

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Д. І. Остапченко
І. В. Компанець
Т. Б. Синельник

**БІОЛОГІЧНІ МЕМБРАНИ
І ВНУТРІШНЬОКЛІТИННА
СИГНАЛІЗАЦІЯ
МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

Навчальний посібник

УДК 577.352:576.314(075.8)
ББК 28.071:28.05я73
О76


Рецензенти:
д-р біол. наук, проф. В. К. Рибальченко
д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН України С. О. Костерін

*Рекомендовано до друку
вченою радою ННЦ "Інститут біології"
(протокол № 10 від 14 квітня 2014 року)*

*Ухвалено науково-методичною радою
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
23 квітня 2014 року*

Остапченко Л. І.


О76 Біологічні мембрани та основи внутрішньоклітинної сигналізації: методи дослідження : навч. посіб. / Л. І. Остапченко, І. В. Компанець, Т. Б. Синельник. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2017. – 447 с.

ISBN 978-966-439-

Описано методи дослідження структури та функцій клітинних мембран і компонентів сигнальних систем – від найдавніших до найсучасніших, наведено порівняльну характеристику цих систем. Охарактеризовано основні біофізичні та біохімічні методи вивчення будови мембран, описано методи виділення мембран та визначення компонентів клітинних сигнальних систем. Значну увагу приділено теоретичним засадам використання методів дослідження біомембран і клітинних сигнальних систем.

Для студентів-біологів вищих навчальних закладів, магістрів і аспірантів медико-біологічних спеціальностей, науковців.

**УДК 577.352:576.314(075.8)
ББК 28.071:28.05я73**

ISBN 978-966-439-

Остапченко Л. І., Компанець І. В., Синельник Т. Б., 2017
© Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ВПЦ "Київський університет", 2017

УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ УКРАЇНОМОВНИХ ТЕРМІНІВ

АДФ	Аденозиндифосфат
АМФ	Аденозинмонофосфат
АТФ	Аденозинтрифосфат
БЛМ	Бімолекулярна ліпідна мембрана
БСА	Бичачий сироватковий альбумін
в/о	вага/об'єм
КД	Коловий (циркулярний) дихроїзм
НАД	Нікотинаміддинуклеотид
НАДФ	Нікотинаміддинуклеотидфосфат
НСТ	Нітросиній тетразолій
ПОЛ	Пероксидне окиснення ліпідів
СОД	Супероксиддисмутаза
ТБК	Тіобарбітурова кислота
ФМС	Феназинметасульфат
ХДНБ	2,4-динітробензол
ХДНБ	1-хлоро-2,4-динітробензол
РІЗ-кіназа	Фосфатидилінозитол-3-кіназа

УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ АНГЛОМОВНИХ ТЕРМІНІВ З ПОЯСНЕННЯМИ

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітка
2',5'-OAS	2',5'-oligoadenylate synthase	2',5'-оліго-аденілатсинтеза	Інтерферон-індукований фермент, який активується клітинною або вірусною двоспиральною РНК і синтезує 2'5'-олігоаденілати
2',5'-OAS	2',5'-oligoadenylate synthetase	2',5'-оліго-аденілатсинтеза	Один із ключових ферментів, що індукується інтерфероном, бере участь в антивірусному захисті клітин
2',5'-OA	2',5'-oligoadenylate	2',5'-оліго-аденілат	Вторинний посередник системи інтерферону, синтезується ферментом 2',5'-олігоаденілатсинтезазою
4CN	4-chloro-1-naphthol	4-хлоро-нафтол	Субстрат для пероксидази хрому, що використовується в методі ELISA

Продовження

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітка
4-MUP	4-methylumbelliferyl phosphate	4-метил-умбеліферил-фосфат	Флуорогенний субстрат для лужної фосфатази, що використовується в методі флуоресцентного ELISA
ABTS	2,2'-azino-di [3-ethylbenzthiazoline] sulfonate	2,2'-азино-ди [3-етилбензтіазолін] сульфонат	Субстрат для пероксидази хрому, що використовується в методі ELISA
APC	Allophycocyanin	Алофікоціанін	Світлозбирний білок, що належить до родини фітобіліпротеїнів
DAB	3,3',4,4' diaminobenzidine,	3,3',4,4'-діамінобензидин	Субстрат для пероксидази хрому, що використовується в методі ELISA
DNP	2,4-dinitrophenol	2,4-динітрофенол	Іонофор, що використовується для вивчення процесів мембранного транспорту та як FRET-акцептор
ELFIA	Fluorescent immunoassays	Флуоресцентний ELISA	Варіантом методу ELISA, у якому використовуються флуорогенні субстрати
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Імуноферментний аналіз	Метод, що базується на взаємодії імунних комплексів (антигенів і антитіл), які ковалентно зв'язані з ферментними мітками

Продовження

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітка
ELISPOT	Enzyme-Linked ImmunoSpot		Метод – модифікація "сендвіч"-ELISA, який дозволяє оцінити здатність окремих клітин секретувати цитокіни
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching	Відновлення флуоресценції після фотознебарвлення фотовипалювання	Метод, який застосовується для вивчення рухливості біомолекул шляхом ініціації фотохімічного розпаду флуорохрому в зоні опромінення
FRET	Fluorescence resonance energy transfer, Förster resonance energy transfer	Флуоресцентне резонансне перенесення енергії	Явище передачі енергії шляхом флуоресцентного резонансу
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа	Фермент гліколізу, який окиснює гліцеральдегід-3-фосфат до 1,3-дифосфогліцерату
GPCR	G protein-coupled receptor	Рецептори, зв'язані з G-білками	Родина рецепторів, що містять 7 трансмембранних доменів і, взаємодіючи з позаклітинними лігандами, активують внутрішньоклітинні процеси трансдукції сигналу
GSH		Відновлений глутатіон	Субстрат глутатіонпероксидази
GSSG		Окиснений глутатіон	Продукт дії глутатіонпероксидази

Продовження

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітка
GST	Glutathione-S-transferase	Глутатіон-S-трансфераза	Фермент, що активує тиольну групу відновленого глутатіону з приєднанням його до ксенобіотика
HPLC	High-performance liquid chromatography	Високо-ефективна рідинна хроматографія	Метод розділення компонентів суміші за рахунок вандерваальсових взаємодій на межі поділу фаз
HPPA	3-p-hydroxyphenylpropionic acid	3-р-гідроксифенілпропіонова кислота	Флуорогенний субстрат для пероксидази хрому
HTRF	Homogeneous Time-Resolved Fluorescence	Гомогенний метод флуоресценції, розділеної в часі (синонім – TR-FRET)	Технологія, що поєднує методи FRET і TRF, у якій вимірювання інтенсивності флуоресценції проводиться з розділенням у часі вимірювання флуоресценції у збільшеному часовому діапазоні
HTS	High throughput screening	Високопродуктивний скринінг	Методи, які дозволяють проводити визначення просто і швидко, з високою чутливістю і точністю

Продовження

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітка
IFN	Interferon		Родина багатofункціональних цитокінів, які беруть участь в антивірусному захисті, контролі клітинної проліферації, активації імунної системи
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate	Інозитол-1,4,5-трифосфат	Вторинний посередник у кальцій-поліфосфоінозитольній сигнальній системі
IU	International Unit	Міжнародна одиниця	Одиниця вимірювання вмісту сполуки, маси й об'єму, що відповідає одній міжнародній одиниці, і використовується для виразу вмісту гормонів, вітамінів, медичних препаратів, вакцин та різних біологічно активних речовин
LANCE	Lanthanide chelate excite		Модифікація методу TR-FRET
LUV	Large unilamellar vesicles	Великі моноламельярні везикули	Везикули, сформовані одинарним бішаром, діаметр яких становить 100–200 мкм

Продовження

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітка
MCA	7-methoxycoumarin-4-acetic acid	7-метоксикумарин-4-оцтова кислота	Пептидний субстрат флуоресцентний донор
MDA	Malondialdehyde	Малоновий діальдегід	Продукт пероксидного окиснення ліпідів
MLV	Multilamellar vesicles	Мультиламелярні везикули	Везикули, що можуть складатися із 10 шарів, діаметр становить від 1 до 2 мкм діаметр
NLC	Nanostructured lipid carriers	Наноструктурні ліпідні носії	Ліпідні наночастинки із суміші рідких (олій) і твердих ліпідів, друге покоління ліпідних наночастинок
NMR	Nuclear magnetic resonance	Ядерний магнітний резонанс	Метод, що базується на резонансному поглинанні або випромінюванні електромагнітної енергії речовиною, що містить ядра з ненульовим спіном у зовнішньому магнітному полі за рахунок переорієнтації магнітних моментів ядер
OPD	o-Phenylenediamine	o-Фенілендіамін	Субстрат для пероксидази хрому, що використовується в методі ELISA

Продовження

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітка
PDE	Phosphodiesterase	Фосфодіестераза	Фермент, що гідролізує фосфодієфірний зв'язок
PEG	Polyethylene glycol	Поліетиленгліколь	Водорозчинний полімер, сильний осмотик, який використовується для створення поверхні у водному і неводному середовищах
PEI	Polyethylenimine	Поліетиленімін	Полімер з повторюваних одиниць, які містять аміногрупи та дволанцюговий карбоновий спейсер CH_2CH_2 , має полікатионну природу й використовується для хроматографії, як детергент, для трансфекції та фіксації CO_2
PKC	Protein kinase C	Протеїнкіназа C	Ca^{2+} -фосфоліпідзалежна протеїнкіназа, яка активується Ca^{2+} , діацилгліцеролом і фосфоліпідом
p-NPP	p-Nitrophenyl-phosphate	p-Нітрофенілфосфат	Субстрат для лужної фосфатази, що використовується в методі ELISA

Продовження

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітка
PVDF-мембрана	Polyvinylidene difluoride-membrane	Полівініл-ідендифлуоридна мембрана	Високоінертний очищений термопластичний полімер, який використовується для іммобілізації білків у методах Western-блотингу та ELISPOT
RIA	Radioimmunoassay	Радіоімунний аналіз	Метод, що базується на конкуренції між радіоактивним і нерадіоактивним антигеном за зв'язування з фіксованою кількістю специфічних антитіл
SDS	Sodium dodecyl sulphate	Додецил-сульфат натрію	Натрієва сіль лаурилсірчаної кислоти, аніоноактивна поверхнево-активна сполука
SERS	Surface-enhanced Raman spectroscopy	Поверхнево-посилена раманівська спектроскопія	Метод, що дозволяє визначати світло, яке розсіюється окремими молекулами, котрі знаходяться біля поверхні наночастинок благородного металу

Продовження

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітка
SLN	Solid lipid nanoparticles	Тверді ліпідні наночастинки	Частинки із твердих ліпідів, стабілізованих в емульгуючий шар у водній дисперсії, ліпосоми нового покоління
SPA	Scintillation proximity assay		Радіометричний метод визначення різних біомолекул, у якому використовуються сцинтиляційні гранули, сигнал від яких зчитується на сцинтиляційному лічильнику
SSNMR	Solid-state NMR	Твердофазовий ЯМР	Вид ЯМР-спектроскопії, що базується на анізотропних взаємодіях
SUVs	Small unilamellar vesicles	Малі моноламельярні везикули	Везикули, сформовані одинарним бішаром, діаметр яких 25–50 нм
TBA	Thiobarbituric acid	Тіобарбітурова кислота	Сполука, яка використовується для визначення продуктів пероксидного окиснення ліпідів
TBARS Assay	Thiobarbituric acid reactive substances	Сполуки, що реагують з тіобарбітуровою кислотою	Визначення малонового діальдегіду з використанням тіобарбітурової кислоти

Продовження

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітка
TMB	3,3',5,5'-tetra-methylbenzidine	3,3',5,5'-тетраметил-бензидин	Субстрат для пероксидази хрому, що використовується у методі ELISA
TR-FRET	Time-Resolved FRET	Флуориметрія, розділена в часі (синонім – HTRF)	Технологія, що поєднує методи FRET і TRF, у якій вимірювання інтенсивності флуоресценції проводиться з розділенням у часі

ВСТУП

Вивчення структури й функціонування біологічних мембран і процесів внутрішньоклітинної сигналізації досі не втрачає своєї актуальності, оскільки є важливим для з'ясування не тільки механізмів клітинного метаболізму, а й для встановлення причин розвитку багатьох хвороб і пошуку шляхів їх лікування. Для цього необхідні методи, які б з високою точністю дозволили б оцінити структурно-функціональний стан мембран та активність тієї чи іншої сигнальної системи.

Методи дослідження весь час удосконалюються, на базі традиційних підходів (спектрофотометричні, радіоізотопні, хроматографічні, імунологічні методи) створюють нові високочутливі комбінації. Сьогодні увага дослідників приділяється створенню методів високопродуктивного скринінгу – HTS (High Throughput Screening), які дозволяють проводити визначення просто і швидко, з високою чутливістю і точністю. Вони необхідні для аналізу великої кількості зразків під час широкомасштабних досліджень, наприклад, при скринінгу інгібіторів протеїнкіназ, протеїнфосфатаз, фосфодіестераз. Такі дослідження важливі у фундаментальному плані як для з'ясування механізмів трансдукції сигналу, так і для діагностики хвороб та пошуку нових фармакологічних препаратів, які б впливали на ці системи. Відомо, що з порушеннями окремих компонентів систем сигнальної трансдукції пов'язано виникнення різноманітних захворювань (це хвороба Альцгеймера, виразка шлунка, рак, астма, хронічна обструктивна хвороба легень, порушення навчання та пам'яті, депресія, нейродегенеративні захворювання, аутоімунні хвороби, серцева недостатність, інфаркт міокарда тощо). Зокрема, протеїнкінази та протеїнфосфатази є важливими мішенями при пошуку нових лікарських препаратів. Тому розробка нових методів дослідження функціонування мембран і перебігу процесів трансдукції сигналу є важливим завданням сучасної біохімії. Популярними є гомо-

генні методи, які виконуються лише в декілька етапів, не потребуючи екстракції чи відмивання реагентів.

Одними із перших методів вивчення структури біомембран були методи мікроскопії. За допомогою просвічувальної електронної мікроскопії було вперше вивчено мембранні препарати. На підставі цього Дж. Робертсон у 1960 р. запропонував тришарову модель плазматичної мембрани (унітарну). Згодом С. Сінгер і Г. Ніколсон (1972) висунули теорію про рідинно-мозаїчну структуру мембрани. Сучасні варіанти електронно-мікроскопічних методів, такі як сканувальна (растрова) електронна мікроскопія, дозволили отримати об'ємні (тривимірні) зображення мембран. За допомогою динамічної фазової мікроскопії стало можливим не тільки отримати зображення слабоконтрастних субклітинних структур, а й спостерігати за їхньою поведінкою. Саме так вивчають динамічні процеси у клітині – мембранний транспорт за участю АТФаз, проведення збудження по нервовому волокну та ін. Застосування лазерної сканувальної конфокальної мікроскопії дозволило з високою роздільною здатністю та контрастом отримати зображення послідовних оптичних зрізів, провести об'ємну реконструкцію об'єкта й отримати його тривимірне зображення. З її допомогою вивчають будову клітинних органел, генів тощо. Завдяки високій роздільній здатності та контрасту, конфокальна мікроскопія використовується для вивчення структури клітин та їхніх органел – мітохондрій, ЕПР, лізосом, цитоскелета, ядра, хромосом і навіть генів. Також вона дає змогу досліджувати динамічні процеси в живих клітинах, (наприклад, зміни концентрації кальцію), не порушуючи їхньої цілісності. Метод конфокальної мікроскопії поєднують з технологією FRET (флуоресцентного резонансного перенесення енергії), у якій застосовують флуоресцентні мітки, за допомогою якої вивчають клітинні біохімічні процеси в реальному часі.

Спектроскопія комбінаційного розсіювання світла (раманівська спектроскопія) дала можливість отримати дані про молекулярну будову ультраструктурних компонентів клітини. Новий підхід на базі цього методу – метод SERS дозволив визначати поодинокі молекули, установити взаємне розташування мембранних білків, спостерігати за вивільненням нейротрансмітерів на рівні однієї клітини. Атомно-силовою мікроскопією вивчає струк-

туру й функціонування мембрани, оцінюючи фізичні властивості її поверхні. При переміщенні сканувального зонда отримують тривимірне топографічне зображення поверхні мембрани. З її допомогою визначають розподіл поверхневого потенціалу на мембранах, еластичність і мобільність мембранних шарів, вивчають процеси клітинної адгезії, локалізацію рецепторів на мембрані.

Флуоресцентна спектроскопія є широкоживаним методом дослідження не тільки структури й функцій біологічних мембран, а й процесів внутрішньоклітинної сигналізації, діагностики біохімічних порушень у клітинах. Використовуючи флуоресцентні зонди, було з'ясовано просторову організацію молекул біомембран, вивчено динаміку білок-ліпідних взаємодій, взаємодію лігандів з мембранними рецепторами, процеси пероксидного окиснення ліпідів, флуктації внутрішньоклітинного Ca^{2+} . Зонди, що зв'язуються з різними клітинними органелами, застосовуються для вивчення широкого спектра процесів (мітозу, апоптозу, внутрішньоклітинного транспорту, детоксикації). На базі флуоресцентних барвників створено системи для вивчення компонентів клітинних сигнальних систем (аденілатциклазної, гуанілатциклазної, інозитолфосфатної, тирозинового фосфорилування, каскаду MAP-кіназ та ін.). Флуоресцентна детекція сигналу в методах імуноферментного аналізу, імуноблотингу, технології FRET дозволяє з високою чутливістю і специфічністю визначати найрізноманітніші молекули (від вторинних посередників до ферментів протеїнкіназ, фосфатаз).

Флуоресцентне резонансне перенесення енергії (FRET) базується на прямому перенесенні енергії від однієї молекули до іншої, що супроводжується змінами флуоресценції. Його використовують для дослідження міжмолекулярних взаємодій у межах декількох нанометрів, що дає можливість вивчати процеси внутрішньоклітинної сигналізації на принципово новому рівні. За допомогою FRET досліджують динаміку клітинних мембран, функціонування рецепторів у білок-білкових взаємодіях, сигнальну трансдукцію, відстежуючи ці процеси в реальному часі. Метод HTRF (Homogeneous Time-Resolved FRET) – флуориметрія, розділена в часі – дозволив вимірювати флуоресценцію у більш тривалих часових проміжках, що зменшило фонову флуоресценцію. На його базі створено цілий ряд систем для ви-

значення молекулярних комплексів різного розміру: від низкомолекулярних сполук до великих білків. Таким методом вивчають вміст та активність ключових компонентів систем трансдукції сигналу: цАМФ, цГМФ, інозитол-1,4,5-трифосфату й інозитол-1-фосфату, фосфатидилінозитол-3-кінази, Akt кінази, тирозинпротеїнкінази, тирозинпротеїнфосфатази, TNF- α , STAT тощо. Нова модифікація методу TR-FRET – LANCE® Ultra спрямована на більш ефективне визначення завдяки використанню пептидних субстратів, мічених барвником ULight™. З його допомогою розраховують активність ферментів протеїнкіназ і протеїнфосфатаз, вивчають активацію рецепторів спряжених із G-білками, зв'язування лігандів з рецепторами, концентрацію цАМФ тощо.

Метод електронного парамагнітного резонансу (ЕПР), який реєструє спектр спінового зонда за його дуже малих концентрацій, використовується для дослідження динаміки мембран, зокрема фазових переходів ліпідів, просторової структури мембранних білків та їхньої молекулярної динаміки. ЯМР-спектроскопія, що базується на явищі ядерно-магнітного резонансу, дала можливість з'ясувати просторову організацію компонентів мембран, вивчити динаміку ліпідів і білків та білок-ліпідні взаємодії, що беруть участь у регуляції функціонування трансмембранних білків та іонних каналів. Новий метод твердофазового ЯМР (solid-state NMR) дозволив вивчати структуру й орієнтацію інтегральних мембранних білків не тільки в очищеному вигляді, а також у складі міцел і ліпідних везикул. Було створено системи експресії для отримання радіоактивно мембранних мічених білків з метою їхнього подальшого дослідження методом ЯМР. Отримані білки очищали й реконструювали в детергентні міцели. За допомогою такого підходу було здійснено картування мембранної топології інтегральних білків.

Метод радіоактивних ізотопів широко застосовують для дослідження як структури клітинних мембран, так і процесів внутрішньоклітинної сигналізації. Радіоактивні мітки, приєднані до різних сполук ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{АТФ}$, $[\gamma^{32}\text{P}]\text{АТФ}$, $[\text{32P}]\text{цГМФ}$, $[\text{3H}]\text{цАМФ}$, $[\text{3H}]\text{АТФ}$), використовуються для визначення вмісту та активності багатьох молекул сигнальних систем. Методом радіорецепторного зв'язування, який базується на конку-

ренції між досліджуваною сполукою та її міченим аналогом за зв'язування з білком, вивчають, наприклад, інозитолфосфати, цАМФ та цГМФ. Методом радіоімунного аналізу, у якому мітки (зазвичай I125) приєднують до специфічних антитіл, завдяки чому виявляють молекули з більшою специфічністю. Випускають набори для визначення цАМФ, цГМФ, гуанілатциклази, кальмодуліну, 2',5'-олігоаденілатів. Новою розробкою є радіоактивний метод SPA (Scintillation proximity assay), у якому використовуються сцинтиляційні гранули, при зв'язуванні з якими радіоактивно мічених молекул виникає світловий сигнал, який зчитується сцинтиляційним лічильником. Методом SPA визначають цілий ряд низькомолекулярних сполук і ферментів систем трансдукції сигналу (цАМФ, цГМФ, фосфодіестеразу циклічних нуклеотидів, інозитолфосфати), досліджують зв'язування лігандів з рецепторами. Метод FlashPlate є новою модифікацією радіоімунного аналізу, він придатний для високоефективного скринінгу великої кількості молекул, наприклад рецепторів, зв'язаних з G-білками, та вивчення дії агоністів і антагоністів. У цьому методі застосовують мікропланшети, лунки яких укриті речовиною, здатної до сцинтиляції. Це дозволяє використовувати цілий ряд радіоактивних ізотопів (3H, 125I, 14C і 33P) без відмивання і без додавання сцинтиляційної рідини. Таким чином визначають фосфоліпазу C, аденілатциклазу, фосфодіестеразу циклічних нуклеотидів.

Метод диференційної сканувальної калориметрії дав змогу досліджувати зміни просторової структури молекул мембран за теплом, яке вони виділяють чи поглинають. Було отримано дані про фазові переходи ліпідів, взаємодію фармакологічних препаратів з мембранами, транспорт протиракових препаратів гідрофобної природи у складі ліпідних везикул.

Метод колового дихроїзму, що базується на залежності коефіцієнта поглинання світла від напрямку колової поляризації, використовується для вивчення структури мембранних білків. Він дозволяє виявити, який тип їхньої просторової структури переважає в мембранах.

Рентгенівська і нейтронна спектроскопія забезпечує зондування мембран у реальному часі, завдяки чому стає можливим аналіз деталей просторової структури й динаміки на атомному

рівні, а також моделювання процесів функціонування мембран. При цьому структура мембрани не руйнується. За допомогою нейтронів і рентгенівських променів широко досліджуються штучні мембрани (везикули), які можуть бути використаними в нанобіотехнології як переносники ліків.

Для вивчення структурних компонентів мембран застосовуються різноманітні біохімічні методи. Ліпіди досліджують за допомогою фракціонування за розчинністю в різних розчинниках, колонкової хроматографії на силікагелі та оксиді алюмінію, тонкошарової хроматографії та HPLC – високоефективної рідинної хроматографії. Жирноокислотний склад ліпідів оцінюють методом капілярної газової хроматографії та комбінації газової хроматографії з мас-спектрометрією. Сьогодні ці методи суттєво вдосконалено, вони є високоефективними і підлягають автоматизації.

