) Determinants of ribose specificity in RNA polymerization: effects of Mn^{2+} and deoxynucleoside monophosphate incorporation into transcripts, *Biochemistry*, **36**, 13718-13728, <https://doi.org/10.1021/bi971609o>.
47. Ranjith-Kumar, C. T., Kim, Y. C., Gutshall, L., Silverman, C., Khandekar, S., Sarisky, R. T., and Kao, C. C. (2002) Mechanism of de novo initiation by the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase: role of divalent metals, *J. Virol.*, **76**, 12513-12525, <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12513-12525.2002>.
48. Te Velthuis, A. J. W., Arnold, J. J., Cameron, C. E., van den Worm, S. H. E., and Snijder, E. J. (2009) The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 203-214, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp904>.
49. Gottesman, M. E., Chudaev, M., and Mustaev, A. (2020) Key features of magnesium that underpin its role as the major ion for electrophilic biocatalysis, *FEBS J.*, **287**, 5439-5463, <https://doi.org/10.1111/febs.15318>.
50. Poranen, M. M., Salgado, P. S., Koivunen, M. R. L., Wright, S., Bamford, D. H., Stuart, D. I., and Grimes, J. M. (2008) Structural explanation for the role of Mn^{2+} in the activity of $\phi 6$ RNA-dependent RNA polymerase, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 6633-6644, <https://doi.org/10.1093/nar/gkn632>.
51. Vassilyev, D. G., Vassilyeva, M. N., Zhang, J., Palangat, M., Artsimovitch, I., and Landick, R. (2007) Structural basis for substrate loading in bacterial RNA polymerase, *Nature*, **448**, 163-168, <https://doi.org/10.1038/nature05931>.

EFFECT OF 8-OXO-1,*N*⁶-ETHENOADENINE DERIVATIVES ON THE ACTIVITY OF RNA POLYMERASES OF THE SARS-CoV-2 VIRUS AND *Escherichia coli*

I. V. Petushkov^{1,2*#}, A. V. Aralov^{3,4#}, I. A. Ivanov^{3,5}, M. S. Baranov^{3,6},
T. S. Zatsepin⁷, and A. V. Kulbachinskiy^{1,2*}

¹ National Research Centre "Kurchatov Institute",
123182 Moscow, Russia; e-mail: telomer1@rambler.ru, avkulb@yandex.ru

² Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

³ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
117997 Moscow, Russia

⁴ RUDN University, 117198 Moscow, Russia

⁵ LLC "Organicum", 127486 Moscow, Russia

⁶ Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow, Russia

⁷ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Bacterial and viral RNA polymerases are promising targets for the development of new transcription inhibitors. One of the potential blockers of RNA synthesis is 7,8-dihydro-8-oxo-1,*N*⁶-ethenoadenine (oxo-εA), a synthetic compound that is a combination of two modifications of adenine: 8-oxoadenine and 1,*N*⁶-ethenoadenine. In this study we synthesized oxo-εA triphosphate (oxo-εATP) and showed that it could be incorporated by RNA-dependent RNA polymerase of the SARS-CoV-2 virus into the synthesized RNA opposite template residues A and G in the presence of Mn²⁺ ions. In the case of *Escherichia coli* RNA polymerase, the incorporation occurred opposite A residues in the template DNA strand. If oxo-εA was present instead of adenine in the template DNA strand, transcription was completely stopped at the site of modification. At the same time, oxo-εATP did not suppress RNA synthesis by both RNA polymerases in the presence of unmodified nucleotides. Thus, oxo-εA modification significantly disrupts the template properties of the nucleotide during RNA synthesis by RNA polymerases of different classes, and the corresponding nucleotide derivatives are not potential antiviral or antibacterial transcription inhibitors.

Keywords: modified nucleobases, RNA polymerase, transcription, transcription inhibitors, SARS-CoV-2