Застосування імунологічних методів допомагає отримати інформацію про вміст різних біологічно важливих ліпідів, присутніх у клітинних мембранах, а також про білок-ліпідні взаємодії за участю білків – компонентів клітинних сигнальних систем. В останні роки створено методи виділення та аналізу не тільки загальної фракції ліпідів мембран, а й мембранних рафтів.

Розроблено цілий ряд методів дослідження процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Найдавніші методи визначення маркерів ПОЛ (ТБК-активних продуктів, основ Шиффа та дієнових кон'югатів, активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази)) сьогодні вдосконалюються і широко використовуються. Сучасними методами є аналіз оксистеролів, F(2)-ізопростанів і окиснених фосфоліпідів за допомогою газової та рідинної хроматографії, мас-спектрометрії та визначення 4-гідроксинаноналю імунними методами.

Для дослідження процесів сигнальної трансдукції використовується широкий спектр біохімічних і біофізичних методів. Кожен із компонентів цих систем можна визначити декількома різними методами. Так, для визначення активності протеїнкіназ застосовують такі методи, як радіоактивні, ферментативні, імуноферментного аналізу (непряний, "сендвіч"-метод) з використанням фосфоспецифічних субстратів, методи імуноблотингу, флуориметричні методи, у яких використовують антитіла

до пептидного субстрату, мічені флуоресцентною міткою, методи HTRF, що базуються на флуоресцентно резонансному перенесенні енергії, методи AlphaScreen.

У пропонованому виданні описано всі перераховані вище методи дослідження структури та функцій клітинних мембран і компонентів сигнальних систем – від найдавніших до найсучасніших. Наведено порівняльну характеристику таких методів, приділяючи увагу їхній чутливості, специфічності, вартості, трудомісткості, можливості автоматизації, придатності до використання у наукових дослідженнях або з діагностичною метою.

У посібнику охарактеризовано основні біофізичні та біохімічні методи, які використовуються для вивчення будови мембран, просторової організації структурних компонентів, динаміки, взаємодії з лігандами, участі у процесах передачі сигналу. Описано методи виділення біологічних мембран та їхні характеристики за спектром маркерних ферментів, методи дослідження ліпідів і білків біологічних мембран, включаючи способи реконструкції останніх, розглянуто модельні мембранні системи: моношари та плоскі бішарові мембрани, ліпосоми й нанодиски, їх отримання і використання.

У книзі наведено методи визначення компонентів клітинних сигнальних систем: цАМФ- та цГМФ-залежних сигнальних систем, інозитолфосфатної сигнальної системи, системи тирозинового фосфорилування, сигнального шляху MAPK/ERK, системи оксиду азоту та систем трансдукції сигналу цитокінів (інтерлейкіну 1 β , інтерлейкіну 6, інтерферону).

Ураховуючи, що у виданні значну увагу зосереджено на теоретичних засадах використання методів дослідження біомембран і клітинних сигнальних систем, авторами наведено чималий список літератури, включаючи оригінальні роботи щодо розроблення та вдосконалення описаних методик – від найперших до найсучасніших вітчизняних та іноземних публікацій.

Пропонований навчальний посібник рекомендовано широкому загалу читачів: студентам біологічних і медичних спеціальностей вищих навчальних закладів, а також аспірантам і науковим співробітникам, робота яких пов'язана з дослідженням біологічних мембран і процесів внутрішньоклітинної сигналізації.

Розділ 1

БІОФІЗИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ МЕМБРАН І СИГНАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

1.1. ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ

Електронна мікроскопія дозволяє вивчати мікроструктуру клітинних мембран при збільшеннях до сотень тисяч разів (навіть до атомно-молекулярного рівня) та вивчити їхній локальний склад. В електронному мікроскопі використовується замість світлового потоку пучок електронів з енергіями 200 В–400 кев і має в 1000 разів більшу роздільну здатність (навіть до 1 Å) порівняно зі світловим мікроскопом. Такий прилад дозволяє отримати зображення зі збільшенням до 10^6 разів. До складу електронного мікроскопа входять магнітні лінзи, що спрямовують рух електронів за допомогою магнітного поля.

Просвічувальний (трансмисійний) електронний мікроскоп за допомогою катоду створює електронний пучок, який прискорюється до +200 кеВ і фокусується системою магнітних лінз. При проходженні його крізь зразок частина електронів розсіюється на ньому, що дає інформацію про структуру зразка. Пучок проходить крізь систему збільшуючи лінз, і на люмінесцентному екрані або CCD-камері (Charge-Coupled Device) формується зображення. CCD-матриця (англ., Charge-Coupled Device) являє собою аналогову інтегральну мікросхему, що складається із світлочутливих фотодіодів на базі кремнію і виробляється компаніями Canon, Sony, Fujitsu, Kodak, Philips. Зображення із цифрової камери передається на комп'ютер, де на екрані монітора його можна обробляти різними способами (змінювати збільшення,

контрастність зображення, застосовувати денситометрію, морфометрію окремих компонентів), а також друкувати отримані зображення. Недоліком просвічувальної електронної мікроскопії є необхідність отримання дуже тонкого зразка – ультратонкого зрізу товщиною близько 100 нм. При проходженні пучка електронів крізь об'єкт частина їх поглинається, а зразок нагрівається і швидко розкладається. При підготовці зразка клітини і тканини спочатку фіксують за допомогою розчинів глютарового альдегіду або чотириоксиду осмію, який контрастує клітинні структури. Після зневоднення зразок просочують епоксидними смолами в рідкій мономерній формі. Після того, як такі пластмаси полімеризуються, просочений ними об'єкт набуває вигляду твердих блоків, які можна різати на тонкі зрізи.

Метод просвічувальної електронної мікроскопії було застосовано для найперших досліджень структури біомембран. У 1960 р. Дж. Робертсоном було запропоновано теорію тришарової будови плазматичної мембрани, яку назвали унітарною. Мембранні препарати обробляли чотириоксидом осмію і отримували зображення двох смуг, розділених проміжком 80 Å. Із застосуванням методу заморожування-сколювання було показано, що на відколі мембрани є горбики та ямки. Це свідчило про те, що при приготуванні зразка мембранні білки не розщеплювалися, а відходили цілком в один із шарів мембрани. На основі цих даних у 1972 р. С. Сінгером і Г. Ніколсоном була висунута гіпотеза, що мембрана має рідинно-мозаїчну будову.

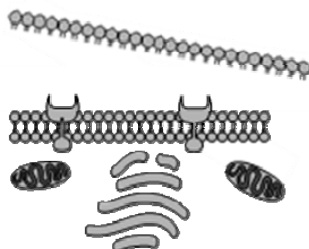
Методи заморожування-сколювання і метод заморожування-травлення дозволили ефективніше оцінити структуру біомембран. Перевагою цих методів є те, що при швидкому заморожуванні вони не пошкоджуються. Клітини заморожують за температури рідкого азоту ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), а потім за тієї ж температури переносять у спеціальну вакуумну установку. Такий заморожений об'єкт механічно сколюють охолодженим ножом (піддають сколюванню) (рис. 1.1). Зазвичай відкол проходить крізь гідрофобну частину мембранного ліпідного бішару, тому він розділяється на два моношари. У вакуумі частину води, що набула склоподібної форми, переганяють ("травлення"), а поверхню відколу, що відкривається, покривають тонким шаром випареного вуглецю, а потім металу (платини). Таким чином із замо-

роженого зразка, який зберіг свою прижиттєву структуру, отримують репліку із його відколу. Потім за тих самих умов при кімнатній температурі зразок розчиняють у кислотах, при цьому плівка-репліка залишається цілою. Після цього її вивчають в електронному мікроскопі.

1. Заморожений біологічний зразок



2. Відкол мембрани



4. Оброблення SDS після мічення золотом



Маркер – золото

3. Платинова / вугільна репліка

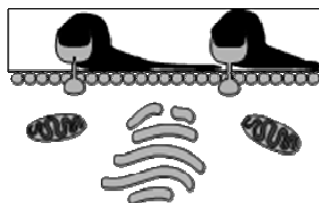


Рис. 1.1. Вивчення структури плазматичної мембрани методом заморожування-сколювання: 1 – заморожування біологічного зразка, 2 – отримання замороженого відколу, 3 – наплення під кутом атомами вуглецю або платини та отримання реплік

На мембранних сколах можна побачити поодинокі або розташовані групами структури розміром 8–10 нм. Було зроблено висновок, що вони являють собою білки мембран. Виявилось, що такі білки не обов'язково зв'язані з обома шарами мембрани, оскільки репліки неоднакові. Методом заморожування-сколювання можна отримати репліки зі сколів нативних зразків, що дозволяє досліджувати рельєф поверхні мембран клітини, чого

не можна досягти іншими методами. Цей метод дозволив побачити, що на поверхні та в товщі клітинних мембран розташовуються глобули інтегральних білків, а також те, що мембрани неоднорідні за своєю структурою.

Крім просвічувальної мікроскопії, для дослідження клітинних мембран ефективно застосовують *сканувальну (растрову) електронну мікроскопію*. Метод дозволяє вивчати тривимірну поверхню клітини. Тонкий пучок електронів (зонд) пробігає по поверхні об'єкта, отримана інформація передається на електронно-променеву трубку. Зображення можна отримати у відбитих або вторинних електронах. Об'єкт фіксують і висушують, після чого покривають тонким шаром випареного металу (найчастіше золота). Електрони, які відбиваються від його поверхні, потрапляють у приймальний пристрій, який передає сигнал на електронно-променеву трубку. Фокус сканувального мікроскопа має величезну глибину, набагато більшу, ніж у просвічувального. Це дозволяє отримати тривимірне зображення досліджуваної поверхні.

1.2. ДИНАМІЧНА ФАЗОВА МІКРОСКОПІЯ

Динамічна фазова мікроскопія є новим напрямом у *когерентній фазовій мікроскопії*. Традиційні методи мікроскопії дають обмежені дані про динаміку внутрішньоклітинних процесів. Методи когерентної фазової чи інтерференційної мікроскопії, завдяки властивостям фазових зображень, дозволили докладно вивчати слабкоконтрастні біологічні об'єкти, зокрема клітини, їхні органели та дрібні структурні компоненти, не порушуючи їхньої цілісності, а також спостерігати за динамічними процесами, що відбуваються в них. Зображення, отримані цими методами, виглядають як розподіл фізичної величини – оптичної різниці ходу, що залежить від структури і властивостей об'єкта. Фазове зображення об'єкта (топограму) отримують шляхом сканування координатно-чутливим фотоприймачем (дисектором) інтерференційного зображення у вигляді двовимірного розподілу оптичної різниці ходу. Фаза хвилі, що проходить крізь об'єкт, визначається компенсаційним методом часових інтервалів у кожній точці зображення.

Метод динамічної фазової мікроскопії застосовують при неінвазивних дослідженнях внутрішньоклітинних процесів. За його допомогою було отримано інформацію про просторові й часові характеристики метаболічних процесів у різних клітинах (Іванов, 2007). Метод є високочутливим до зміни показника заломлення і параметрів структури біооб'єктів. Він дозволив отримувати їхні спектрально-просторові характеристики, надаючи інформацію не тільки про структуру, а й про динамічні характеристики біооб'єктів. Динамічні процеси у клітині реєструються у вигляді трек-діаграм у точках фіксованої на топограмі лінії.

На базі інтерференційного мікроскопа було розроблено комп'ютерні фазові мікроскопи. Як джерело когерентного випромінювання використовується однострумний гелієво-неоновий лазер з довжиною хвилі 632,8 нм (рис. 1.2). Вони мають високу чутливість до змін оптичної різниці ходу та інтерферуючих променів. Завдяки цьому стало можливим вивчати динамічні процеси в клітині з часі роздільною здатністю до 1 мс і просторовою роздільною здатністю до 100 нм (Тычинский, 2001). Сигнал, що реєструється у довільних точках об'єкта, обробляється за допомогою комп'ютерних програм з отриманням статистичних характеристик.

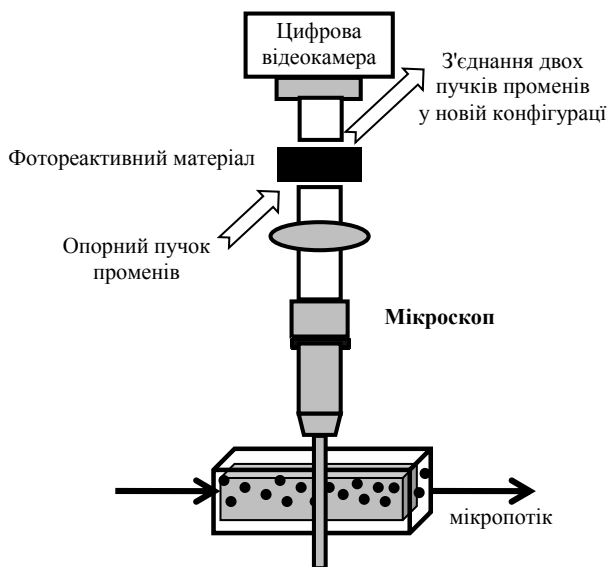


Рис. 1.2. Принцип динамічної фазової мікроскопії

Методом динамічної фазової мікроскопії було зареєстровано ритмічну відповідь мембранних структур мієлінового волокна під час пролонгованого збудження, вивчено роботу ферменту АТФази, вбудованого в мембрану ліпосоми, та вплив АТФ на флукуації оптичної різниці ходу в мембранах мітохондрій, досліджено процеси у клітинах на різних стадіях клітинного циклу.

На базі методу динамічної фазової мікроскопії розроблено растровий метод реєстрації динамічних процесів. Він дозволяє виявляти ділянки динамічної активності на фазових зображеннях живих клітин та органел і дає можливість одночасно реєструвати структуру і локальні процеси у клітині. В основу методу покладено нещодавно відкриту властивість растрових зображень, а саме можливість розділення просторових і часових характеристик об'єкта. Недоліком методу динамічної фазової мікроскопії є те, що реєстрація динамічних процесів проводиться тільки в точках заздалегідь обраної лінії (скан-лінії) на фазовому зображенні об'єкта.

Растровий метод реєстрації динамічних процесів дозволив одночасно отримувати інформацію в реальному часі про локалізацію та інтенсивність динамічних процесів у живих клітинах на всьому фазовому зображенні клітини в ділянках зображення розмірами 20×20 нм із часовим інтервалом 1 мс.

Растровим методом реєстрації динамічних процесів можна проводити діагностику функціонального стану клітин та їхніх органел. Так, цим методом було зареєстровано процеси секреції цитокінів активованими Т-лімфоцитами у відповідь на дію сигнальних молекул на рецептори їхніх мембран. На фазових зображеннях цих клітин було локалізовано динамічні процеси з частотою понад 2 Гц та візуалізовано ділянки розмірами 500–400 нм, що мали тимчасовий характер. Через малі розміри сигнальні макромолекули неможливо було б виявити класичними оптичними методами.

Також цим методом було вивчено вплив стимуляторів (АТФ, ротенону) на мембранний потенціал ізольованих мітохондрій. Було отримано топограми мітохондрій при АТФ-стимуляції та виявлено їхні активні динамічні ділянки довжиною 100–200 нм. Аналіз профілів фазової товщини вздовж скан-лінії показав, що при АТФ-стимуляції зростає фазова товщина в мітохондрії. Автори пояснювали це роботою ферментів V комплексу й вищим мембранним потенціалом.

1.3. ЛАЗЕРНА СКАНУВАЛЬНА КОНФОКАЛЬНА МІКРОСКОПІЯ

Для вивчення живих клітин та їхніх компонентів нині використовується поєднання світлової мікроскопії (наприклад, фазовоконтрастної) з електронно-комп'ютерною обробкою зображення. Така обробка видаляє фонові рівні зображення і виділяє, контрастує досліджувані структури, які можна побачити на відеозаписі. Комп'ютерне оброблення дозволяє отримати інформацію про щільність субклітинних структур, їхні кількості та тривимірній організації (Patel, 2013). У поєднанні з флуоресцентною спектроскопією ці методи є надзвичайно перспективними для вивчення живих клітин (зокрема, функціонування їхніх мембранних структур).

Для отримання тривимірного зображення об'єктів використовують конфокальний сканувальний світловий мікроскоп. *Лазерна сканувальна конфокальна мікроскопія* сьогодні є важливим методом оптичної мікроскопії, який широко використовується в біології та медицині. Термін "конфокальна" означає "співфокусна", тобто конфокальна діафрагма розташована у площині, спряженій з фокальною площиною об'єктива, завдяки чому реєструється сигнал від тонкого шару. Отже, конфокальна мікроскопія має значно більший контраст за рахунок використання діафрагми, що відсікає потік фонового розсіяного світла (Nwaneshiudu, 2012). Звичайними методами світлової мікроскопії неможливо отримати тривимірне зображення, оскільки мікроскоп має невелику глибину різкості. Тому клітини розглядаються як оптичні розрізи на заданій глибині фокуса.

Конфокальний мікроскоп створює чітке зображення зразка, яке при використанні звичайного оптичного мікроскопа було б "розмитим". За допомогою такого приладу отримують серії послідовних оптичних зрізів, отриманих з різної глибини. Їхні зображення передаються на комп'ютер, після чого спеціальна програма реконструює тривимірне, об'ємне зображення об'єкта. У конфокальному мікроскопі світло реєструється тільки від однієї точки. Для цього після об'єктивної лінзи у приладі розміще-

на діафрагма малого розміру (рис. 1.3). Світло, що випромінюється аналізованою точкою, проходить крізь діафрагму й реєструється, світло від інших точок нею утримується. Конфокальний мікроскоп реєструє в кожний момент часу зображення однієї точки об'єкта. Тривимірне зображення отримують шляхом сканування зразка чи перебудови оптичної системи. За допомогою сканування збільшується поле зору порівняно із звичайними оптичними мікроскопами. Багатофункціональні лазерні сканувальні конфокальні мікроскопи виробництва Leica Microsystems Inc., Carl Zeiss AG тощо розроблені для роботи з живими біологічними об'єктами.

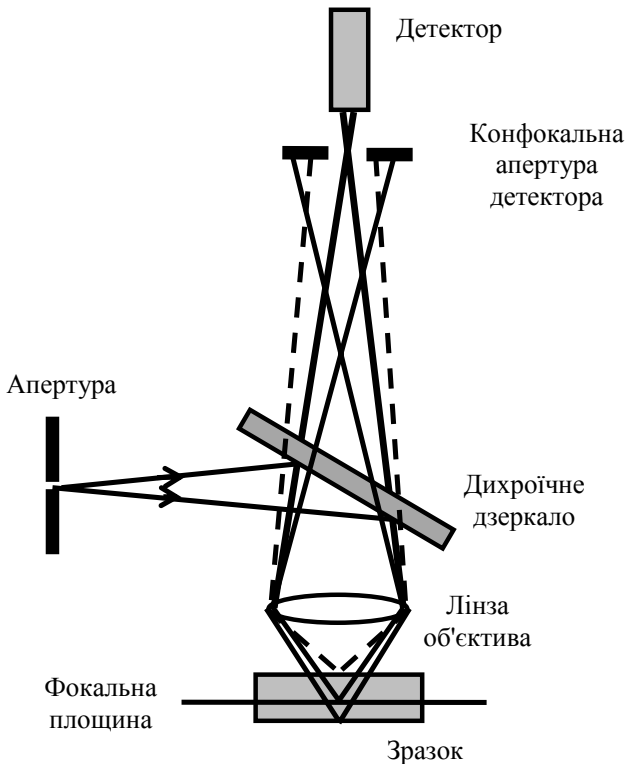


Рис. 1.3. Схема конфокального мікроскопа.

Розсіяне світло, що надходить із глибини зразка (зображено пунктирними лініями), відрізається діафрагмами, що надає зображенню високого контрасту

Показник заломлення біологічних об'єктів майже такий, як і у скла, через що спостереження за цими об'єктами у звичайному оптичному мікроскопі є утрудненим. Конфокальний мікроскоп має високий контраст, і тому дозволяє досліджувати тканини на клітинному рівні у стані фізіологічної життєдіяльності, а також дає змогу аналізувати результати дослідження клітинної активності в чотирьох вимірах (висота, ширина, глибина і час).

Завдяки високій роздільній здатності та контрасту, конфокальна мікроскопія використовується для вивчення структури клітин та їхніх органел (мітохондрій, ЕПР, лізосом, цитоскелета, ядра, хромосом і навіть генів) (Zaluzec, 2007). Ще одним завданням методу є дослідження динамічних процесів у живих клітинах, наприклад, мембранного транспорту, змін концентрації іонів кальцію. Перевагою конфокальної мікроскопії перед класичною оптичною мікроскопією є те, що для отримання зображення не потрібно проводити виготовлення та фотографування серійних гістологічних зрізів. Серія оптичних зрізів записується у пам'ять комп'ютера, після чого проводять об'ємну реконструкцію об'єкта та отримують його тривимірне зображення.

У методі конфокальної мікроскопії застосовують флуоресцентні технології – методи FRAP і FRET (див. підрозд. 1.6.3). Метод *FRAP* (Fluorescence Recovery After Photobleaching) – відновлення флуоресценції після фотознебарвлення (фотовипалювання), який застосовується для вивчення рухливості біомолекул шляхом ініціації фотохімічного розпаду флуорохрому в зоні опромінення, після чого він від'єднується від молекул. Потім молекули з флуорохромом унаслідок дифузії рухаються з неопроміненої зони зразка в опромінену. За часом зростання флуоресценції судять про рухливість молекул. Метод FRAP базується на фотознебарвленні певних ділянок клітини (розміром 5 мкм), яке порушує флуоресценцію цих ділянок. Відновлення флуоресценції в даній ділянці відображає тип транспортних процесів, які відбуваються в ній. Відновлення може бути викликано або дифузією, або притоком флуоресцентних молекул із незнебарвленого резервуара у знебарвлену ділянку мембрани чи цитоплазми. Технологія FRAP придатна для вивчення транспорту молекул на поверхні та всередині живих клітин, швидкості обміну молекул з відповідними структурами.

Флуоресцентне резонансне перенесення енергії (англ., fluorescence resonance energy transfer, Förster resonance energy transfer, *FRET*) – передача енергії шляхом флуоресцентного резонансу, застосовується для визначення відстані між молекулами різних типів, їхнього оточення та взаємодії. Молекули мітять двома флуорохромами зі спектром випромінювання донора, що перебивається зі спектром поглинання акцептора. Унаслідок резонансу між енергетичними рівнями від донора до акцептора енергія передається на малих відстанях у межах декількох нанометрів. Імовірність резонансу залежить від відстані між молекулами. Потім акцептор випромінює енергію у видимій ділянці спектра, яка реєструється конфокальним мікроскопом.

Для виконання досліджень методом FRET найпридатнішим є конфокальний мікроскоп, який дозволяє легко та якісно розділити близькі за характеристиками спектри. Розділення спектрів і визначення їхніх співвідношень дає можливість провести кількісний аналіз FRET. Застосування флуоресцентного мікроскопа в цьому випадку є менш ефективним, оскільки флуоресцентне випромінювання за межами площини фокуса може заважати широким дослідженням.

Конфокальна мікроскопія широко використовується для дослідження динамічних процесів у великих органелах, таких як мітохондрії та апарат Гольджі. Також за її допомогою вивчають білки плазматичної мембрани клітини, їхню субклітинну локалізацію та транспорт. Методом конфокальної мікроскопії було вивчено транспорт наночастинок крізь ліпідні мембрани. На моделі моношарових фосfolіпідних везикул досліджено бічні температурні флуктуації ліпідів.

Модифікацією методу конфокальної мікроскопії є також метод *Nipkow disk* (дисків Ніпкова), або *spinning-disk* (*спінінг-дисків*, тобто *дисків, що обертаються*,) (Oreopoulos, 2014), Диск Ніпкова – це механічний пристрій для сканування зображень, винайдений Паулем Ніпковим у 1884 р. У лазерному сканувальному конфокальному мікроскопі *Nipkow disk* з мікролінзами, розробленому компанією Yokogawa Electric Corporation, установлена система коаксіальних дисків, які мають спільну вісь (рис. 1.4). До їхнього складу входять мікролінзи, що спрямовують лазерний промінь у мікроот-

вори. Диски обертається зі швидкістю від 1800 до 5000 об./хв (rpm), що дозволяє сканувати 1000 кадрів за секунду. Зразок опромінюється лазером у низьких дозах. Оскільки світлові осі не переміщуються під час сканування, флуоресцентний сигнал дає реальне зображення, яке передається на цифрову камеру.

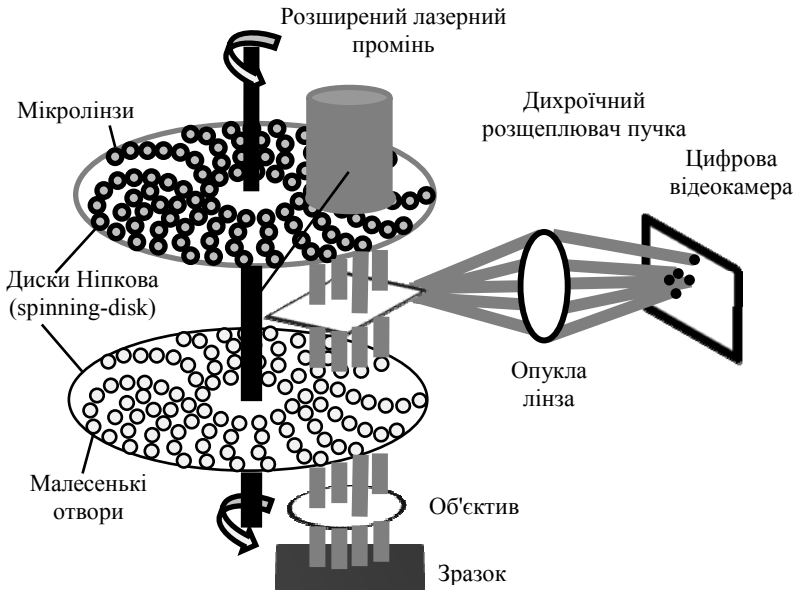


Рис. 1.4. Траєкторія пучка променів у конфокальному спінінг-дисковому мікроскопі

Методом *спінінг-дисків* вивчено динаміку мембранного транспорту у клітинах рослин і дріжджів. Rer1p – мембранний білок клітин дріжджів, який бере участь у рециклінгу везикул між ЕПР і апаратом Гольджі. Було сконструйовано злиття між білком Rer1p і зеленим флуоресцюючим білком (GFP, Green Fluorescent Protein) і вивчено їхню поведінку в живих клітинах дріжджів. За допомогою конфокальної системи спінінг-дисків знято фільми, із яких отримано кадри – цифрові знімки живих клітин дріжджів, що експресували Rer1p-GFP. Було доведено, що Rer1p є рецептором для білків мембрани ЕПР і відповідає за повернення популяції білків мембрани ЕПР з комплексу Гольджі знову в ЕПР.

Отримані фільми про динаміку COP1 везикул дріжджів у реальному часі (real time) дозволили спостерігати за процесом антитретроградного транспорту білка Rer1p із комплексу Гольджі в ЕПР, а також за утворенням COP1 везикул із комплексу Гольджі та накопиченням їх у цитоплазмі.

Конфокальні зображення є пласкими (2D), проте везикули можуть рухатися вверх чи вниз відносно площини спостереження. Для отримання об'ємних (3D) зображень слід фіксувати кадри з високою швидкістю. Конфокальна система спінінг-дисків дала змогу отримувати зображення зі швидкістю 30 кадрів за секунду, а отже, і проводити 3D томографічну реконструкцію.

1.4. МІКРОСПЕКТРОСКОПІЯ КОМБІНАЦІЙНОГО РОЗСІЮВАННЯ (РАМАНІВСЬКА СПЕКТРОСКОПІЯ)

Спектроскопія комбінаційного розсіювання світла (раманівська спектроскопія) є методом хімічного аналізу, що дозволяє вивчати склад і будову сполук. Комбінаційне розсіювання світла (ефект Рамана) полягає в тому, що непружне розсіювання оптичного випромінювання на молекулах речовини (твердої, рідкої, газоподібної) супроводжується зміною частоти випромінювання. При цьому у спектрі розсіяного випромінювання з'являються спектральні лінії, яких немає у спектрі первинного (збуджувального світла). Кількість і розташування таких ліній залежить від молекулярної будови сполуки.

Згідно із класичною моделлю ефект розсіювання світла характеризують наступним чином. У молекулах за дії електричного поля світла індукуються змінний дипольний момент. Він коливається з частотою світла, що падає на молекулу, зміни дипольного моменту викликають випромінювання у всіх напрямках. Заряди у сполуках утримуються разом силами, що виникають поряд з кулонівським притяганням. Коли на межі з речовиною виникає хвиля, це зумовлює осцилююче розділення цих зарядів. З'являється осцилюючий електричний диполь, який випромінює

на частоті осциляції. Таке випромінювання являє собою раманівське розсіювання (Raman scattering) світла (його ще називають комбінаційним розсіюванням, цей термін використовується у вітчизняній літературі). Раманівський спектрометр має джерело монохроматичного випромінювання (лазер), систему освітлення зразка й фокусування променів, світлофільтр та системи виявлення і комп'ютерного контролю.

За допомогою спектроскопії комбінаційного розсіювання світла можна отримувати інформацію про молекулярну будову ультраструктурних компонентів клітини (Downes, 2010). Через зразок мембрани пропускають промінь з певною довжиною хвилі, який розсіюється при контакті із зразком. Отримані промені за допомогою лінзи збирають в один пучок і пропускають крізь світлофільтр. Він відокремлює слабкі раманівські промені (0,001% інтенсивності) від більш інтенсивних релєївських (99,999% інтенсивності). Раманівські промені підсилюються та спрямовуються на детектор, який фіксує частоту їхніх коливань.

Однією із модифікацій методу раманівської спектроскопії є метод SERS (Surface-enhanced Raman spectroscopy, укр. – поверхнево-посилена раманівська спектроскопія), який значно підвищує його ефективність і дозволяє визначати поодинокі молекули (Blackie, 2009). Цей метод дає можливість визначати світло, що розсіюється окремими молекулами, які містяться біля поверхні наночастинок благородного металу. Вважається, що метод SERS є новим варіантом методу поверхневого плазмонного резонансу з використанням унікальних субстратів. Молекули адсорбують на металевих поверхнях (сріблі чи золоті) або на наноструктурах, наприклад, на плазмонмагнетичних кремнієвих нанотрубках. Інтенсивність раманівського сигналу для молекул, адсорбованих на конкретній поверхні (нанорезонатор), збільшується внаслідок посилення електричного поля на цій поверхні.

Коли видиме чи інфрачервоне лазерне світло потрапляє на поверхню, на плазмонах, локалізованих на ній, виникає збудження. Посилення поля буде найбільшим, коли плазмона

частота є в резонансі з випромінюванням. Раманівський сигнал посилюється поверхнею за тим самим механізмом, що й для світла. Цей ефект відомий як SERRS (surface-enhanced resonance Raman scattering, укр. – поверхнево-посилене (резонансне) раманівське розсіювання). Найчастіше в методі SERS використовують такі метали, як срібло і золото, оскільки частоти їхнього плазмонного резонансу реєструються відповідно у видимому та інфрачервоному діапазонах довжин хвиль, що забезпечує максимальне посилення дії світла (рис. 1.5). Якщо опромінювати мембрану, за раманівським спектром можна отримати інформацію про її склад та взаємне розташування мембранних білків.

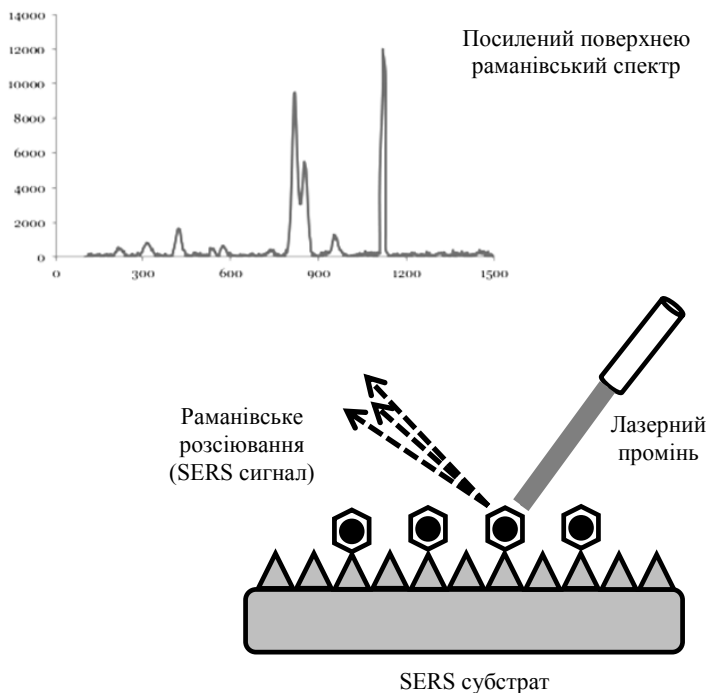


Рис. 1.5. Схема методу SERS

Метод SERS ефективно використовується для виявлення мікроорганізмів у складних сумішах. Колоїдну суспензію металевих наночастинок додають до зразка з мікроорганізмами, при цьому наночастинки прикріплюються до клітинних стінок бактерій. Аналізуючи раманівський спектр, що відображає склад мембрани бактерії, здійснюють її ідентифікацію. Саме таким чином виявили спори збудника сибірки – бактерії *Bacillus anthracis*.

SERS-біосенсор розроблено для спостереження за конформаційними переходами β -амілоїдного пептиду – білка нейрональних мембран, пов'язаного з розвитком хвороби Альцгеймера. Було виявлено, що цей пептид може переходити з α -спіральної структури в β -складчасту. Постадійне детектування цього процесу є важливим для з'ясування причин виникненням згаданої нейропатології.

За допомогою методу SERS стало можливим спостерігати за вивільненням нейротрансмітерів на рівні однієї клітини, а також отримувати інформацію щодо місць їхнього вивільнення. Наприклад, була досліджена секреція катехоламінів клітинами феохромоцитоми з використанням колоїдного срібла, яке додавали до культурального середовища. Методом конфокальної сканувальної лазерної мікроскопії показали, що колоїди приєднувалися до клітинної мембрани. Наприклад, при дослідженні методом конфокальної сканувальної лазерної мікроскопії секретії катехоламінів клітинами феохромоцитоми з використанням колоїдного срібла, яке додавали до культурального середовища було показано, що колоїди приєднувалися до клітинної мембрани. Локалізацію дофаміну та норадреналіну встановлювали, порівнюючи коефіцієнт кореляції між отриманим спектром та референтним спектром катехоламінів.

Метод SERS застосовують для імуномічення клітин для отримання розширеного спектра топографії біомолекул на клітинній мембрані. Так, для дослідження мембран ендотеліальних клітин застосували двостадійну схему імуномічення. Антитіла, кон'юговані з частинками золота, зв'язали з наночастинками срібла. Це привело до посилення спектрального сигналу SERS у 50 разів і надало можливість провести спектральне картування мембранних компонентів за розподілом наночастинок срібла.

1.5. АТОМНО-СИЛОВА МІКРОСКОПІЯ

Атомно-силова мікроскопія є перспективним методом для вивчення нативних клітинних мембран та механізмів їхнього функціонування шляхом оцінки фізичних властивостей їхньої поверхні. У 1982 р. Г. Бінніг і Г. Рорер винайшли сканувальний тунельний мікроскоп, за що в 1986 р. їм була присуджена Нобелівська премія з фізики. У кінці 1986 р. Г. Бінніг створив атомно-силовий мікроскоп, який дозволив розглядати біологічні об'єкти з роздільною здатністю від десятків ангстрем до розмірів окремих атомів.

Атомно-силовий мікроскоп (АСМ, англ. AFM – atomic-force microscope) є сканувальним зондовим мікроскопом і використовується для визначення рельєфу поверхні. Принцип роботи атомно-силового мікроскопа базується на використанні сил атомних зв'язків (Picas, 2012). Якщо два атоми розташовані на відстані 1 \AA один від одного, між ними виникають сили відштовхування, якщо на більшій – сили притягання. В атомно-силовому мікроскопі тілами, що притягуються, є досліджувана поверхня і зонд, що плавно ковзає над поверхнею зразка (сканує поверхню). Зондом є нанорозмірне вістря алмазної голки, розміщене на кінці пружної консолі, – кантилевера (англ., cantilever). Сила, яка діє на зонд з боку поверхні, вигинає консоль. Коли зонд наближається до підвищення поверхні чи западини, сила, що діє на зонд, змінюється, а отже, змінюється і величина вигину консолі. Величину вигину реєструє датчик; за цим показником судять про висоту рельєфу – топографію поверхні та особливості міжатомних взаємодій. Між зондом і зразком діють далекодійні сили Ван дер Ваальса, які спочатку є силами притягання, а при зближенні – силами відштовхування.

Атомно-силовий мікроскоп працює у трьох режимах: контактному, напівконтактному та безконтактному (рис. 1.6).

При роботі в *безконтактному режимі* п'єзовібратор збуджує коливання зонда на резонансній частоті. Вістря осцилює вертикально з амплітудою, що знаходиться в межах від 20 до 100 нм. Коли воно наближається близько до поверхні зразка, амплітуда і фаза осциляції зменшується. Система зворотного зв'язку підтримує постійну амплітуду коливань зонда, зміна частоти та фа-

зи в кожній точці записуються детектором. Робота в такому режимі дозволяє уникнути виникнення тертя, адгезії та електростатичних сил. При цьому отримують з високою роздільною здатністю зображення поверхні зразків, зокрема м'яких матеріалів, молекул, погано зв'язаних із субстратом.

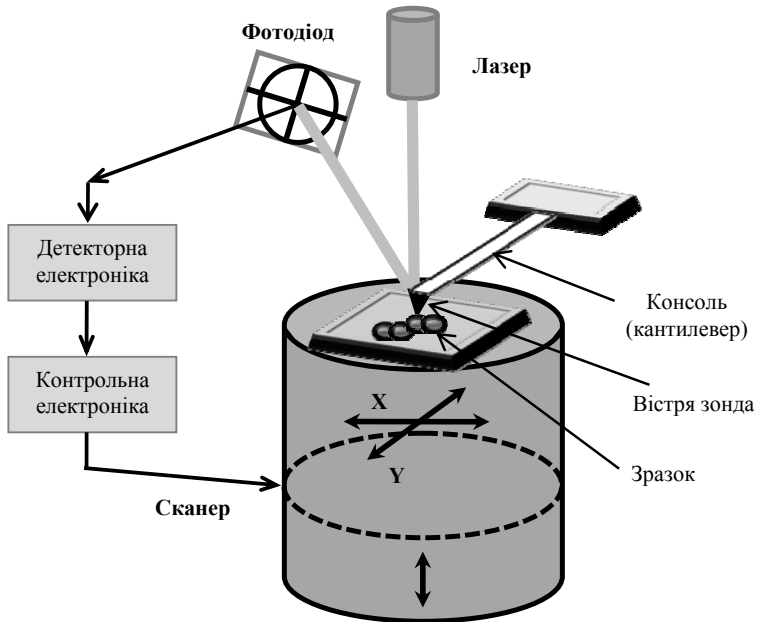


Рис. 1.6. Схема будови атомно-силового мікроскопа

Під час роботи в *контактному режимі* вістря зонду безпосередньо контактує з поверхнею. Система зворотного зв'язку підтримує постійну величину вигину консолі. Цей режим застосовують для сканування зразків з перепадами висот рельєфу порядку одиниць ангстрем. Отримане зображення являє собою просторовий розподіл сили взаємодії зонду з поверхнею.

Атомно-силовий мікроскоп має цілий ряд переваг перед електронним мікроскопом, який створює двовимірне зображення зразка. На відміну від останнього, атомно-силовий мікроскоп дозволяє отримати тривимірний профіль поверхні. До того ж, зразки не потребують спеціальної обробки, яка приводить до

їхнього руйнування та виключає повторне використання. Також цей прилад може аналізувати зразки в рідкому навколишньому середовищі, тоді як електронний мікроскоп працює тільки у вакуумному. Це дає можливість з високою роздільною здатністю проводити спостереження в реальному часі за морфологічними змінами у клітинах та їхніх мембранах, викликаних різними стимулами. Недоліком атомно-силового мікроскопа є розмір аналізованого зразка (максимум 100 мікрометрів), тоді як електронний дозволяє працювати з площиною розміром порядку міліметрів.

Атомно-силовий мікроскоп дає можливість проводити на атомному рівні аналіз структур біологічних об'єктів, кристалів амінокислот, білків, клітинних мембран, молекул ДНК тощо (Shi, 2012). У будь-якому режимі роботи переміщення сканувального зонда отримують тривимірне топографічне зображення поверхні мембрани, що досліджується. Також можна реєструвати інші характеристики поведінки зонду, які залежать від локальних фізичних властивостей поверхні. Відмінності таких властивостей можна аналізувати й порівнювати із зображенням форми об'єкта. Таким способом визначили розподіл поверхневого потенціалу на мембранах, еластичність і мобільність мембранних шарів та їхні адгезивні властивості.

За допомогою атомно-силової мікроскопії визначають сили взаємодії в міжмолекулярних системах. Для цього використовують зонди, у яких до вістря голки приєднано молекули-ліганди. Це дозволяє вивчати клітинну адгезію, локалізацію рецепторів на мембрані, моделювати різні процеси (наприклад, мієлінізацію нервових закінчень, екзоцитоз, адгезію лейкоцитів до ендотелію судин тощо). Показано, що еластичність і пружність мембран клітин ендотелію судин вища на межі із сусідніми клітинами й залежить від щільності рецепторів до факторів росту.

Аналізуючи міжмолекулярні взаємодії методом атомно-силової мікроскопії, вивчають також пружність цих взаємодій. Так отримують інформацію про пружність та в'язкість мембран. За цими показниками можна судити про функціональний стан мембран, мембранних органел і клітини загалом. Для дослідження біомембран використовується метод "force mapping". З його допомогою вперше було визначено еластичні власти-

вості в різних ділянках живих тромбоцитів і проведено модельні розрахунки. Крім того, досліджено процеси трансформації цитоскелета активованих тромбоцитів, механічну пульсацію поверхні ізольованих кардіоміоцитів та оцінено еластичність мембран різних клітин.

Метод атомно-силової мікроскопії став переважним при описуванні нових мембранних структур клітини. Так, було охарактеризовано структуру та динаміку пор злиття (поросом) на поверхні живих екзокринних клітин підшлункової залози та нейроендокринних клітин, що дозволило передбачити новий механізм транспорту крізь плазматичну мембрану. Поєднання методів динамічної силової та фазово-контрастної мікроскопії дозволило виявити на поверхні синапсом ділянки з низькою густиною розміром 10–20 нм, які можуть бути як порами злиття, так і ліпідними рафтами.

Метод атомно-силової мікроскопії є зручним інструментом вивчення мембранних білків: їхньої нативної структури на поверхні мембрани, надмолекулярної організації, конформаційних змін і динаміки вбудованих у мембрану білків в умовах, що наближаються до фізіологічних (Fotiadis, 2012). Атомно-силовий мікроскоп створює зображення мембранних білків із субнанометровою роздільною здатністю та на рівні окремих молекул. З його допомогою вивчають як реконструйовані, так і нативні мембранні білки. В останні роки даний метод застосовують також для вивчення мікрофіламентів, із функціонуванням яких пов'язані механічні властивості та динаміка клітин. На користь застосування методу атомно-силової мікроскопії для вивчення мембранних білків свідчить також те, що він не потребує попереднього оброблення матеріалу (див. вище). Тому зразки мембранних білків не підлягають розщепленню, екстракції детергентами, їх не потрібно фіксувати на поверхні та забарвлювати.

Атомно-силова мікроскопія також застосовується для вивчення іонних каналів. Наприклад, за отриманими двовимірними зображеннями поринів *OmpF Escherichia coli* встановлено потенціал- та рН-залежний воротний механізм цього каналу, який забезпечує проникнення крізь бактеріальну мембрану малих розчинених молекул.

1.6. ФЛУОРЕСЦЕНТНА СПЕКТРОСКОПІЯ І МЕТОД ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ

1.6.1. Властивості флуоресцентних зондів та їхнє застосування

Для вивчення структури біомембран застосовується *флуоресцентна спектроскопія*. Спектри поглинання дозволяють вивчати властивості макромолекул та їхні взаємодії з іншими макромолекулами. *Флуоресценція* – один із видів люмінесценції, це фізичний внутрішньомолекулярний процес, під час якого збуджена світлом молекула за період 10^{-8} – 10^{-9} с переходить в основний стан, випромінюючи квант світла, що не супроводжується нагріванням.

Незбуджені молекули перебувають в основному електронному стані. Коли молекули поглинають світло, вони переходять у збуджений стан. При переході на більші електронні й коливальні рівні надлишок енергії швидко витрачається, і флуорофор переходить на найнижчий коливальний підрівень. Процес флуоресценції відображає діаграма Яблонського (рис. 1.7).

Ефективність флуоресценції описується *квантовим виходом* – відношенням кількості випромінюваних квантів до кількості поглинутих. У клітинах флуоресценція супроводжується виникненням електронозбуджених станів, коли електрон переходить із основного стану у збуджений. Енергія, що утворюється, розсіюється у вигляді тепла або випромінюється у вигляді світла. Випромінювання світла відбувається триваліше, ніж його поглинання. Оскільки частина енергії втрачається, випромінюване світло має меншу енергію та більшу довжину хвилі. Таке явище називають *стоксів зсув* (рис. 1.8). Отже, спектр флуоресценції зсунутий відносно спектра поглинання в бік більших довжин хвиль. Частина поглиненої атомом енергії втрачається, фотон, що випромінюється, має меншу енергію і меншу довжину хвилі.

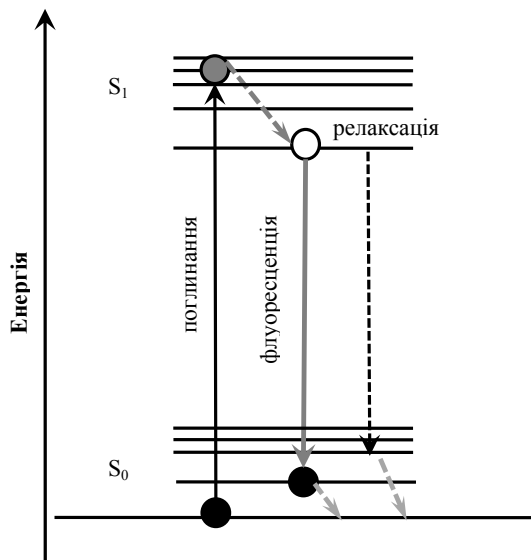


Рис. 1.7. Діаграма Яблонського, яка відображає процеси поглинання світла та флуоресценції

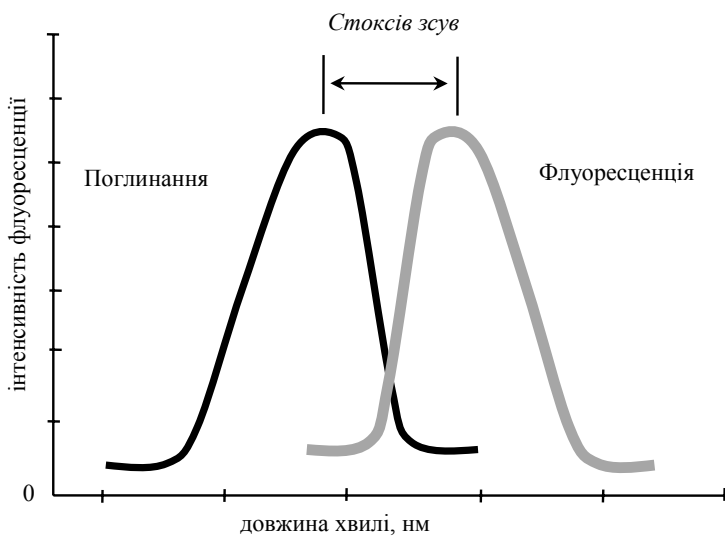


Рис. 1.8. Спектр флуоресценції

Квантовий вихід – показник, який визначає ефективність флуоресценції, він є відношенням кількості фотонів, що випромінюються, до кількості поглинутих фотонів. На Стоксів зсув впливають зовнішні та внутрішні фактори (зіткнення з молекулою гасника, утворення комплексу флуоресцентної молекули з гасником тощо). *Гасіння флуоресценції* відбувається, якщо енергія збудження молекул переходить не у світлову, а в теплову енергію їхнього руху й зіткнення з іншими молекулами. Гасниками флуоресценції є I , Br^- , Cs^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} , а також вода.

Коли збуджена молекула зіштовхується з молекулою незбудженою, утворюються комплекси – *ексимери*. В ексимерах, сформованих за участю плоских молекул, стабілізація відбувається за рахунок перенесення заряду між двома молекулами. Фосфоресценція ексимеру відбувається за більших довжин хвиль, оскільки частина енергії поглиненого кванта витрачається на перенесення заряду. Ступінь ексимеризації залежить від концентрації хромофора, температури та в'язкості навколишнього середовища.

1.6.1.1. Флуоресцентні зонди для вивчення клітинних мембран

При дослідженні клітинних мембран реєструють або власну флуоресценцію їхніх окремих компонентів або флуоресценцію зондів чи міток, які спрямовано вводять у клітини і зв'язують з біомолекулами. Плазматичні мембрани та внутрішньоклітинні мембрани живих клітин і штучні мембрани ліпосом являють собою широке поле для застосування *флуоресцентних зондів*. До мембранних зондів належать невеликі молекули – флуоресцентні аналоги природних ліпідів, такі як ліпофільні органічні барвники, структурно схожі з нейтральними біомолекулами.

Обертання зондів у мембрані обмежено, ці сполуки певним чином орієнтуються всередині бішару, що залежить від природи самого зонда. Тому, використовуючи зонди з певною структурою, отримують інформацію про різні ділянки мембрани. Аналізуючи спектри флуоресценції, можна вивчити просторову організацію молекул біомембран та вивчити динаміку білок-

ліпідних взаємодій. Різні зонди неоднаково зв'язуються з мембраною, наприклад з мембранними білками та ліпідними кластерами. Тому, підбираючи зонди певної структури, досліджують окремі ділянки мембрани.

За допомогою флуоресцентних зондів стало можливим вивчати рухливість складових компонентів мембрани – фосфоліпідів, а також оцінити мікров'язкість мембран (в'язкість ліпідної фази). Інформацію про мікров'язкість надають спектри флуоресценції та ступінь поляризації P флуоресцентного випромінювання при освітлення мембрани поляризованим світлом. Формула Перрена – Яблонського виражає зв'язок між ступенем поляризації та мікров'язкістю мембрани:

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{RT}{V_{\eta}} \tau \right),$$

де P_0 – ступінь поляризації світла на нерухомих молекулах, $R = 8,31$ Дж / (К·моль) – універсальна газова стала, T [К] – температура, V – молярний об'єм молекул, що флуоресціюють, τ – час життя збудженого стану.

При введенні флуоресцентного зонда в мембрану його розчин додають до суспензії мембран на магнітній мішалці. Незаряджені зонди легко проникають у клітину через її мембрану, однозаряджені – гірше, а багатозаряджені практично не проникають. Останні вводять мікроін'єкцією, а в деякі клітини – за допомогою ендоцитозу. Клітини здатні біосинтетично включати молекули зондів до складу своїх мембран, що вдалося показати для паринарових жирних кислот і піренбутирату. Зонд дозволяє вивчати те місце мембрани, де він знаходиться. Деяку інформацію про локалізацію зонда можна одержати зі спектра його флуоресценції та деяких інших параметрів. Корисно також проводити наближені теоретичні оцінки можливого його розташування.

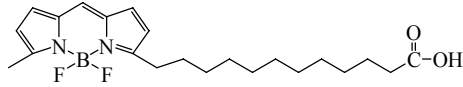
Зонди по-різному локалізуються у клітині. Одні із них у мембранах зв'язуються переважно з ліпідом (наприклад, пірен), інші (АНС) зв'язуються також і з білками, зокрема адсорбуються на їхній поверхні. У ліпопротеїнах зонди – похідні жирних кислот

розташовуються на поверхні, а такі як пірен розподіляються по всьому ліпідному ядру. У клітинах незаряджені зонди (пірен, бензпірен) швидко проникають усередину клітини, розподіляючись по мембранах.

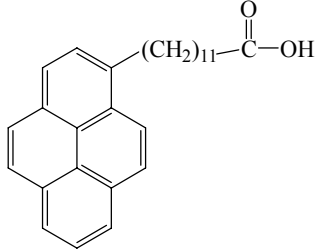
Негативно заряджені зонди (АНС) розташовуються і флуоресціюють здебільшого на зовнішньому боці клітини, катіонні зонди накопичуються всередині її, переважно в мітохондріях. Індокарбоціанінові зонди погано проникають через мембрану, і тому довгий час перебувають лише на її зовнішній поверхні. Загальну картину розподілу зонда у клітині можна побачити в люмінесцентному мікроскопі, але частку зонда, зв'язаного з мембранами, можна встановити лише за перенесенням енергії.

При введенні у клітину та в організм зонди підлягають дії ферментів. При цьому можливе утворення токсичних для клітини продуктів. Тому важливо, щоб нові зонди були схожими на природні молекули. Однак у збудженому стані зонд стає дуже агресивним. Взаємодіючи при цьому з мембраною, він руйнується сам і пошкоджує мембрану. Ці фотоперетворення залежать від властивостей і зонда, і мембрани. У результаті утворюються фотопродукти з флуоресценцією різного кольору.

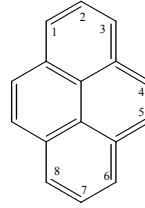
Нині існує широкий діапазон мембранних флуоресцентних зондів. Одні з них застосовуються для проведення структурних та біофізичних досліджень мембран, інші – для спостереження за транспортом ліпідів та їхнім метаболізмом у живих клітинах, для дослідження рециркуляції синапсом і опосередкованих ліпідами процесів трансдукції сигналу. Завдяки своїй низькій токсичності та стабільності деякі ліпідні зонди є корисними для спостереження за клітинами протягом тривалого часу. Низьколіпофільні сполуки використовуються як мембранні маркери процесів ендоцитозу та екзоцитозу. З використанням флуоресцентних зондів було вивчено особливості локалізації в мембрані ліпідів і білків, динаміку білок-ліпідних взаємодій, взаємодію з мембраною різних сполук тощо. На рис. 1.9 наведено формули деяких флуоресцентних зондів, які використовуються для дослідження біомембран.



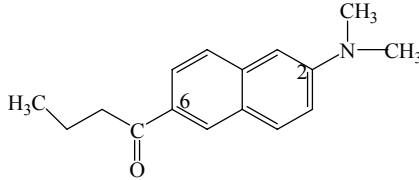
ВODIPY-мічена жирна кислота
(C₁-BODIPY 500/510 C₁₂)



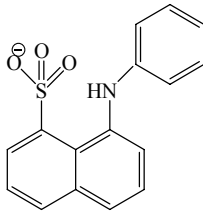
1-пірендодеканова кислота



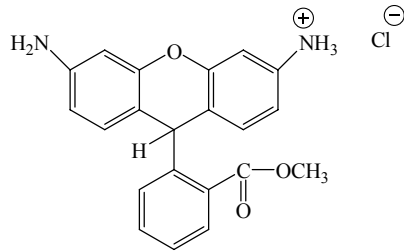
Пірен



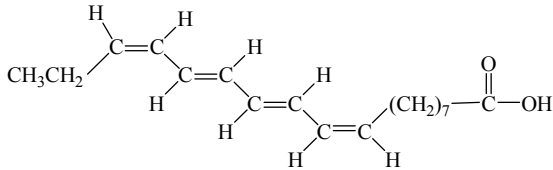
Продан



АНС (анілінонафталеносульфат)



родамін 123



цис-паринарова кислота

Рис. 1.9. Флуоресцентні зонди, які використовують для дослідження біологічних мембран

Першими флуоресцентними зондами були заряджені сполуки, АНС (анілінонафталеносульфат), чутливі до зміни мембранного потенціалу. Згодом було розроблено гідрофобні, незаряджені зонди ДМХ (4-диметиламінохалкон) і МБА (3-метоксибензантрон), які реагували на полярність середовища, їх використовували для вивчення конформаційних перебудов мембранних білків і ліпідів. Наступним кроком було створення зондів для вивчення мікров'язкості мембран, таких як пірен. Зонди, що мали заздалегідь задані властивості, склалися з полярної "голівки" і гідрофобного "хвоста", до яких приєднували хромофор. Такі сполуки приєднувалися до ліпідного бішару на різній глибині. Зонди на базі ліпідів (холестеролу, жирних кислот або фосфоліпідів) мали хромофорні групи індол, дансил, пірен, антрацен, перилен, родамін тощо.

Синтезовано флуоресцентні та біотинільовані аналоги природних ліпідів усіх основних класів – нейтральних (триацилгліцеролів, стероїдів), фосфо- та сфінголіпідів (включаючи цераміди), а також жирних кислот. Оскільки фосфоліпіди є ключовими структурними компонентами біологічних мембран, зусилля дослідників були спрямовані на створення зондів до цих сполук. Так, розроблено фосфатидилінозитольні похідні, мічені барвником BODIPY. Флуоресцентні фосфоліпідні аналоги класифікуються відповідно до приєданого флуорофору. Він може бути зв'язаний з одним чи обома ланцюгами жирних кислот у складі фосфоліпиду або з полярною групою "голівки" (гідрофільним замісником). Місце приєднання флуорофору визначає його локалізацію в неполярному оточенні або у водно-ліпідній фазі при включенні фосфоліпідного аналогу до бішару мембрани.

Флуоресцентні жирні кислоти використовуються як мембранні проби для дослідження відповідних фосфоліпідів. Хоча жирні кислоти іонізуються в умовах нейтрального рН у воді ($pK_a \sim 5$), їхній pK_a у мембранах становить ~ 7 , тому значна частина мембранозв'язаних жирних кислот є нейтральними сполуками. Флуоресцентні аналоги фосфоліпідів отримують шляхом заміщення на флуоресцентний аналог приєднаної до NH_2 -групи аміноспирту сфінгозину жирної кислоти.

Флуоресцентні ефіри холестеролу та триацилгліцероли використовують як структурні зонди та транспортні маркери для цих ліпідних компонентів мембран та ліпопротеїнів. Вони також можуть бути флуоресцентними субстратами для ліпаз і ліпід-транспортувальних білків, а також можуть включатися до ліпопротеїнів низької густини. Крім цього, створено зонди, які не є аналогами ліпідів жодного класу, проте виявляють структуру схожість, що дозволяє мітити мембрани, ліпопротеїни та інші ліпидовмісні молекулярні ансамблі. До них належать ліпофільні карбоціаніни, зонди для дослідження плинності мембран 1,6-дифеніл-1,3,5-гексатриєн (DPH), а також зонди для поверхні мембран (АНС та лаурдан). Ці зонди мають обмежену розчинність у воді, їхня флуоресценція значно підвищується при включенні до ліпідного бішару. Їх поділяють на амфифільні (мають полярні й неполярні компоненти) і нейтральні (не мають заряду й переважно розчиняються у неполярному середовищі). Так, існують нейтральні ліпофільні барвники для внутрішньоклітинного забарвлення.

Зонди, що є аналогами жирних кислот і фосфоліпідів, мають структурну схожість з природними ліпідами. У складі таких фосфоліпідів одна або обидві жирні кислоти заміщені ефірами флуоресцентних жирних кислот. Ці флуорофори залишаються схованими в гідрофобному оточенні ліпідного бішару мембрани, тому вони чутливі до змін у мембрані: плинності ліпідів, латерального руху доменів білків та порушення їхньої структури.

У складі флуоресцентних аналогів жирних кислот флуорофор міститься всередині аліфатичного ланцюга або ж приєднаний до кінцевого (омега) атома вуглецю, що є найдальшим від карбоксильної групи. Хоча такі аналоги інколи використовуються як зонди для мембран та ліпосом, їхнім основним призначенням є забезпечення спостереження за синтезом фосфоліпідів і метаболічного включення в живі клітини. Створено флуоресцентні аналоги жирних кислот на базі флуорофорів BODIPY, нітробензооксадіазолу, пірену та дансилу, а також природна флуоресцентна поліненасичена жирна кислота – *cis*-паринарова.

Барвник BODIPY (англ., boron-dipyromethene – бор-дипірометен) – клас флуоресцентних барвників, що складаються з дипірометену, заміщеного атомом бору (рис. 1.9). Незаміщений

попередник є нестабільним. Ці барвники мають малу величину Стоксового зсуву й високий квантовий вихід, величина якого є незалежною від навколишнього середовища. Піки на спектрі флуоресценції, що відповідають поглинанню та випромінюванню, мають гостру форму, тому BODIPY проявляє яскраву флуоресценцію. Також він розчинний у багатьох органічних розчинниках, причому навколишнє середовище (розчинники різної полярності) майже не впливає на параметри флуоресценції. Ці переваги зумовлюють широке коло застосування барвника BODIPY.

Як мембранні флуоресцентні зонди найчастіше використовуються *мічені BODIPY жирні кислоти*, наприклад BODIPY 500/510. Вони мають незвичайно низький для довгохвильових флуоресцентних барвників заряд, унаслідок чого їхній флуорофор нетипово локалізується в мембрані. Мічені BODIPY флуоресцентні жирні кислоти легко метаболізуються в живих клітинах з включенням до фосфоліпідів, моно-, ди- і триацилгліцеролів, ефірів холестеролу та інших похідних ліпідів.

Гідрофобний флуорофор пірен легко вбудовується в мембрану, розташовуючись між ланцюгами жирних кислот. Ексімеризація пірену пропорційна рухливості ліпідних молекул у мембрані, тому за величиною ексімеризації цього зонда судять про мікров'язкість мембрани. Ступінь ексімеризації пірену зменшується при зниженні температури, коли його рухливість зменшується внаслідок збільшення мікров'язкості мембранного бішару. Навпаки, кількість ексімерів пірену зростає, коли внаслідок підвищення температури збільшується рухливість жирнокислотних ланцюгів. З використанням пірену було проведено цілий ряд дослідів з вивчення фазових переходів у мембранах та їхньої залежності від температури. І застосуванням пірену було також досліджено впорядкованість анулярного шару ліпідів і міжбілкові взаємодії в мембрані. На базі пірену створено *омега-піренові похідні* довголанцюгових жирних кислот, а також похідні 4-, 6-, 10-, 12- та 16-вуглецевих жирних кислот (рис. 1.9).

Піренбутанова кислота використовується як мембранний зонд, її кон'югати мають незвичайно великий період напівіснування збудженого стану (>100 наносекунд), і тому є зручними

для імунних методів, детекції нуклеїнових кислот, визначення кисню та мічення ліпідних везикул. Похідні пірену у збудженому стані утворюють димери (ексимери) із зсувом емісії флуоресценції в червону ділянку спектра. Ця властивість використовується при дослідженні злиття мембран. Мічені піреном жирні кислоти можуть бути біосинтетично інкорпоровані у віруси та клітини в достатній кількості, щоб зареєструвати довгохвильову флуоресценцію ексимерів пірену. Флуоресценція цих ексимерів зменшується при злитті мічених мембран з неміченими. Процес злиття можна оцінити за збільшенням співвідношення емісії мономерів (~400 нм) та ексимерів (~470 нм) під час збудження при 340 нм.

Природна поліненасичена жирна кислота – *цис*-паринарова – (рис. 1.9) була застосована як мембранний зонд ще в 1975 р. Серед багатьох існуючих сьогодні флуоресцентних зондів вона найбільш схожа за структурою з мембранними ліпідами. Її хімічні та фізичні властивості добре вивчені. Ця сполука має два головні піки близько 300 та 320 нм та високий коефіцієнт екстинкції. Перевагами *цис*-паринарової кислоти є дуже велике значення Стоксового зсуву (~100 нм) і повна відсутність флуоресценції у воді. Час гасіння флуоресценції варіює від 1 до ~40 наносекунд, що залежить від щільності упакування молекул у фосфоліпідних бішарах. Це дозволяє щохвилино отримувати інформацію про динаміку ліпідного бішару. Великий ступінь ненасиченості цієї кислоти надає їй надзвичайної чутливості до окиснення.

Цис-паринарова кислота використовується для дослідження структури ліпопротеїнів, механізмів їхнього пероксидного окиснення, зв'язку пероксидації з цитотоксичністю та апоптозом, вивчення механізму дії білків, що зв'язують жирні кислоти, білків транспорту фосфоліпідів, ліпід-білкових взаємодій та ін.

Серед інших неполярних та амфифільних зондів для дослідження мембранних ліпідів і білків слід виділити похідні родаміну, флуоресцеїну та кумарину.

Кумарин (2Н-1-бензопіранон-2) є лактоном о-оксикоричної кислоти, який міститься як пахуча речовина в багатьох рослинах. Його похідні використовують у лазерних технологіях, зокрема умбеліферон (англ., *umbelliferone*), що являє собою 7-гідро-

ксикумарин, входить до складу флуорогенних субстратів, які використовуються в ELISA (див. підрозд. 6.1.2).

Флуоресцеїн (діоксифлуоран) є флуоресцентним барвником, що має сильну синьо-жовту флуоресценцію (рис. 1.10). Фенілізотіоціанатні похідні флуоресцеїну використовуються для мічення клітин та їх наступного дослідження методом флуоресцентної мікроскопії, зокрема проточної цитофлуориметрії. Антитіла, кон'юговані з флуоресцеїном, дозволяють специфічно впізнавати й мітити флуорофором різні внутрішньоклітинні структури та клітинні білки.

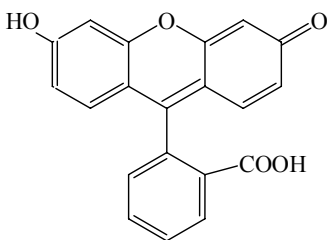
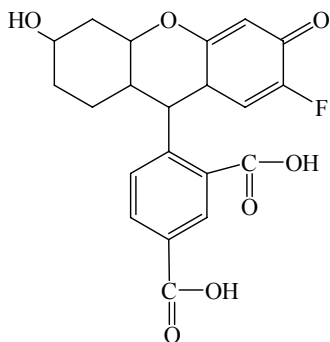


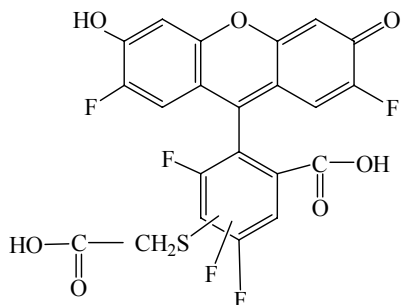
Рис. 1.10. Структура флуоресцеїну

Зонди Oregon Green 488 й Oregon Green 514 є аналогами флуоресцеїну. Спектр поглинання та випромінювання Oregon Green 488 (2',7'-дифлуорофлуоресцеїну) відповідають таким для флуоресцеїну (рис. 1.11). Завдяки додатковому фторуванню кільця флуоресцеїну спектри барвника Oregon Green 514 зсуваються. Оскільки пік спектра Green поглинання обох флуорофорів Oregon Green знаходиться в межах максимуму поглинання білків (~498 нм і ~512 нм), вони використовуються для конфокальної лазерної сканувальної мікроскопії (див. підрозд. 1.3) і проточної цитофлуориметрії.

Перевагою зондів Oregon Green є більша фотостабільність порівняно з флуоресцеїном. Крім того, їх можна легко кон'югувати з антитілами й використовувати для вивчення процесів сигнальної трансдукції.



O-6146 Oregon Green 488



O-6138 Oregon Green 514

Рис. 1.11. Структура флуоресцентних зондів Oregon Green 488 і Oregon Green 514

Кожна амфіфільна мітка містить полярний флуоресцентний барвник з ліпофільним "хвостом". При міченні мембран, включаючи ліпосоми, ліпофільна частина зонда вбудовується в мембрану, а полярний флуорофор розташований на поверхні, де на нього впливає мембранне оточення та середовище поблизу неї. За цим принципом з мембраною зв'язуються амфіфільні молекули карбоціанінів та ліпофільні флуоресцеїнові зонди. Прикладами таких сполук є класичні мембранні мітки 1,6-дифеніл-1,3,5-гексатриєн (DPH), анілінонафталеносульфат (АНС), біс-АНС, продан, лаурдан, а також ліпофільний барвник BODIPY. Хоча ці зонди мало схожі на природні речовини, вони локалізуються всередині клітинних мембран і ліпосом або в їхньому водному

оточенні. Тому за допомогою їх можна отримати інформацію про властивості їхнього локального оточення, зокрема в'язкість, полярність та впорядкування ліпідів.

1,6-Дифеніл-1,3,5-гексатриєн (англ., 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, DPH) досі є популярною міткою до внутрішньої частини мембрани. Усередині ліпідного бішару DPH розташований паралельно осі ацильних ланцюгів ліпідів, проте може розміщуватися в центрі ліпідного бішару паралельно його поверхні. Включення DPH у мембрану супроводжується сильним збільшенням їхньої флуоресценції, причому у воді вона майже відсутня. Час зникнення флуоресценції DPH у ліпідних бішарах залежить від часу напіврозподілу його в мембрані.

Продан (англ., Prodan) є одночасно донором і акцептором електронів, що надає йому великого дипольного моменту у збудженому стані та зсуву флуоресценції залежно від полярності розчинника. Одержано ліпофільні похідні продану (наприклад, лаурдан), які використовувалися для надання біокон'югатам цього флуорофору чутливості до середовища. При їхньому включенні спектр флуоресценції стає чутливим до фізичного стану навколишніх фосфоліпідів. У мембранах продан локалізується біля поверхні, проте може частково проникати всередину. Релаксація збудженого стану є чутливою до природи зв'язку (простого ефірного або складноефірного) між вуглеводневим "хвостом" фосфоліпиду та гліцероловим "кором". Завдяки своїм відмінним спектрам флуоресценції продан використовується для характеристики співіснуючих ліпідних доменів, топографічних змін структури мембран, а також оцінки полярності поверхонь ліпід/вода.

Анілінонафталеносульфونات (АНС) є одними з найперших флуоресцентних зондів, створених ще в 1950 р., і залишаються цінними для вивчення мембранної поверхні та її білків. 1,8-АНС, його аналог 2,6-АНС, котрі є нефлуоресцентними у воді, стають такими при зв'язуванні з мембраною або білками. Ця властивість робить їх чутливими індикаторами фолдингу білків, їхніх конформаційних змін та інших процесів, які впливають на поведінку зонда у воді.

Родамін 123 є проникним у клітину катіонним флуоресцентним зондом, що активно та швидко (за декілька хвилин) накопичується

в мітохондріях без цитотоксичних ефектів. Він придатний для більшості клітин – пресинаптичних нервових закінчень, бактерій, рослин, сперматозоїдів людини тощо. Застосування цього зонда дозволяє проводити сортування Т-лімфоцитів при стимуляції мітогенами, вивчати апоптоз, аксоплазматичний транспорт мітохондрій, активність мітохондріальних ферментів, стан їхніх мембран.

Тепер існує велика кількість флуоресцентних зондів, які дозволяють вивчати не тільки плазматичну мембрану, але й мембрани клітинних органел. Такі зонди проникають у клітину й селективно зв'язуються з мітохондріями, лізосомами, ендоплазматичним ретикулумом та апаратом Гольджі. Застосовуючи їх, можна вивчати такі процеси, як дихання, мітоз, апоптоз, стійкість клітин до лікарських препаратів, розщеплення різних субстратів, детоксикацію, внутрішньоклітинний транспорт та ін. Такі флуоресцентні зонди, на відміну від антитіл, можуть використовуватися для дослідження структури органел та їхньої активності в живих клітинах з мінімальним порушенням їхніх функцій. Ці зонди застосовуються не тільки в наукових дослідженнях, а також з метою діагностики багатьох захворювань. Так, було продемонстровано вибіркоче нагромадження деяких флуоресціюючих барвників у пухлинних клітинах, що дозволило створити метод діагностики пухлин.

За допомогою флуоресцентних зондів можна вивчати цілий ряд хімічних і фізичних характеристик біологічних мембран, причому використання їх значно спрощує такі дослідження. Метод флуоресцентних зондів набагато порядків чутливіший за радіоізотопний метод. Він, зокрема, дозволяє вимірювати флуоресценцію сполуки в концентрації 10^{-18} М за період близько 10^{-5} с. З використанням цього методу визначено площу поверхні різних мембран, вивчено зв'язування білків з мембранами, просторову організацію мембранних білків і локалізацію їх у білок-ліпідні взаємодії в мембранах, взаємодію між мембранними білками, транспорт молекул крізь мембрани, вивчено електричні поля на поверхні мембран, визначено трансмембранні градієнти концентрації іонів та внутрішньоклітинні рН і концентрацію Ca^{2+} .

Отже, флуоресцентні зонди ефективно застосовуються для дослідження мембранних ліпідів і білків, що дає корисну інформацію стосовно структури мембрани, її топографії та механі-

змів функціонування структурних ансамблів, а також для діагностики захворювань.

Метод флуоресцентних зондів пов'язаний із застосуванням таких спектроскопічних методів, як електронний парамагнітний резонанс (ЕПР), метод деполяризації флуоресценції та метод ядерного магнітного резонансу (ЯМР). Усі ці методи чутливі до орієнтації молекул зондів у мембрані. Спектр ^2H -ЯМР чутливий до орієнтації зв'язку між атомами вуглецю і дейтерію відносно поля, що прикладають. Спектр ЕПР залежить від орієнтації нітроксильного зв'язку між азотом і киснем, який міститься у більшості молекул мембранних зондів, відносно прикладеного магнітного поля. Флуоресцентна спектроскопія дозволяє визначити поляризацію світла, яке випромінюється, причому вона залежить від орієнтації дипольного моменту переходу відносно напрямку, що визначається поляризатором.

1.6.1.2. Застосування флуоресцентних зондів для дослідження процесів внутрішньоклітинної сигналізації

Флуоресцентні зонди широко використовуються для вивчення механізмів трансдукції сигналу. Зонди з високим квантовим виходом і високою фотостабільністю дозволяють з високою чутливістю визначати окремі молекули – ключові компоненти сигнальних каскадів. На базі таких зондів створено цілий ряд тест-наборів, для чого застосовують різні методи. Зокрема, у методі твердофазового імуоферментного аналізу (ELISA) мітку містять флуорогенні субстрати для таких ферментів, як пероксидаза хрому та лужна фосфатаза (принцип ELISA описано в підрозд. 6.1.2). У методі флуоресцентного резонансного перенесення енергії, розділеного в часі (HTRF, див. підрозд. 1.6.3) мітку приєднують до антитіл або до субстрату досліджуваного ферменту.

Наприклад, активність тирозинпротеїнкінази визначають методом Antibody Beacon™ за допомогою антитіл проти її субстрату, мічених флуоресцентним барвником Oregon Green 488 (див. підрозд. 6.5.1.3). Для виявлення аденілатциклази у клітинах користуються форсколіном (активатор цього ферменту), міченим барвником BODIPY (рис. 1.12).

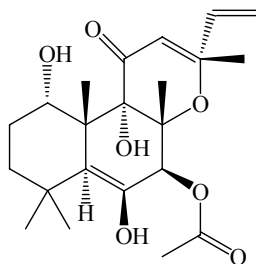


Рис. 1.12. Структура форсколіну

Texas Red (сульфородамін хлорид 101) є барвником з червоною флуоресценцією, який використовується для сортування клітин, у флуоресцентній мікроскопії та імуногістохімії, у полімеразній ланцюговій реакції (рис. 1.13). Пік спектра поглинання знаходиться в межах 589 нм, флуоресціює він за довжини хвилі 615 нм. Його також ефективно використовують для дослідження сигнальної трансдукції. Білки з приєднаним хромофором Texas Red, є агентами для флуоресцентного мічення. Оскільки флуоресценція Texas Red дуже яскрава, антитіла, кон'юговані з цим барвником, зв'язуються зі специфічними антигенами й можуть виявляти антигени, вміст яких у клітині дуже малий.

Нові похідні родаміну, такі як Alexa 594, мають подібні до Texas Red спектри поглинання та випромінювання, вони використовуються, коли необхідна висока фотостабільність та інтенсивність флуоресценції.

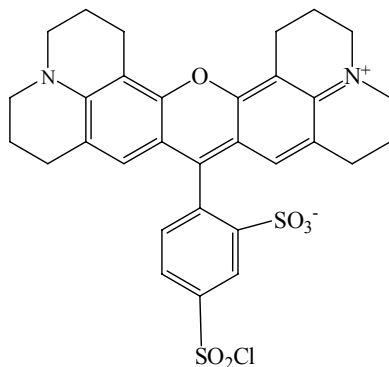


Рис. 1.13. Структура флуоресцентного зонда Texas Red

Створено цілу серію барвників типу Alexa Fluor (Alexa Fluor 350, 430, 488, 514, 546, 594,647) (рис. 1.14) (Panchuk-Voloshina, 1994). Їх отримали шляхом сульфурювання кумарину, родаміну, флуоресцеїну та ціанінових барвників. Вони більш стабільні та менш чутливі до змін рН, ніж указані вище сполуки з подібними довжинами хвиль збудження і випромінювання, що були їхніми попередниками (флуоресцеїн). Alexa Fluor 488 проявляє зелену флуоресценцію, його довжина хвилі збудження становить 488 нм. Довжини хвиль збудження Alexa Fluor 647 становлять 594 та 633 нм, цей барвник здатний до флуоресценції в дальньому червоному діапазоні спектра. Такі барвники кон'югують з багатьма антитілами, пептидами та білками, також на його основі створено спеціальні субстрати для мічення клітин.

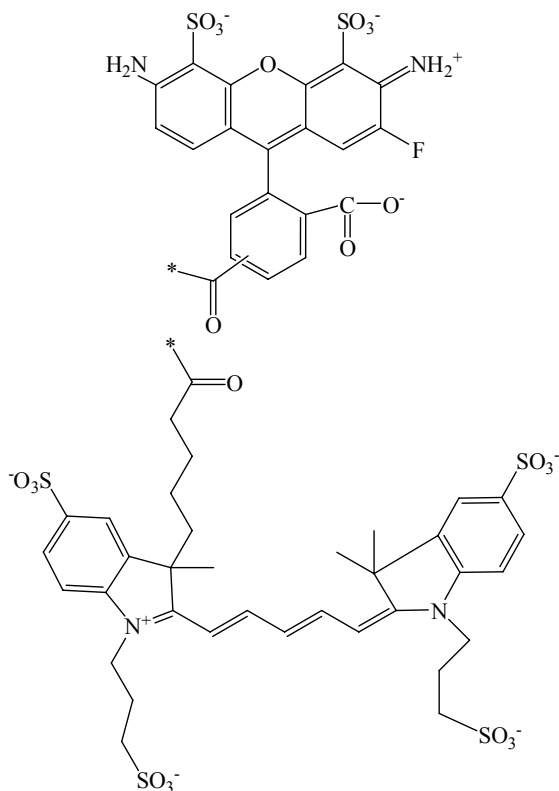


Рис. 1.14. Структура флуоресцентних зондів Alexa Fluor 488 і 467

Широкого застосування набули аналоги нуклеотидів, мічені флуоресцентними мітками. Вони діють як активатори або інгібітори ферментів, їх селективно зв'язують з регуляторними сайтами нуклеотидзв'язувальних білків, вони є зондами для вивчення ізольованих білків, реконструйованих мембранозв'язаних ферментів, органел (таких як мітохондрії) і тканин (таких як м'язові волокна). Нещодавно їх стали використовувати як зонди для вивчення ефектів нуклеотидів на сигнальну трансдукцію, зокрема як активатори чи інгібітори G-білків. Сьогодні виробляють цілий ряд аналогів нуклеотидів. Похідні цАМФ, мічені Alexa Fluor, застосовують для вивчення цАМФ-залежних протеїніназ. Alexa Fluor 488 цАМФ має зелену флуоресценцію, Alexa Fluor 555 цАМФ – оранжеву, Alexa Fluor 647 цАМФ – флуоресценцію у дальньому червоному діапазоні довжин хвиль. Аналоги нуклеотидів, мічені BODIPY, є довгохвильовими зонди для нуклеотидзв'язувальних сайтів, субстратами для ферментів (BODIPY-АДФ та BODIPY-АТФ). За допомогою BODIPY-ГДФ і BODIPY-ГТФ вивчають ГТФ-зв'язувальні білки. N-метилантранілоїл (англ., N-methylanthraniloyl – MANT) нуклеотиди, здатні до блакитної флуоресценції й чутливі до навколишнього середовища, є інструментами для вивчення білок-нуклеїнових взаємодій, структури та активності нуклеотидзв'язувальних білків (рис. 1.15).

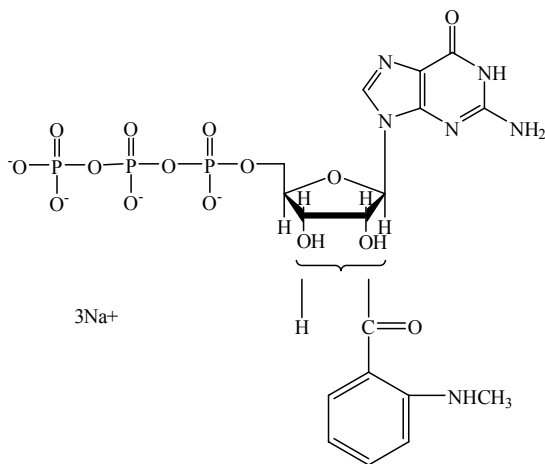


Рис. 1.15. Структура 2'(або-3')-О-(N-метилантранілоїл)гуанозин 5'-трифосфату

При дослідженні функціонування мембран і процесів внутрішньоклітинної сигналізації широко використовуються флуоресцентні зонди для визначення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} за допомогою флуоресцентної спектроскопії (рис. 1.16). Вони є флуоресцентними сполуками, які проявляють спектральну відповідь при зв'язуванні з іонами Ca^{2+} і є чутливими до його концентрації в діапазоні <50 нМ та >50 мкМ. Традиційними кальцієвими індикаторами є фура-2, індо-1, флуо-3, флуо-4 та ін. Розроблено також сполуки фура-4F, фура-5F, фура-6F та фура-FF, які більш чутливі до внутрішньоклітинного Ca^{2+} в діапазоні 0,5–5 мкМ порівняно з фура-2. Індикатори флуо-3, флуо-4, Oregon Green, Calcium Green придатні для детекції кальцію в широкому концентраційному діапазоні й мають підвищену яскравість та знижену фототоксичність. Існують також індикатори, кон'юговані з високо- або низькомолекулярними декстранами для поліпшення утримання їх у клітині та накопичення в її компартментах. Так, ліпофільні Ca^{2+} індикатори придатні для дослідження навколomембранного Ca^{2+} .

Фура-2, індо-1 та їхні похідні є флуоресцентними Ca^{2+} -індикаторами, які збуджуються за дії ультрафіолетового світла і є взаємозамінними у більшості експериментів (рис. 1.16). Фура-2 є зручним індикатором для диференційної сканувальної мікроскопії. При зв'язуванні Ca^{2+} фура-2 виявляє зсув абсорбції, що може бути встановлено скануванням спектра збудження між 300 та 400 нм (емісія за довжини хвилі ~510 нм). На відміну від нього, індо-1 є ліпшим барвником для проточної цитометрії, де він може давати відповідь при опроміненні за довжини хвилі 351–364 нм. Максимум емісії індо-1 зсувається з ~475 нм у безкальцієвому середовищі до ~400 нм, коли барвник насичений кальцієм. Показано, що фура-2 та індо-1 не спричинюють шкідливих ефектів звичайного ультрафіолетового світла на живі об'єкти. Натрієві й калієві солі фура-2 та калієва сіль індо-1 є сполуками, що проникають у клітину і які можна ввести в клітину шляхом мікроін'єкції.

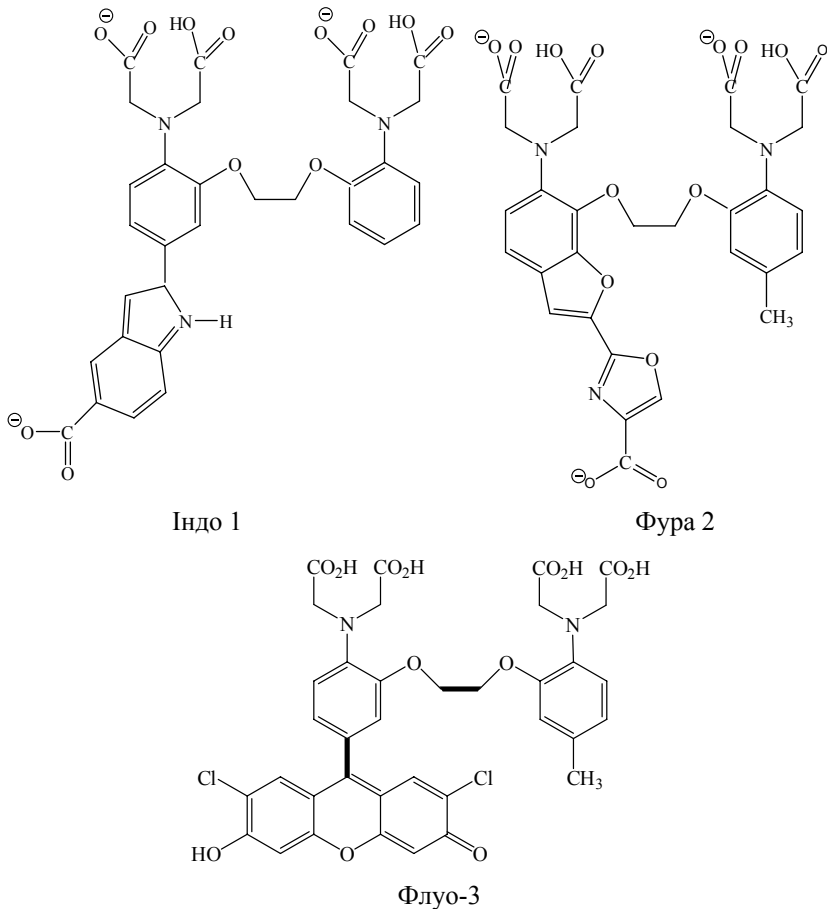


Рис. 1.16. Флуоресцентні зонди для визначення концентрації внутрішньоклітинного кальцію

Ca^{2+} індикатор флуо-3 (англ., fluo-3) є довгохвильовим кальцієвим зондом, який практично нездатний до флуоресценції у вільній формі. При зв'язуванні з Ca^{2+} його флуоресценція посилюється у 60–80 разів (рис. 1.16). Тому його широко використовують для проточної цитометрії та конфокальної сканувальної мікроскопії при збудженні за дії видимого світла за допомогою аргонного лазера. Оскільки флуо-3 випромінює світло з висо-

кою довжиною хвилі, він мало руйнує клітини і використовується для дослідження просторової динаміки процесів трансдукції сигналу за участю Ca^{2+} . Також флуо-3 застосовувався для аналізу впливу на клітини різних фармакологічних речовин.

1.6.2. Метод AlphaScreen

Метод AlphaScreen (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) є "нерадіоактивним" методом, у якому використовуються донорні й акцепторні гранули, вкриті шаром гідрогелю, що дозволяє зв'язуватися з ними різними біомолекулами.

При збудженні світлом довжиною хвилі 680 нм фотосенсибілізатор у складі донорної гранули перетворює зовнішній кисень на реактивну синглетну форму. За високої концентрації фотосенсибілізатора, який входить до складу донорної гранули, утворюється 60 000 молекул синглетного кисню за секунду, результатом чого є ампліфікація сигналу. Синглетний кисень реагує з тіоксеном – компонентом акцепторної гранули, що приводить до генерації хемілюмінесцентного сигналу з емісією світла довжиною хвилі 370 нм. Енергія негайно передається на флуорофор, який також міститься в акцепторній гранулі, що зсуває довжину хвилі емісії світла до 520–620 нм. Оскільки синглетний кисень нестабільний (середня тривалість життя становить 4 мкс), він може дифундувати тільки на відстань 200 нм до того моменту, як розкладеться. Таке обмеження у відстані забезпечує нездатність специфічної біологічної взаємодії двох гранул: синглетний кисень, що продукується донорними гранулами, не детектується, а акцепторні гранули перебувають поза межами досяжності, якщо не відбувається їхнього збудження світлом. До складу рідера входить вольфрамово-галогенна лампа, призначена для збудження хемілюмінесцентного сигналу (рис. 1.17).

Перевагами методу AlphaScreen є можливість його багатоцільового використання, мініатюризація, що зменшує вартість. Створено модифікації методу, придатні для застосування мікропланшетів. Як джерело випромінювання застосовують лазерний діод, що випромінює світло за довжини хвилі 680 нм.

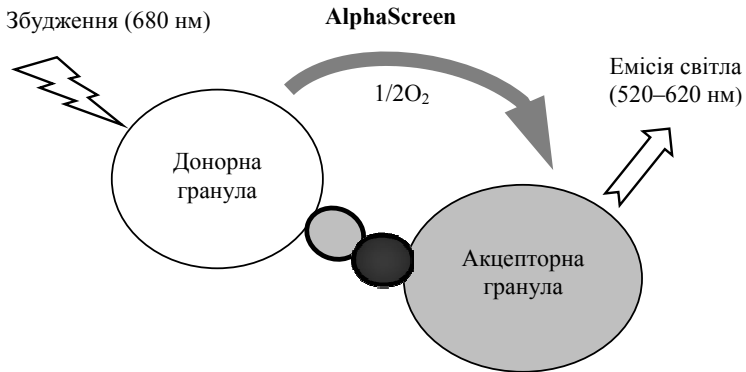


Рис. 1.17. Принцип методу AlphaScreen

Новою модифікацією методу є AlphaScreen®SureFire®, яка дозволяє ефективно визначати різні фосфорильовані білки у клітинних лізатах, а також ключові компоненти багатьох сигнальних шляхів, рецептори, протеїнкінази. За допомогою цієї технології досліджують процеси білкового фосфорилування не тільки в лізатах, а й у цілих клітинах. Дослідження різних сигнальних молекул можна проводити на культурах клітин. Його застосовують для аналізу великої кількості протеїнкіназ, таких як Akt, ALK, ERK1/2, IκBα, JNK, NFκB, p38MAPK, p53, p70S6K, STAT3 і топоізомерази II α та ін.

Для підвищення чутливості методу донорні гранули вкриті стрептавідином, а антитіла зв'язані з біотином. Акцепторні гранули вкриті протеїном А, який зв'язується Fc-доменом антитіл (рис. 1.18). Антитіла, зв'язані з донорними та акцепторними гранулами, утворюють "сендвіч"-комплекси з досліджуванним фосфорильованим білком (антигеном). Одні впізнають специфічний фосфорильований епітоп на одній частині молекули антигену, інші – нефосфорильований епітоп на його протилежному.

Клітини обробляють речовинами, які стимулюють чи інгібують білкове фосфорилування. Після цього їх лізують, до лізату додають антитіла та донорні й акцепторні гранули. У деяких тест-наборах донорні гранули асоційовані з антитілами проти "тотального" (нефосфорильованого) досліджуваного антигену, тоді як акцепторні гранули зв'язані з антитілами, специфічними

до фосфорильованого антигену (антифосфоспецифічними анти-тілами). В інших наборах, навпаки, антифосфоспецифічні анти-тіла асоційовані з акцепторними гранулами.

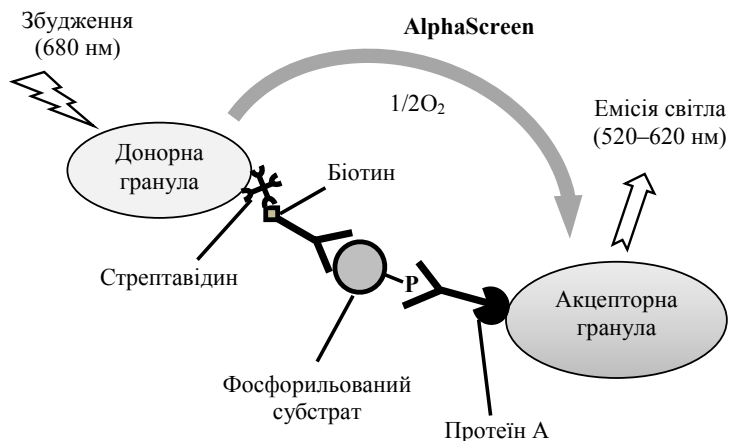


Рис. 18. Принцип методу AlphaScreen®SureFire®

Коли досліджуваний білок (антиген), присутній у зразку, фосфорилується, він зв'язується з антитілами на донорних та акцепторних гранулах. У результаті вони наближаються одна до одної. Коли донорні гранули опромінюють світлом довжиною хвилі 680 нм, генерується синглетний кисень, який реагує з тіоксеном акцепторних гранул. При цьому випромінюється світло, довжина хвилі якого становить 520–620 нм, інтенсивність якого вимірюють на рідері. За збільшенням інтенсивності сигналу оцінюють фосфорилування досліджуваного білка.

Перевагою методу AlphaScreen®SureFire® є те, що він дозволяє культивувати клітини й проводити визначення в одній лунці (англ., "All-in-One-Well"). Цей метод є гомогенним (англ., homogeneous (no wash) assay) – він дозволяє знехтувати процедурою відмивання і тим самим зменшити час визначення. Вимірювання проводять у мікропланшетах з 96 та 384 лунками, також це можливо робити в 1536-лунковому форматі. Тому метод AlphaScreen®SureFire® відносять до категорії HTS (High Throughput Screening) – методів високопродуктивного скринінгу.

1.6.3. Флуоресцентне резонансне перенесення енергії (FRET)

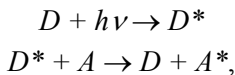
Флуоресцентне резонансне перенесення енергії (англ., Fluorescence Resonance Energy Transfer, Förster resonance energy transfer, FRET) – це нерадіаційне перенесення енергії між двома флуорофорами (донором і акцептором), залежне від відстані. Цей метод базується на явищі флуоресценції й забезпечує можливість дослідження міжмолекулярних взаємодій у межах декількох нанометрів як *in vitro*, так і *in vivo* (у живій клітині та в реальному часі) (Zheng, 2006). Метод FRET залежить від перенесення енергії від одного флуорофору до іншого, коли молекули знаходяться близько одна від одної, і тому використовується для вивчення взаємодій на молекулярному рівні. За допомогою методу FRET можна дослідити міжмолекулярні взаємодії поза межами теоретичної роздільної здатності оптичної мікроскопії.

Явище флуоресцентного резонансного перенесення енергії було відкрито у 1946 р. німецьким фізиком Теодором Ферстером (Theodor Förster), який уперше описав перенесення енергії збудження. З використанням цього явища було впроваджено метод FRET. Сьогодні він є значно вдосконаленим: він придатний для вивчення взаємодії молекул, які розташовані на дуже малій відстані одна від одної, отже, збільшено чутливість методу, а також поліпшено технологію кількісного визначення FRET-сигналу.

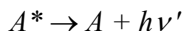
Метод FRET базується на прямому перенесенні енергії від однієї молекули до іншої, яке може відбуватися тільки на дуже малій відстані (1–10 нм). Таке нерадіаційне перенесення енергії (шляхом диполь-дипольних взаємодій) може здійснюватися лише від однієї збудженої молекули (донора) до другої найближчої незбудженої флуоресцентної молекули (акцептора). Донор-флуорофор в електронозбудженому стані передає енергію збудження розташованому поблизу акцептора-флуорофору. Таке перенесення відбувається нерадіоактивним чином шляхом диполь-дипольних взаємодій дальньої дії (Hussain, 2012). При цьому акцептор починає флуоресціювати, а емісія донора знижується. Теорія FRET базується на концепції, згідно з якою збуджений флуорофор є осцилюючим диполем і передає енергію другому диполу, що має схожу резонансну

частоту. Тому резонансне перенесення енергії є аналогічним до поведінки зв'язаних осциляторів, таких як пара камертонів, що вібрують з однаковою частотою. на відміну від FRET, радіаційне перенесення енергії потребує випромінювання і реабсорбції (перепоглинання) фотона, що залежить від фізичних розмірів і оптичних властивостей зразка. На відміну від радіаційного перенесення, резонансне перенесення енергії дає можливість вивчати взаємодію у парі донор-акцептор.

Фізичний принцип FRET полягає в наступному. На початковій стадії донор-флуорофор поглинає енергію при збудженні світлом і переносить її на найближчий хромофор акцептора.



де D – донор, A – акцептор.



Перенесення енергії виявляється у зменшенні або гасінні флуоресценції донора і в зменшенні часу його життя у збудженому стані, що супроводжується збільшенням інтенсивності флуоресценції акцептора.

На рис. 1.19 наведено діаграму Яблонського, яка відображає зв'язані переходи між випромінюванням донора і поглинанням акцептора під час FRET. За присутності акцептора флуорофор-донор передає енергію свого збудженого стану акцептору без випромінювання фотона.

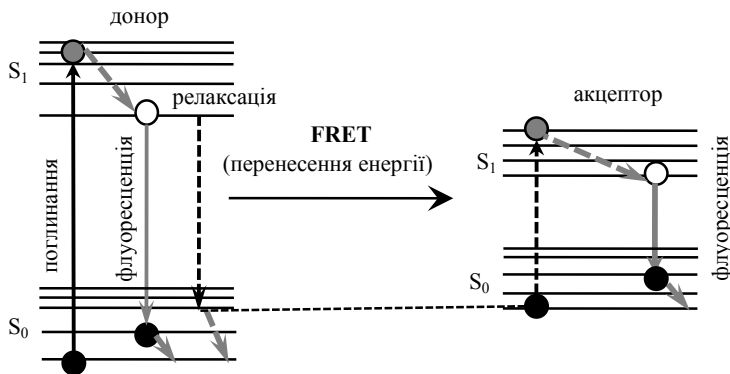


Рис. 1.19. Діаграма Яблонського, яка характеризує процес FRET

Слід зауважити, що процес резонансного перенесення енергії відбувається тільки тоді, коли мають місце певні суворі умови, яких необхідно дотримуватися при виконанні методу FRET, а саме:

- 1) донорний зонд повинен мати достатній період існування для забезпечення перенесення енергії;
- 2) молекули донора й акцептора мають бути розташовані на відстані 1–10 нм одна від одної, оскільки ефективність перенесення енергії залежить від відстані між ними;
- 3) спектр поглинання флуорофора-акцептора має накладатися на спектр випромінювання флуорофора-донора (приблизно на 30%);
- 4) для перенесення енергії орієнтації диполя донора й акцептора мають бути приблизно паралельні.

Т. Ферстер показав, що ефективність процесу FRET (E_{FRET}) залежить від величини, оберненій шостому ступеню значення відстані між донором і акцептором:

$$E_{\text{FRET}} = R_0^6 / (R_0^6 + r^6), \quad (1)$$

де R_0 – радіус Ферстера, на якому половина енергії збудження донора переходить до хромофора акцептора.

Тому радіус Ферстера визначають як відстань, на якій ефективність перенесення енергії становить 50%. Ця величина залежить від квантового виходу флуоресценції донора за відсутності акцептора (f_d), показника заломлення розчину (η), дипольної кутової орієнтації кожної молекули (K^2) і перекриття спектрів пари донор-акцептор (J – інтеграл спектрального перекриття):

$$R_0 = 9,78 \cdot 10^3 (\eta^{-4} \cdot f_d \cdot J)^{1/6} \cdot A^0. \quad (2)$$

Отже, величина FRET залежить від міри спектрального перекриття між донором і акцептором (рис. 1.20), квантового виходу донора, взаємної орієнтації перехідних дипольних моментів донора й акцептора та від відстані, яка розділяє хромофори донора й акцептора. Будь-який вплив на відстань між донором й акцептором впливає на величину FRET. Тому явище FRET називають "спектроскопічною/молекулярною лінійкою" (англ., "spectroscopic/molecular ruler"), що використовується, наприклад, для визначення відстані між двома активними сайтами білка, міченого відповідними хромофорами донора й акцептора.

Це дає можливість спостерігати за конформаційними змінами, оцінюючи величину FRET між двома флуорофорами.

Перенесення енергії відбувається шляхом гасіння флуоресценції донора разом зі зменшенням часу її тривалості, а також шляхом збільшення випромінювання флуоресценції акцептором (рис. 1.20). Тому метод FRET дуже чутливий до відстані між флуорофорами й може застосовуватися для визначення відстані між молекулами. Принцип FRET є аналогічним принципу теорії "комунікації ближнього поля" (англ., Near Field Communication, NFC), згідно з якою радіус взаємодії набагато менший, ніж довжина хвилі світла, що випромінюється. У найближчій ділянці збуджений хромофор донора випромінює віртуальний фотон, який негайно поглинається хромофором акцептора.

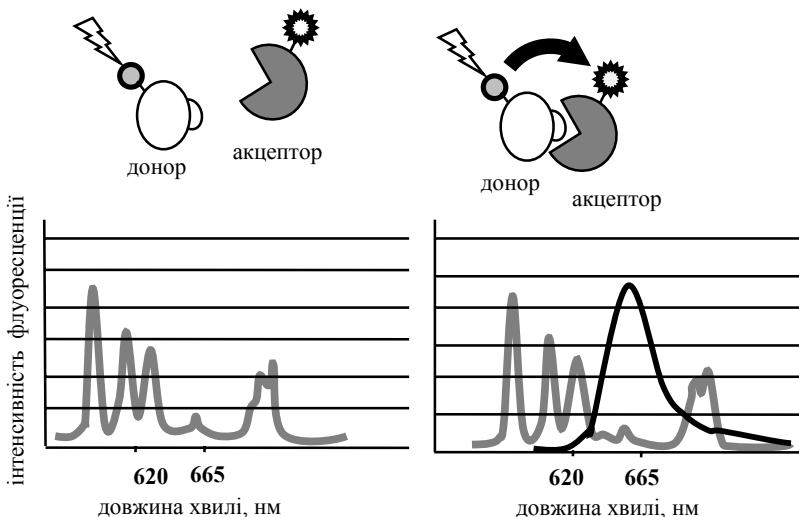


Рис. 1.20. Схема методу FRET. Детекція специфічної флуоресценції свідчить про наявність FRET, викликаного взаємодією донора і акцептора, які знаходяться близько один від одного

Виявлення і кількісне визначення величини FRET здійснюють різними шляхами. Найпростіше це явище можна викликати, збуджуючи зразок, що містить молекули донора й акцептора. Він буде випромінювати світло, якщо довжина хвилі буде близькою до такої для максимуму випромінювання акцептора. Оскі-

льки FRET може зумовлювати як зменшення флуоресценції молекул донора, так і збільшення флуоресценції молекули акцептора, можна виміряти співвідношення двох сигналів. Перевагою цього методу є те, що таку взаємодію можна визначити кількісно і вона не залежить від концентрації сенсора.

Оскільки не всі частини акцептора є флуоресцентними, вони можуть використовуватися для гасіння флуоресценції. У цьому випадку ті взаємодії, що приводять до наближення флуоресцентної донорної молекули до акцептора, зменшують інтенсивність сигналу. Навпаки, реакції, що запобігають наближенню флуоресцентного донора до гасника, приводять до збільшення флуоресценції. На рис. 1.21 показано, який чином визначають інтенсивність FRET за спектром флуоресценції пари донор-акцептор.

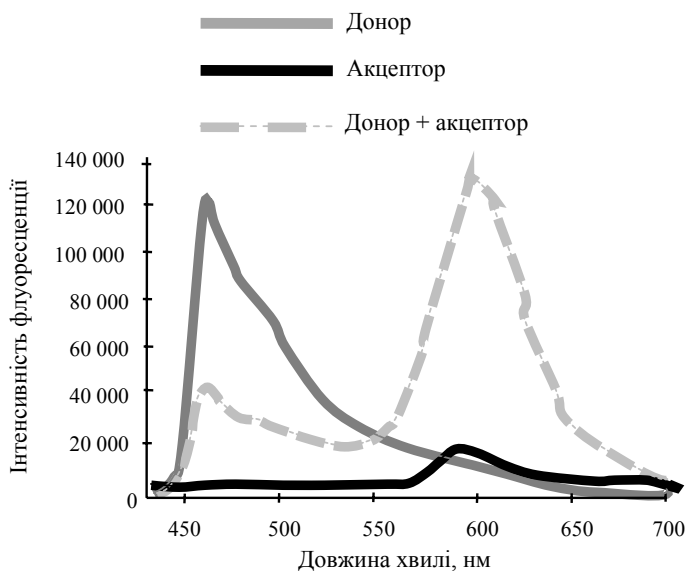


Рис. 1.21. Спектр флуоресценції індивідуальних донора й акцептора та суміші донор-акцептор. Флуоресценція акцептора збільшується в 6 разів за присутності донора. Флуоресценція донора у спектрі суміші донор-акцептор становить 1/3 від флуоресценції індивідуального донора. Це співвідношення є доказом проходження FRET. Донором є 3-октадецил-2[3-октадецил-2 (3Н)-бензотіазоліден метил] бензотіазол перхлорат, акцептором – октадецил родамін

Інший метод детекції FRET, що швидко набуває популярності, полягає у вимірюванні часу життя флуоресценції флуорофора-донора за присутності чи відсутності флуорофора-акцептора. FRET приводить до зменшення існуючого часу життя флуорофора-донора.

Як пари для перенесення енергії в методі FRET використовують флуоресцентні білки, наприклад зелений і жовтий (Miyawaki, 2011). Зелений флуоресцентний білок (англ., Green fluorescent protein, GFP) виділений з медузи *Aequorea victoria*, якому властива яскрава зелена флуоресценція за дії на нього синього або ультрафіолетового світла. Ген цього білка широко використовується для отримання мітки, що світиться, у клітинній і молекулярній біології для вивчення експресії клітинних білків.

GFP і подібні до нього репортерні білки використовуються як мітки для молекул – компонентів систем сигнальної трансдукції, наприклад, кальцію, цАМФ, цГМФ, білків систем фосфорилування, рецепторів. Тому застосування їх дозволяє вивчати процеси і клітині в реальному часі.

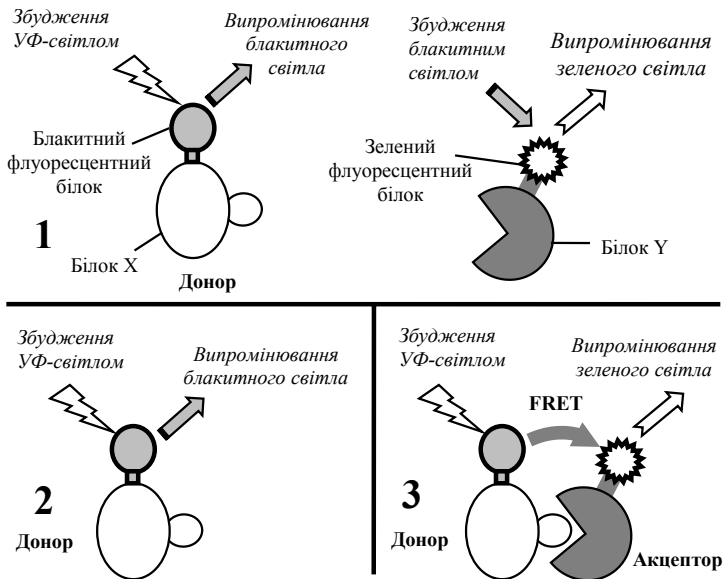
Жовтий флуоресцентний білок (англ., Yellow Fluorescent Protein, YFP) – це генетичний мутант GFP, який має пік збудження 514 нм і пік випромінювання 527 нм. Донор і акцептор можна приєднати ковалентно до сполук, що аналізуються, наприклад, до білків, що димеризуються, двох ланцюгів ДНК, антигенів чи антитіл, лігандів та їхніх рецепторів.

Одним з методів визначення ефективності FRET є вимірювання змін інтенсивності випромінювання акцептора. Коли донор і акцептор містяться на близькій відстані один від одного (1–10 нм) за взаємодії двох молекул, інтенсивність випромінювання акцептора змінюється внаслідок резонансного перенесення енергії від донора. При дослідженні конформаційних змін білків білок-мішень мітять в одному локусі донором, а в іншому – акцептором. При згинах поліпептидного ланцюга взаємна орієнтація донора й акцептора змінюється, унаслідок чого виникає сигнал FRET. У випадку, коли взаємодія між молекулами чи конформаційні зміни залежать від зв'язування лігандів, у методі FRET використовують флуоресцентні індикатори.

Метод FRET вельми популярний у біологічних дослідженнях. Його поєднують з методами флуоресцентної мікроскопії, флуоресцентної конфокальної лазерної сканувальної мікроскопії, а також

застосовують у молекулярній біології й біохімії для оцінки молекулярної динаміки, вивчення білок-білкових і білок-нуклеїнових взаємодій, детекції та візуалізації внутрішньомолекулярних взаємодій (наприклад, при конформаційних змінах білків).

Величина FRET залежить від відстані між двома флуорофорами, яка, у свою чергу, залежить від їхніх спектральних характеристик. Тому, приєднуючи флуорофори до відомих ділянок біологічних молекул, можна визначити ефективність перенесення енергії й таким чином оцінити внутрішньо- та міжмолекулярні відстані в межах нанометрів. Отже, за допомогою флуоресцентних барвників, флуоресціюючих антитіл і флуоресцентних білків (наприклад, зелений флуоресцентний білок), які зв'язуються з різними компонентами клітини, можна помітити й дослідити методом практично будь-яку молекулу. На рис. 1.22 наведено приклад застосування зеленого і блакитного флуоресцентних білків для детекції біомолекул методом FRET.



1.22. Схема методу флуоресцентного резонансного перенесення енергії (FRET) із застосуванням флуоресцентних білків:

- 1 – пари донор-акцептор; 2 – збудження донора;
- 3 – виникнення FRET при зближенні донора й акцептора

За допомогою FRET досліджують структуру, конформаційні зміни і взаємодії між молекулами, даний метод – потужний індикатор біохімічних подій. FRET є основою для біосенсорних методів вивчення передачі сигналів і дає можливість дослідити й кількісно оцінити взаємодії під час сигнальної трансдукції за участю цАМФ, кальцію, активованого Ras. Він дозволяє досліджувати процеси внутрішньоклітинної сигналізації на принципово новому рівні. За допомогою FRET вивчають утворення білкових комплексів, функції рецепторів у білок-білкових взаємодіях, динаміку мембран і просторові взаємодії молекул (Zadran, 2012). Цей метод дає можливість досліджувати плазматичні мембрани, візуалізуючи їхню поверхню.

Значною перевагою методу FRET є те, що він дозволяє відстежувати молекулярні події в живих клітинах у реальному часі, що робить можливим отримання принципово нових даних про біологічні процеси.

1.6.4. Метод HTRF

Технологія *HTRF* (англ., Homogeneous Time-Resolved Fluorescence) поєднує методи FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) і TRF (Time Resolved Fluorescence), у якій вимірювання інтенсивності флуоресценції проводиться з розділенням у часі (англ., time-resolved measurement), тому цей метод також називається флуориметрією, розділеною в часі (англ., time-resolved fluorometry, TRF) або TR-FRET (Time-Resolved FRET).

Значною перевагою TR-FRET є вимірювання у збільшеному часовому діапазоні, що дозволяє зменшити фонову флуоресценцію. Вимірювання флуоресценції стандартним методом FRET утруднене внаслідок виникнення фонові флуоресценції зразка, обумовленої компонентами буферного розчину, білками та середовищем клітинного лізату, розсіюванням світла, аутофлуоресценцією. Цей тип фонові флуоресценції є дуже короткочасним (у межах наносекунд), і тому його можна позбутися за допомогою підходів, що розширюють часовий проміжок вимірювання. На рис. 1.23 показано часову затримку (близько 50–150 мкс) між збудженням системи і вимірюванням інтенсивності флуоресценції. Це "очищує" сигнал

від неспецифічних короткотривалих випромінювань компонентами досліджуваного зразка. Акцептори HTRF здатні до довготривалої флуоресценції, тому їх використовують у модифікованому методі FRET. Таке довготривале випромінювання відбувається тільки тоді, коли акцептор перебуває в безпосередній близькості до мічених біомолекул.

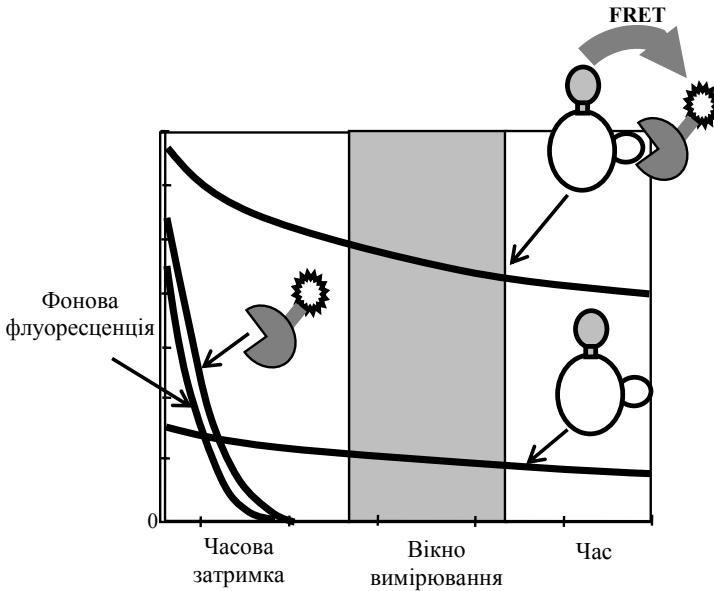


Рис. 1.23. Часова затримка між збудженням системи і вимірюванням інтенсивності флуоресценції методом HTRF. Передача енергії між джерелом збудження (лазером) супроводжується часовою затримкою, унаслідок чого короткотривала фонові флуоресценція компонентів середовища згасає

Важливим показником FRET є радіус Ферстера (R_0), що відображає відстань, за якої ефективність FRET становить 50%. Для HTRF величина R_0 знаходиться у межах 50–90 Å і залежить від типу використаного акцептора. Проте така відстань є теоретичною, оскільки не беруться до уваги просторові молекулярні перебудови. Тому розроблено цілий ряд методик на базі HTRF, у яких застосовуються молекулярні комплекси різного розміру. Серед них є системи, що аналізують малі фосфорильовані пеп-

тиди, імунологічні методи визначення великих глікопротеїнів, таких як тиреоглобулін, непряма детекція (за допомогою вторинних антитіл) мічених комплексів CD28/CD86.

У методі НТRF використовуються декілька ретельно відібраних флуорофорів. Пари донор-акцептор, що беруть участь у процесі FRET, мають відповідати критеріям сумісності. По-перше, їхній спектр випромінювання повинен містити ділянки, які не перекриваються, що дає можливість вимірювати флуоресценцію кожного партнера. По-друге, квантовий вихід FRET, тобто його ефективність, має бути настільки великим, наскільки це можливо. По-третє, випромінювання флуоресценції має відбуватися в ділянці спектра, максимально віддаленій від ділянки, властивій білкам. У технології НТRF використовуються комбінації декількох флуорофорів, які утворюють систему TR-FRET. Центральним елементом цієї системи є донор енергії, котрий складається з рідкоземельного комплексу, у якому іон лантанію (європій чи тербій) міцно вбудований у макроцикл. Така унікальна структура надає донору здатності до довготривалої флуоресценції, тому така міцна структура може використовуватись у різних умовах дослідження.

Найчастіше як НТRF-донори використовують крипрати європію (Eu^{3+}), за відкриття яких Ж.-М. Лен отримав у 1987 р. Нобелівську премію з хімії. Вони являють собою рідкі комплекси лужноземельних металів, у яких макроциклом є похідна трисбірину (*trisbipyridine*) (рис. 1.25).

З цією метою також використовують крипрат Lumі4-Tb, до складу якого входить іон тербію, що має структуру, подібну до крипратів європію. Такі макроциклічні структури збирають і передають енергію до іонів Eu^{3+} і Tb^{3+} , які після цього вивільнюють її у вигляді флуоресценції. Для обох крипратів характерне довготривале випромінювання (від 1 до 2 мс), що й дозволяє проводити вимірювання з розділенням у часі. Відповідно до НТRF-донорів (крипратів Eu^{3+} і Tb^{3+}) оптимізовано НТRF-акцептори, які мають порівнянні з ними випромінювальні властивості. Крипрати Eu^{3+} найсумісніші з акцепторами, що випромінюють у ближній інфрачервоній ділянці спектра, пік інтенсивності флуоресценції становить 665 нм. А Lumі4-Tb є донором у парі з червоними акцепторами, такими як флуоресцеїн, зелений флуоресцентний білок, пік інтенсивності випромінювання якого становить 520 нм.

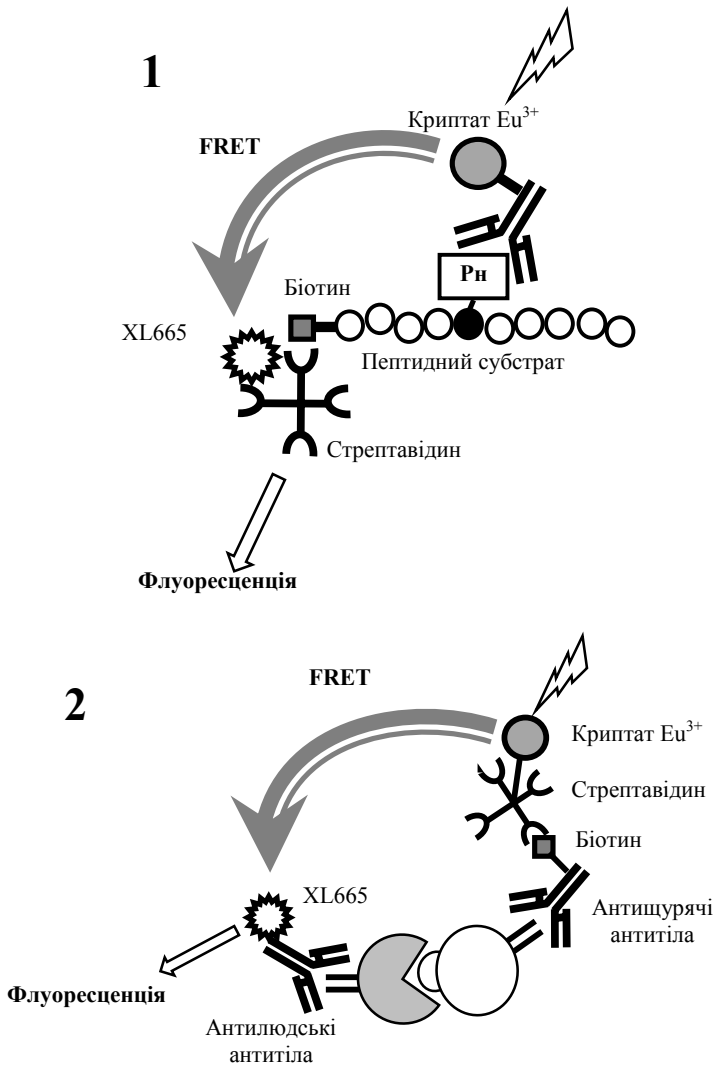


Рис. 1.24. Застосування методу HTRF для визначення молекул, коли донор і акцептор знаходяться на різних відстанях:
 1 – визначення активності протеїнкіназ за рівнем фосфорильованого біотинільованого пептиду (коротка відстань)
 2 – визначення CD28/CD86 (довга відстань)

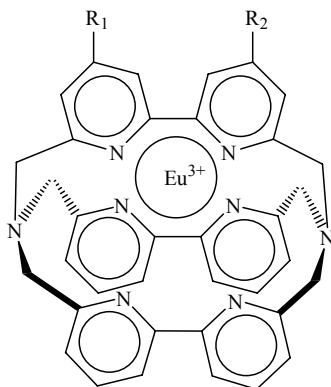


Рис. 1.25. Формула криптату європію, який використовують як донор у HTRF-технології

Першим HTRF-акцептором був XL665 – фікобіліпротеїновий пігмент алофікоціанін, виділений із червоних водоростей. Він є великою гетерогексамерною сполукою масою 105 kDa, який після виділення піддають поперечному зшиванню для підвищення стабільності та збереження фотофізичних властивостей. Друге покоління акцепторів має у 100 разів менші розміри. Їхній спектр збудження перекривається із сектором випромінювання криптатів Eu^{3+} і Tb^{3+} , тому вони можуть збуджуватися цими донорами. При цьому максимум інтенсивності випромінювання акцептора знаходиться в ділянці спектра 665 нм, де криптати неспроможні випромінювати або випромінюють дуже слабо. Перенесення енергії від донора до такого акцептора дає високий квантовий вихід.

Широковживаним HTRF-акцептором є d2, який було обрано за даними скринінгу 14 700 сполук за допомогою підходу, у якому визначали кількість фосфорильованого пептиду. Його, наприклад, використовують для визначення цАМФ та інозитом-1-фосфату. d2 має невеликі розміри, він є більш стабільним при використанні в імуноконкурентних методах і зумовлює більшу чутливість визначення.

У HTRF-технології використовують комбінації криптатів Lumi4-Tb і зелених акцепторних барвників чи флуоресцентних білків, що розширює сферу застосування цього HTRF. Крім XL665 і d2, зелені акцептори повністю сумісні за спектральними

характеристиками з криптатами Lumi4-Tb. З їхнім використанням було розроблено методи зв'язування лігандів (Tag-lite® ligand binding assays), у яких другий партнер (ліганд або рецептор) мітять зеленим синтетичним акцептором. Також використовують зелений флуоресцентний білок чи химерні білки (fusion proteins), до складу яких він входить.

HTRF-технологія є основою для численних методів дослідження біологічних молекул. Розроблено велику кількість методів дослідження компонентів внутрішньоклітинної сигналізації (цАМФ, цГМФ, інозитол-1,4,5-трифосфату та інозитол-1-фосфату, фосфатидилінозитол-3-кінази, Akt-кінази), цитокінів (TNF- α).

Уперше HTRF застосовували в поєднанні з методами імуноаналізу (Western-блотингу, ELISA), на базі яких було створено набори для біохімічних досліджень, тестування фармакологічних препаратів, діагностики. З їхньою допомогою стало можливим проводити функціональні дослідження живих цілих клітин (cell-based assays) за фізіологічних умов (рис. 1.26). Це дає можливість вимірювати указаний білок не тільки у клітинних екстрактах, а й у цілих клітинах, а також дозволяє визначати в культуральній рідині молекули, що секретуються клітинами.

Другим напрямком застосування HTRF є "сендвіч"-методи (HTRF® sandwich assays), якими оцінюють молекули, що є достатньо великими для включення в них різних сайтів зв'язування для двох антитіл. Такі антитіла мітять криптатами Eu³⁺ або Lumi4®-Tb і HTRF-акцептором (наприклад, XL665 чи d2). Ці два кон'югати зв'язуються з антигеном зразка, унаслідок чого відбувається FRET (рис. 1.27). Інтенсивність сигналу пропорційна кількості утворених комплексів антиген-антитіло, і, відповідно, концентрації антигену. Таким методом визначають клітинні протеїнкінази (Erk, Akt), цитокіни (TNF- α , IL2, IL8), аполіпропротеїни плазми крові Apo A1 і B, інсулін, амілоїдний пептид B1-40, κ - і λ -ланцюги IgG людини та ін.

Конкурентні імунологічні методи (immunocompetitive assays) на базі HTRF дозволяють оцінювати молекули, що є занадто малими для зв'язування з двома антитілами.

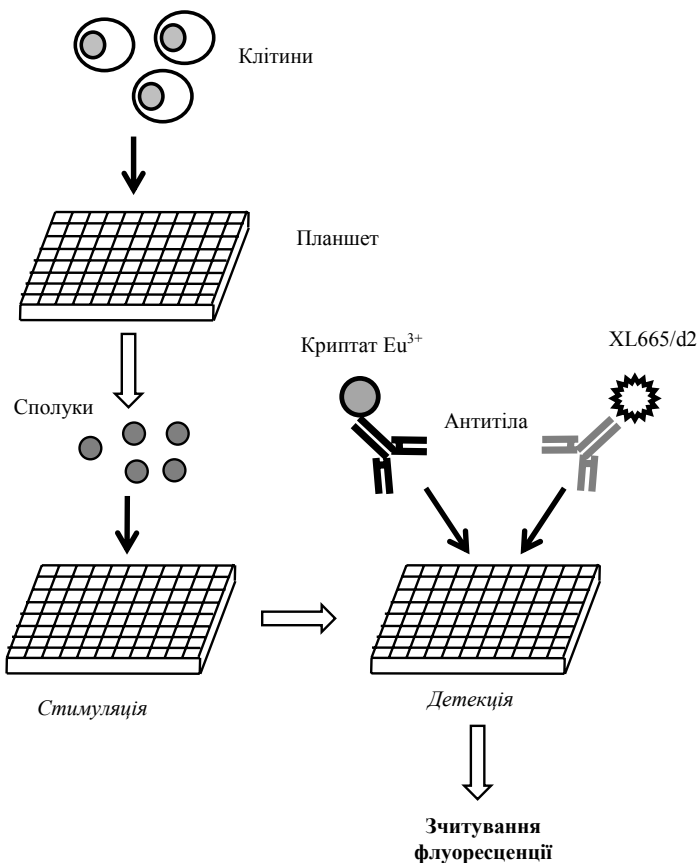


Рис. 1.26. Схема дослідження в цілих клітинах методом HTRF® cell-based assay

Для визначення використовують кон'югати акцептора з очищеним антигеном та відповідним антитілами, зв'язаним з криптатами Eu^{3+} чи Lumi4®-Tb. Антиген, присутній у зразку, конкурує з кон'югатом антигену тест-системи за зв'язування з антитілами, у результаті чого виникає FRET. Інтенсивність FRET зменшується зі збільшенням кількості дисоційованих комплексів антиген-антитіло, тобто сигнал модулюється негативно і є зворотно пропорційним концентрації антигену.

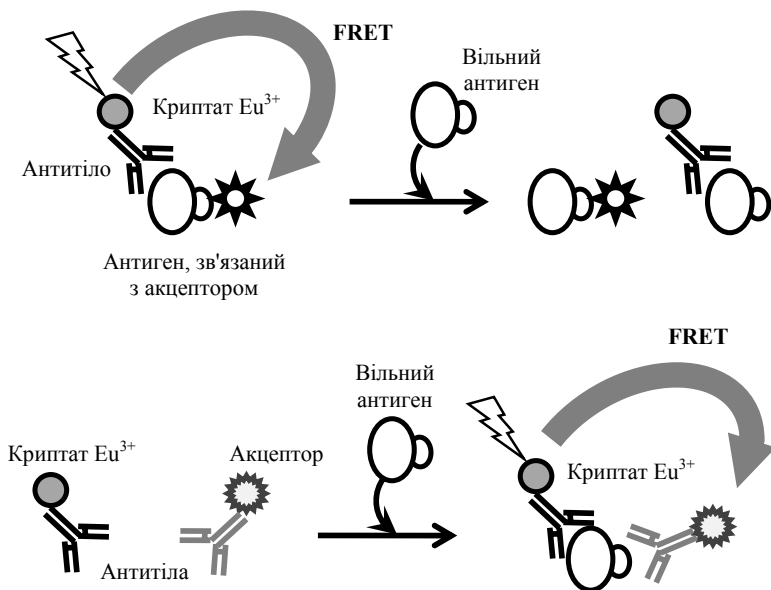


Рис. 1.27. Принцип "сендвіч"-методу NTRF

Таким методом визначають цАМФ, цГМФ, інозитол-1-фосфат, гістамін, простагландин Е2, лейкотрисени В4 і С4, глутатіон-S-трансферазу, естрадіол, глюкагон, кортизон, альдостерон, фосфотрасферазну активність, індуковану АДФ (transcreener ADP), загальний IgG людини, CD16a-рецептор, NAD-залежну деацетилазу sirtuin-1 тощо.

1.6.5. Метод LANCE® Ultra (TR-FRET)

Методи LANCE (Lanthanide chelate excite) і LANCE Ultra є модифікаціями методу TR-FRET (англ., time-resolved fluorescence resonance energy transfer), а саме його гомогенного варіанта (який не потребує відмивань). Одну досліджувану молекулу мітять флуорофором-донором (хелатом Eu³⁺), а другу – флуорофором-акцептором (барвником ULight™, алофікоціаніном, синьо-зеленим барвником ціаніном). При збудженні донора світлом з довжиною хвилі від 320 до 340 нм енергія передається від донора до акцептора,

якщо вони містяться один від одного на відстані близько 10 нм, яка є достатньою для виникнення FRET. Це приводить до випромінювання світла, довжина хвилі якого становить 665 нм (для барвника ULight™ та алофікоціаніну) (рис. 1.28). У методі LANCE використовуються хелати Eu-W1024 chelate і Eu-W8044, що є більш стабільними за температур понад 38 °С, і стійкими за вищих концентрацій ЕДТА (Hemmila, 1999).

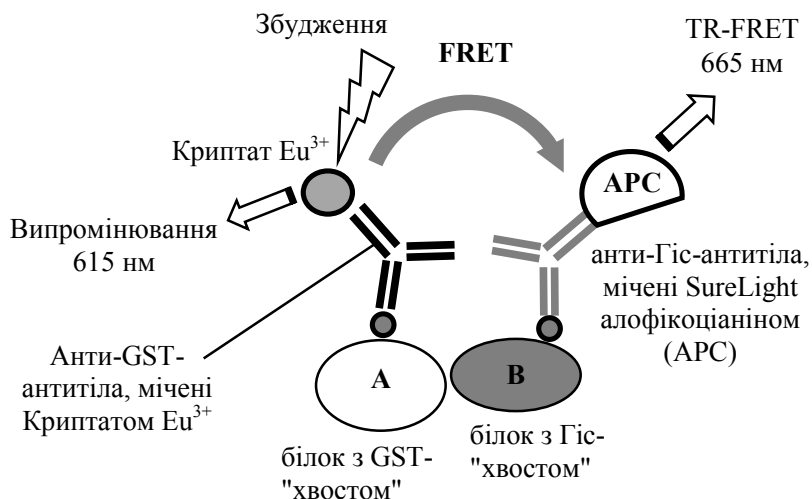


Рис. 1.28. Схема методу LANCE TR-FRET із використанням хелату Eu^{3+} і барвника SureLight® алофікоціаніну

Пряме мічення пептидного субстрату (при визначенні протеїнкіназ) поряд з використанням барвника ULight™ надає методу LANCE Ultra TR-FRET більшої ефективності, оскільки ця невелика молекула дозволяє подолати стеричні обмеження при взаємодії донорних і акцепторних флуорофорів. Крім цього, їхня взаємодія є більш стабільною. Тому такий метод має ряд переваг перед традиційним методом TR-FRET, у якому використовують менш ефективні комбінації флуорофорів.

Компанією "PerkinElmer" (США) було створено два варіанти методу LANCE: традиційний LANCE TR-FRET і LANCE Ultra TR-FRET. Обидва вони використовують хелати лантаноїдів як донори-флуорофори, проте акцептори-флуорофори є різними. Для традиційного LANCE акцептором є барвник SureLight® алофікоціанін (APC) масою (>100 kDa), що є похідним рослинного пігменту – світлозбирного білка (рис. 1.28). Він діє як велика антена і тому є ідеальним для дослідження білок-білкових взаємодій, які можуть відбуватися на відстанях, більших за ті, що необхідні для виникнення FRET. Барвник-акцептор ULight™ застосовується у методі LANCE Ultra TR-FRET (рис. 1.29). Він має меншу масу (<800 Da) і придатний для мічення молекул будь-якого розміру (включаючи малі молекули й пептиди). Також він зменшує стеричні обмеження для мічених молекул і тому є ефективним для визначення активності ферментів за допомогою мічених субстратів.

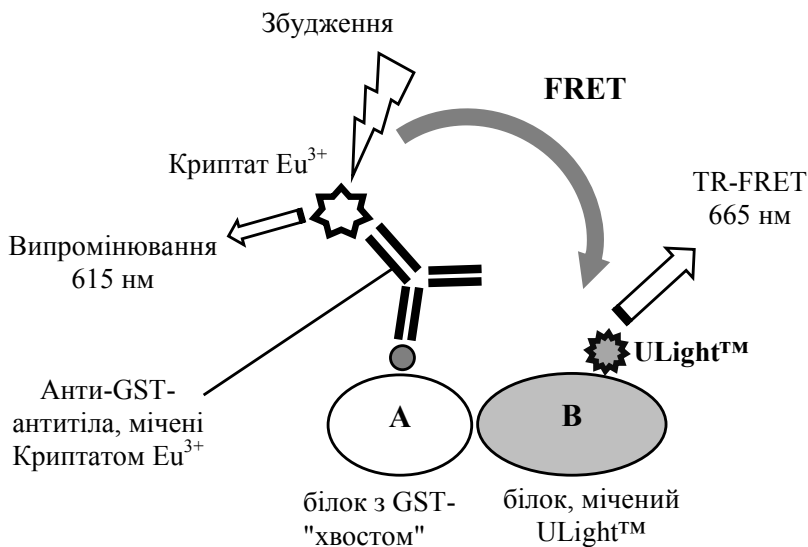


Рис. 29. Схема методу LANCE Ultra TR-FRET з використанням хелату Eu^{3+} і барвника ULight™

Метод LANCE TR-FRET широко використовується у біологічних дослідженнях: для вивчення активності протеїнкіназ, фосфатаз і протеаз, активації рецепторів, спряжених із G-білками, визначення концентрації цАМФ у біологічних зразках, білок-білкових і білок-нуклеїнових взаємодій, взаємодій білків з малими молекулами, зв'язування лігандів з рецепторами, димеризації рецепторів, посттрансляційних модифікацій та ін.

Методом LANCE Ultra TR-FRET можна визначити активність понад 310 серин/треонінових та тирозинових протеїнкіназ. Цей високоефективний біохімічний метод дозволяє визначити фосфорильовані пептиди і білки за фізіологічних концентрацій АТФ. Його виконання мінімізовано до двох етапів. При визначенні активності протеїнкіназ застосовують пептидний субстрат, мічений барвником ULight™, здатним до випромінювання світла з високою інтенсивністю, та відповідні антифосфо-антитіла, мічених Eu^{3+} . Коли субстрат фосфорильється протеїнкіназою, фосфорильована ділянка цього субстрату впізнається вказаними антитілами.

При збудженні донорного флуорофору (Eu^{3+}) за довжини хвилі 320–340 нм енергія передається на акцепторний флуорофор (ULight™), що супроводжується випромінюванням світла за довжини хвилі 665 нм (рис. 1.30). Інтенсивність флуоресценції пропорційна вмісту фосфорильованого пептиду.

Визначення здійснюють у два етапи. На першому – у мікропланшетах проводять кіназну реакцію: вносять біологічний зразок (джерело кінази), додають мічений субстрат, АТФ, інгібітори протеїнкінази (якщо тестують їхню дію на фермент) і буфер. Після цього реакційну суміш інкубують (зазвичай за кімнатної температури). На другому етапі проводять детекцію: додають ЕДТА для зупинки кіназної реакції, потім додають мічені Eu^{3+} антифосфо-антитіла для досліджуваної протеїнкінази у спеціальному буфері. Суміш інкубують для зв'язування антитіл з фосфорильованою ділянкою, після чого рееструють флуоресценцію.

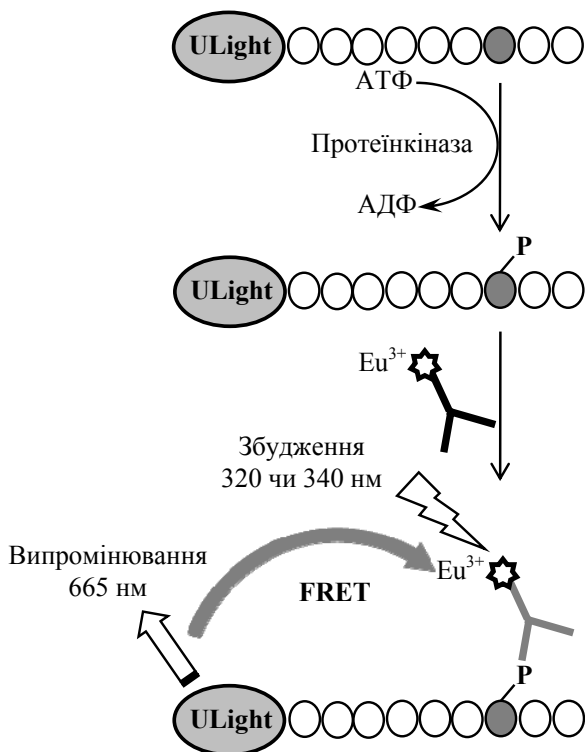


Рис. 1.30. Приклад детекції фосфорильованого субстрату методом LANCE (LANCE Ultra kinase assay) з використанням мічених Eu^{3+} антифосфо-антитіл та міченого барвником ULight™ пептидного субстрату

При визначенні активності протеїнофосфатаз методом LANCE Ultra TR-FRET використовують специфічні антифосфо-антитіла, мічені Eu^{3+} , та фосфорильовані субстрати, мічені барвником ULight™. Інтенсивність сигналу пропорційна рівню фосфорильованого субстрату (рис. 1.31). Оскільки під час роботи фосфатази його рівень знижується з часом, взаємодія між міченими донором антитілами і міченим акцептором пептидом послаблюється. Тому збільшення фосфатазної активності приводить до зменшення сигналу FRET. Інгібітори фосфатази перешкоджають такому зменшенню шляхом концентраційної залежності.

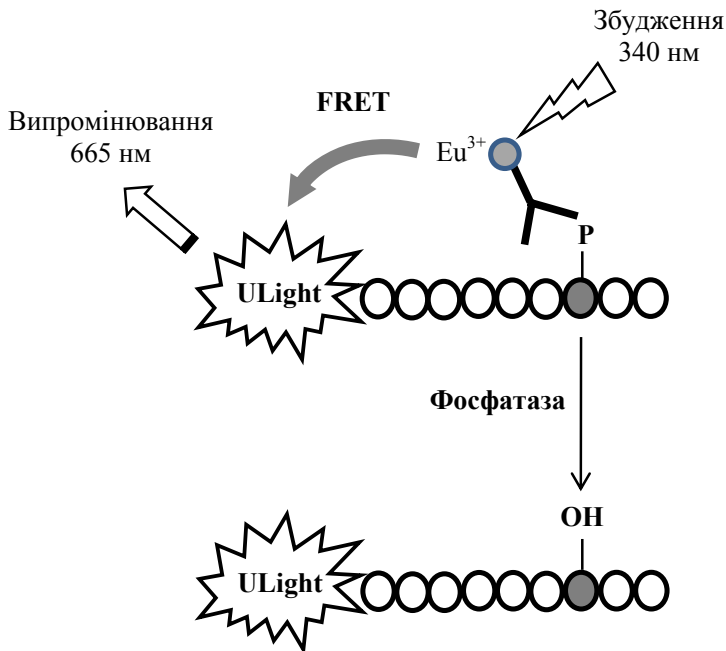


Рис. 1.31. Принцип визначення активності протеїнфосфатази методом LANCE Ultra

1.7. ЕПР-СПЕКТРОСКОПІЯ

Метод *електронного парамагнітного резонансу (ЕПР)* базується на явищі резонансного поглинання електромагнітного випромінювання неспареними електронами, які поміщають у магнітне поле. Інакше кажучи, в основі методу покладено перехід неспареного атома азоту стабільної парамагнітної сполуки (спінового зонда чи спінової мітки) з одного енергетичного рівня на інший у сильному магнітному полі під впливом мікрохвильового випромінювання (близько 10^{10} Гц). На орбіталях атома розташовані електрони, що мають магнітний момент, тобто спіни. Магнітний момент електронних пар з антипаралельними спінами дорівнює нулю. За відсутності зовнішнього магнітного поля всі механічні й магнітні спінові моменти електрона орієн-

туються випадковим чином і мають практично однакову енергію. За дії прикладеного магнітного поля неспарені електрони будуть орієнтуватися паралельно або антипаралельно (за полем чи проти поля). Їхні енергії змінюються, а енергетичний рівень розщеплюється на два. Система, де електрони розподілені між двома енергетичними рівнями, може поглинати електромагнітне випромінювання. За певних значень величини енергії кванта, що знижується ($h\nu$), здійснюються переходи електронів між рівнями.

Поглинання відбуватиметься в тому разі, якщо енергія поглиненого кванта дорівнюватиме енергії переходу між рівнями:

$$h\nu = g\beta H,$$

де g – g -фактор, коефіцієнт внеску орбітального та спінового моменту в сумарний момент, а також характеристика положення сигналу ЕПР у всьому діапазоні магнітного поля, β – магнетон Бора, H – напруженість магнітного поля. Цей вираз називається основним рівнянням резонансу.

Отже, коли спін змінює орієнтацію, мікрохвильове випромінювання поглинається в ділянці хвиль, довжина яких становить близько 1 см. Концентрацію неспарених електронів у пробі визначають, вимірюючи величину поглинання електромагнітного випромінювання певної довжини хвилі. Якщо атом не має неспарених електронів, для проведення ЕПР-спектроскопії використовуються парамагнітні зонди, у яких є атоми азоту з неспареними електронами на $2p$ -орбіталі. Метод ЕПР дозволяє зареєструвати спектр зонда за його дуже малих концентрацій – близько 10^{-6} М. Прилад, який вимірює поглинання випромінювання, називається ЕПР-спектрометром. До його складу входять джерело випромінювання надвисокочастотного поля, механізми, які спрямовують і регулюють потік цього поля, та електромагніт, що є джерелом магнітного поля.

Спектр ЕПР являє собою залежність поглиненої потужності змінного поля від напруженості зовнішнього магнітного поля. Чим сильніша взаємодія між атомами і молекулами у зразку, тим ширший спектр ЕПР, тому за шириною спектрів можна судити про рухливість молекул зразка.

Метод ЕПР-спектроскопії широко застосовують у медико-біологічних дослідженнях, зокрема для вивчення динаміки мембран (Sahu, 2013). Для цього використовуються спінові зонди та спінові мітки – молекули або молекулярні групи, які містять неспарені електрони. Спінові зонди є сполуками, що містять нітроксильні радикали. Прикладом таких зондів є 2,2,6,6-тетраметил-піперидин-1-оксил (ТЕМПО) (рис. 1.32). У його радикалі неспарений електрон міститься біля ядра азоту, магнітне поле якого накладається на зовнішнє магнітне поле. Спектр ЕПР нітроксильних радикалів складається із трьох ліній рівної інтенсивності, завдяки взаємодії неспареного електрона з ядром атома азоту, який має спін, що дорівнює ± 1 або 0.

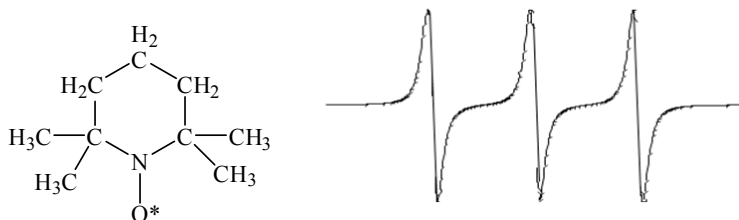


Рис. 1.32. Формула спінового зонда ТЕМПО і спектр ЕПР його нітроксильного радикала

Якщо нітроксильний радикал знаходиться у водному розчині, його обертання є ізотропним і достатньо швидким. Цей рух характеризують часом кореляції (τ_c). При зменшенні швидкості обертання проявляються анізотропні взаємодії, які приводять до розширення ліній ЕПР-спектра. Спінові зонди й мітки дають сигнали ЕПР, котрі дуже чутливі до змін їхньої молекулярної рухливості та фізико-хімічних властивостей середовища, яке оточує нітроксильний радикал.

Парамагнітні спінові зонди вводяться у мембрану. Спектр ЕПР залежить від орієнтації спінової мітки чи спінового зонда, що містять нітроксильний радикал, відносно магнітного поля, яке прикладається. Аналізуючи спектри поглинання ними електромагнітних хвиль, отримують інформацію про властивості ліпідного оточення (наприклад, про динаміку мембранних ліпідів).

ЕПР-спектроскопія використовується для визначення впорядкованості обертальної або поступальної рухливості мітки чи зонда за різних умов. За спектрами ЕПР, отриманими в мікрохвильовому діапазоні частот електромагнітних хвиль, дістають інформацію про перенесення зондів крізь мембрану, вивчають характер обертання ліпідів мембран та їхні фазові переходи. Зонди, однак, при введенні в мембрану можуть змінювати її структуру. Тому більш адекватним методом є ЯМР-спектроскопія.

Час кореляції нітроксильного радикала безпосередньо пов'язаний з мікров'язкістю середовища. За рівнянням Стокса – Ейнштейна можна визначити значення в'язкості у відповідній макроскопічній системі:

$$\eta = \tau \frac{3kT}{4\pi R^3}$$

де R – ефективний радіус нітроксильного радикала, T – абсолютна температура, τ – час кореляції, η – в'язкість.

Використовуючи нітроксильний радикал як зонд, можна визначити мікров'язкість середовища, у якому міститься радикал. Зокрема, цей підхід використовується для визначення мікров'язкості біологічних мембран.

Мембранний бішар є середовищем з низькою в'язкістю, яка може змінюватися в різних його частинах. Характеризуючи обертання зонда в мембрані, використовують поняття "мікров'язкість". За параметрами ЕПР-спектрів можна оцінити мікров'язкість мембрани. Такими є, по-перше, час обертальної кореляції (τ), який характеризує рухливість мітки в мембрані й має значення в межах $10^{-8} \dots 10^{-10}$ с (від декількох наносекунд до 0,1 наносекунди) для вільного обертання спінової мітки / флуоресцентного зонда. Характер обертання молекули визначає форму ЕПР-спектра.

Оцінюючи спектри ЕПР зонда ТЕМПО у середовищах з різною гідрофобністю, можна вивчати його поведінку в мембрані. За цими даними визначають параметр гідрофобності (f), що указує, у якій фракції мембрани міститься зонд та в якій кількості. Зокрема, параметр f використовується при вивченні процесів пероксидного окиснення у мембранах.

При вивченні динаміки мембран також розраховують параметр упорядкованості (S), величина якого свідчить про відхилення мітки від нормалі до поверхні мембрани. Наприклад, було отримано спектр ЕПР спінового зонда 5-доксил стеарату в мембрані еритроцита. При анізотропному обертанні стеаринової кислоти навколо довгої осі сигнал ЕПР сильно залежить від ступеня анізотропії обертання, який кількісно характеризується параметром упорядкованості S . Величина S дає інформацію про в'язкість мембрани. Якщо S дорівнює 1, то обертання зонда відбувається тільки навколо нормалі до площини мембрани. У "заморожених" мембранах, де ліпіди перебувають у кристалічному стані, величина S наближається до 1. У "рідких" мембранах відхилення конуса обертання зростає, величина S знижується, що викликає зміни у спектрі ЕПР. При віддаленні нітрокисльняного радикала від полярної групи жирної кислоти відбуваються характерні зміни спектра ЕПР.

Важливим параметром є коефіцієнт розподілу зонда між гідрофобною та гідрофільною фазами, який дає змогу судити про властивості мембрани. Використовують сполуки, до складу яких входить спінова мітка, локалізацію яких у мембрані можна легко передбачити. Завдяки цьому метод ЕПР дозволяє визначити рухливість складових мембран. Так, з використанням жирних кислот, з'єднаних зі спіновими мітками, визначають щільність упаковки ліпідів у мембрані та рухливість жирнокислотних ланцюгів на різній глибині бішару. Такі мічені жирні кислоти містять нітрокисльняну групу у різних положеннях відносно карбоксильної. Вони вбудовуються у мембрану в поперечній орієнтації, від глибини їхнього занурення у бішар залежить характер ЕПР-спектра. Метод ЕПР-спектроскопії також придатний для визначення мікров'язкості мембран за різних факторів, що впливають на їхню структуру.

Метод спінових міток базується на тому самому принципі зміни спектра ЕПР нітрокисльняного радикала, залежно від швидкості та ізотропності його обертання. На відміну від спінового зонда, спінова мітка ковалентно зв'язується з іншою більш-менш великою молекулою чи макромолекулою.

Метод ЕПР було застосовано для вивчення процесу фотосинтезу, а саме фотохімічні реакції перенесення електронів від хлорофілу до первинних акцепторів електронів і подальше перенесення їх по електронотранспортному ланцюгу в мембранах хлоропластів.

Використання спінових міток для ЕПР-спектроскопії є ефективним засобом дослідження не тільки мембранних ліпідів, а й білків (Möbius, 2013). Його використанням дозволили з'ясувати просторову структуру багатьох мембранних білків, а також вивчити їхню молекулярну динаміку у природному оточенні – ліпідному бішарі. Було виявлено утворені специфічними послідовностями типи вторинної структури, які визначають топологію таких білків та їхнє упакування у третинну структуру. Дослідження взаємодії між парами спінових міток, які знаходяться на великій відстані одна від одної (60–80Å), дозволило провести кількісний аналіз рівноважної динаміки білків та їхніх конформаційних змін в оточенні, близькому до природного.

Отже, традиційною галуззю застосування методу ЕПР є вивчення структурної біології мембранних білків. Новою його модифікацією є метод імпульсного ЕПР (англ. pulsed EPR), який сьогодні використовується для вимірювання довгих відстаней між спіновими мітками. Він базується на залежності динаміки спінової мітки або її рухливості щодо білка від його локальної конформації. Згідно з концепцією нітроксильного сканування, спінові мітки вводяться в білок, послідовно зв'язуючись з амінокислотними залишками поліпептидного ланцюга. Визначається розчинність спінової мітки в мембрані. Цей підхід назвали сайт-спрямованим спіновим міченням (англ., Site-Directed Spin Labeling, SDSL) (Hubbell, 2000). Його використовують для вивчення вторинної структури білків та з'ясування їхньої орієнтації в мембрані.

Метод імпульсного ЕПР дозволив подовжити відстань між двома спінами електронів до 60 Å, а в окремих випадках – навіть до 80 Å.

Для аналізу динаміки мембранних білків, як відомо із викладеного вище матеріалу, метод ЯМР є малоефективним, оскільки має обмежену чутливість і здатність виявляти великі молекули.

А для флуоресцентних методів та ЕПР з використанням спінових міток чутливість і розмір аналізованих молекул не має значення, а отже, білки можуть бути вивчені у своєму природному оточенні. Поєднання методу ЯМР та флуоресцентної спектроскопії уможливило високочутливе визначення структури й динаміки мембранних білків. Обидва методи – як ЯМР, так і ЕПР – дозволяють інтерпретувати спектральні властивості міток чи зондів, сайт-специфічно інкорпорованих у мембранні білки, і на базі цього передбачувати особливості їхньої локальної структури та аналізувати динаміку.

1.8. ЯМР-СПЕКТРОСКОПІЯ

ЯМР-спектроскопія – метод дослідження хімічних об'єктів, що базується на явищі ядерно-магнітного резонансу. Цей метод дозволяє вивчати динамічні процеси в мембрані, визначаючи величину енергетичних бар'єрів внутрішньомолекулярного обертання. Він ґрунтується на поглинанні електромагнітних хвиль у радіочастотному діапазоні ядрами, які мають магнітний момент. Вони переважно належать атомам з непарною кількістю протонів. За відсутності магнітного поля магнітні моменти таких ядер розташовані неупорядковано. За дії постійного магнітного поля вони розташовуватимуться паралельно полю або антипаралельно (вищий енергетичний стан ядра). Коли магнітний момент ядра змінює свою орієнтацію з паралельної на антипаралельну, відбувається резонансне поглинання електромагнітних хвиль. *Ядерний магнітний резонанс* – це резонансне поглинання ядер у радіодіапазоні електромагнітних хвиль у магнітному полі напруженістю декілька сотень мікротесел (мТл). Сучасні ЯМР-спектрометри працюють на магнітному полі напруженістю 1–10 Тл, електромагнітні хвилі створює радіочастотний генератор. ЯМР-спектр являє собою залежність поглиненої енергії від напруженості магнітного поля. За таким спектром отримують інформацію про структуру біомолекул, міжмолекулярні взаємодії та молекулярний рух. За допомогою методу ЯМР можна виявити розташування окремих атомів у невеликих молекулах масою від 500 до 1000 Да.

У дослідженнях використовують спектроскопію протонного магнітного резонансу (^2H ЯМР-спектроскопію), ^{13}C ЯМР-, ^{19}F ЯМР- та ^{31}P ЯМР-спектроскопію. Найчастіше для вивчення мембран застосовують ^2H ЯМР-спектроскопію, оскільки атоми водню у ліпідах певних ділянок мембрани можна замінити на атоми дейтерію без істотного порушення її структури. За допомогою ЯМР визначають не тільки атоми, а й біомолекули та надмолекулярні комплекси. ^2H ЯМР- та ^{31}P ЯМР-спектроскопія є ефективними методами вивчення структури й динаміки мембранних ліпідів, а також білок-ліпідних взаємодій, залучених до регуляції функціонування трансмембранних білків та іонних каналів (Gawtisch, 2002).

При проведенні ЯМР зразок поміщають у скляну трубку. У магнітному полі ЯМР-активні ядра (^1H , ^{13}C) поглинають електромагнітну енергію. Різні протони в молекулах резонують на різних частотах. Резонансна частота, енергія поглинання пропорційні силі магнітного поля. Зміщення частоти перетворюється на величину, яку називають хімічним зсувом і вона не залежить від магнітного поля. Оскільки хімічний зсув залежить від хімічної будови сполуки, він застосовується для отримання інформації про молекулах у зразку. Для визначення структури в одновимірному ЯМР-спектрі є важливими спін-спінові взаємодії між активними ЯМР-ядрами. Вони виникають унаслідок переходів між різними спіновими станами ядер у молекулах. Структура ЯМР-спектра визначається часом життя різних спінових станів, величиною дипольної взаємодії між ядрами тощо. Також важливим параметром ЯМР-спектра є T_1 , який надає інформацію щодо процесу релаксації і є прямо пропорційним рухливості окремих атомів. За допомогою ЯМР-спектроскопії вдалося вивчити рухливість окремих атомів у межах молекул, що входять до складу мембран. Наприклад, за величиною T_1 окремих атомів вуглецю в мембранних фосfolіпідах судять про рухливість зв'язків C–C на поверхні мембрани та всередині бішару.

Також у ^2H ЯМР-спектроскопії використовується параметр упорядкованості S , який було визначено для фосfolіпідів мембран, у яких атоми водню в метиленових групах жирних кислот (переважно пальмітинової) було заміщено на дейтерій. Його аналіз показав, що метиленові групи всередині мембрани розташовані менш упорядковано порівняно з тими, що розташовані на її поверхні.

Раніше вважалось, що ЯМР-спектроскопія малоефективна для дослідження мембранних білків, оскільки вони є великими молекулами. Ця методологія була розвинена швейцарськими вченими Р. Ернстом для дослідження біологічних макромолекул (Нобелівська премія, 1991 р.) та К. Вютріхом для визначення тривимірних структур біологічних макромолекул (Нобелівська премія, 2002 р.) Було розроблено нові ЯМР-спектрометри, створено кращі зонди та запропоновано нові спектроскопічні методи, завдяки чому було вивчено білки невеликої маси – до 80 кДа.

Вивчення інтегральних мембранних білків досі не втрачає актуальності, оскільки на їхню частку припадає 30% усіх білків, що синтезуються в організмі. Причиною цього є, по-перше, те, що мембранні білки важко експресувати й очищати у великих кількостях (десятки міліграмів), а також піддавати правильному фолдингу. По-друге, для аналізу їхньої структури та функцій необхідні або обробка детергентами, або наявність ліпідного оточення. Компоненти оточення, що імітує мембрану, вкривають білки, створюючи великі комплекси, які важко аналізувати методом ЯМР.

До 2009 р. інтегральні мембранні білки вивчали переважно методом рентгенівської кристалографії. Після цього протягом трьох років було застосовано метод *рідинного ЯМР* (англ., liquid-state NMR, або solution NMR). Проте невдовзі було запропоновано більш ефективний метод *твердофазового ЯМР* (англ., solid-state NMR, SSNMR), який базується на анізотропних (залежних від напрямку) взаємодіях. Він дозволив вивчати структуру й орієнтацію інтегральних мембранних білків (Verardi, 2012). Сьогодні розроблено цілий ряд технологій мічення мембранних білків радіоактивними ізотопами ^1H , ^{15}N , ^{13}C , ^2H для наступного аналізу методами рідинного і твердофазового ЯМР. Вони придатні для вивчення мембранних білків не тільки в очищеному вигляді, а також у складі міцел та ліпідних везикул.

Метод рідинного ЯМР дозволяє вивчати не тільки структуру молекул та їхні взаємодії (навіть слабкі та короткочасні) у розчині, а й характеризувати функціональні процеси в живих клітинах. Він ґрунтується на швидкій переорієнтації молекул, що приводить до ізотропного хімічного зсуву та усереднення дипо-

лярних взаємодій. Тому ЯМР-спектр, отриманий методом рідинного ЯМР, складається із серії чітких переходів, які виникають унаслідок усереднення анізотропних взаємодій (швидких випадкових переходів). На відміну від нього, спектр, отриманий методом твердофазового ЯМР, дуже широкий, у ньому переважають анізотропні або орієнтаційні взаємодії. Виділяють два напрямки твердофазового ЯМР (SSNMR): O-SSNMR (oriented solid-state NMR) і MAS (magic angle spinning) SSNMR. За допомогою першого визначають орієнтацію мембранних білків у ліпідних бішарах або біцелах.

Найчастіше для мічення мембранних білків використовуються ізотопи ^1H , ^2H , ^{13}C і ^{15}N , рідше – ^{31}P , ^{19}F і ^{17}O . Із них ^1H зустрічається у природних (не мічених) мембранних білках, тоді як інші штучно вводять у білки. Розроблено стандартні й селективні схеми мічення мембранних білків для їхнього наступного аналізу ЯМР-спектроскопією (рис. 1.33). У першому випадку білки за однаковою схемою мітяться ізотопом ^{13}C . У другому, якщо білок збагачений на ізотоп у певних сайтах, його мітять селективно.

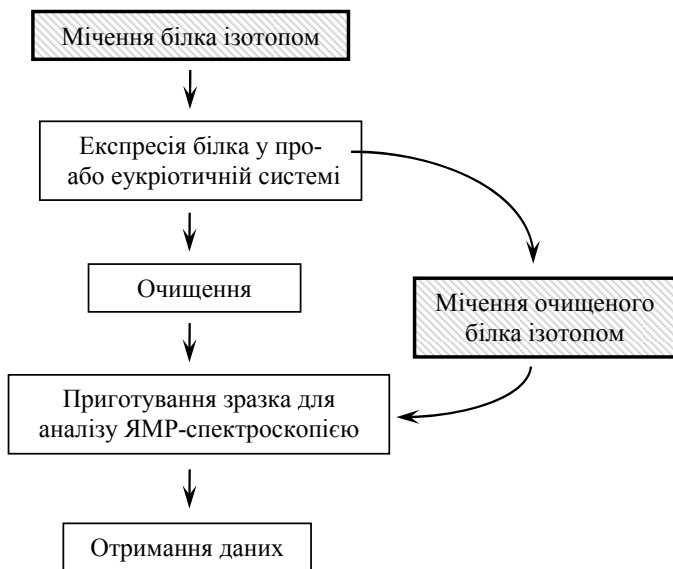


Рис. 1.33. Схема отримання мічених мембранних білків для вивчення їх методом ЯМР-спектроскопії

Системи експресії для отримання радіоактивно мічених мембранних білків. Оскільки ЯМР нечутливий до низьких кількостей матеріалу, що аналізується, перед дослідниками постала необхідність отримати мембранні білки у великих кількостях (міліграмах), крім цього вони повинні зазнавати правильного фолдингу та зберігати свою біологічну активність. Для цього було створено цілий ряд про- та еукаріотичних систем експресії таких білків, а також застосовано безклітинні системи експресії (Verardi, 2012). Крім того, деякі білки отримують хімічним синтезом. Кожен із цих методів має свої переваги та недоліки, і вибір того чи іншого методу залежить від індивідуальних особливостей досліджуваного білка.

Бактеріальні системи експресії створено на базі клітин *E. coli*. Перевагами таких систем є простота генетичних маніпуляцій з метою введення чужорідних генів та контролю їхньої експресії, швидкий ріст та можливість отримання великих кількостей цільового білка (Kim, 2009). Існує низка векторів, що експресуються в *E. coli*; також створено клітинні лінії для підвищеної експресії в них мічених ізотопами білків, призначених для вивчення ЯМР-спектроскопією. Велика кількість про- та еукаріотичних мембранних білків здатні експресуватися у клітинах *E. Coli*. Але використання таких систем для отримання еукаріотичних мембранних білків є обмеженим, оскільки між продукцією про- та еукаріотичних мембранних білків існують суттєві відмінності, зокрема особливості їхнього кодування, посттрансляційні модифікації, склад ліпідного оточення у мембрані. Тому при експресії мембранних білків еукаріотів у *E. coli* вони можуть знаходитися у включеннях усередині клітини (inclusion bodies), не підлягаючи інкорпорації в мембрану. Це потребує додаткових етапів їхнього очищення, щоб одержати функціонально активні білки.

Для отримання рекомбінантних мембранних білків використовують також дріжджові клітини *Saccharomyces cerevisiae* і *Pichia pastoris*, у яких вони підлягають посттрансляційним модифікаціям подібно до вищих еукаріотів, а також мають механізми секреції. Крім того, у цих клітинах зазнають фолдингу білки, що мають множинні дисульфідні зв'язки. Подібно до *E. coli*, створено методи внесення у білки ізотопів ^{15}N і ^{13}C , у клітинах *Pichia* можливе також селективне ізотопне мічення.

Безклітинні системи експресії мембранних білків мають цілий ряд переваг: 1) вони не залежать від клітинного оточення, 2) дозволяють у короткий проміжок часу оптимізувати експресію, підбираючи різні умови, 3) мічені білки в реакційній суміші можна відразу аналізувати ЯМР-спектроскопією, 4) можна підбирати нові схеми мічення. За допомогою таких систем було отримано мембранні транспортери та іонні канали *E. coli*, рецептори людини, зв'язані з G-білками тощо.

Модельні мембранні системи для вивчення мембранних білків методом ЯМР-спектроскопії. Отримані рекомбінантні мембранні білки мають бути очищені від ендогенних клітинних білків та солюбілізовані в мембрано-міметичні структури, які можна вивчати методом ЯМР. Білки, що експресуються у включеннях, солюбілізують жорсткими детергентами (SDS) або хаотропними агентами (сечовина). Після цього їх піддають очищенню з використанням неоінних детергентів та детергент-ліпідних сумішей, під час якого білки зазнають рефолдингу. Білки, що інтегруються в мембрану, екстрагують та солюбілізують м'якими детергентами на всіх етапах очищення; при цьому вони зберігають свою нативну структуру. У цьому випадку використовують лізофосфоліпіди (LMPC і LMPG), оскільки вони дозволяють отримати ЯМР-спектр високої якості. Інколи також використовують лаурилдиметиламіноксид та алкілфосфохоліни, які є більш жорсткими. Було показано, що застосування певних детергентів дає можливість отримати кращі ЯМР-спектри.

Вивчення мембранних білків методом рідинного ЯМР є більш ефективним, коли вони вбудовані в детергентні міцели, ніж коли знаходяться в сумішах органічних розчинників. Залежно від довжини трансмембранного домену білка та його внутрішньоклітинного "хвоста" застосовують міцели різного діаметра. Поєднання методів ЯМР та розсіювання рентгенівських променів за малих кутів (англ., small-angle scattering, SAS) дозволило визначити розмір багатьох білково-детергентних міцел, їхню форму та придатність для спектроскопічних досліджень. Показано, що додавання дуже малих кількостей фосфоліпідів до міцел приводить до різкого поліпшення якості ЯМР-спектра деяких інтегральних мембранних білків.

Найчастіше для вивчення мембранних білків методом ЯМР використовуються біцели. Вони являють собою бінарні детергент-ліпідні суміші, які складаються із двошарових водорозчинних ансамблів. До їхнього складу входять ліпід диміристоїлфосфатидилхолін (DMPC) і детергент або ліпід дигексаноїлфосфатидилхолін (DHPC) і похідна цвітер-іонної солі жовчної кислоти (CHAPSO). Ізотропні (однорідні) біцели DMPC-DHPC дають кращий ЯМР-спектр.

Склад міцел описує параметр q – молярне співвідношення між ліпідом і детергентом вище критичної концентрації міцелотворення (англ., СМС – critical micellar concentration):

$$q = \text{тотальна полярність ліпиду} / (\text{тотальна полярність детергенту} - \text{СМС для детергенту})$$

Біцели DHPC-DMPC, що використовуються для ЯМР-спектроскопії інтегральних мембранних білків, зазвичай бідні на ліпіди і багаті на детергенти, тобто їм властиві низькі значення q в межах 0,25–0,5. Якщо $q = 0,5$, утворені ансамблі є занадто великими, що заважає отримати ЯМР-спектр з високою роздільною здатністю. За $q < 0,25$ втрачається чітка різниця між біцелами правильної морфології та звичайними ліпід-детергентними сумішами.

Біцели було широко використано для реконструкції великої кількості мембранних білків, наприклад протонної помпи (small multidrug-resistance pump) EmrE *Escherichia coli*. Перевагою використання їх є те, що вони запобігають порушенню структури реконструйованих білків. Так, було виявлено, що структура гетеродимерного трансмембранного домену інтегрину тромбоцитів $\alpha\text{Pb}\beta 3$, реконструйованого в міцели, не змінюється.

Мічення мембранних білків радіоактивними ізотопами здійснюють декількома способами. Найчастіше в культуральне середовище додають атоми ^{15}N (у складі амонійних солей) і ^{13}C (у складі глюкози) як джерела азоту й вуглецю. Ці мічені атоми включаються у поліпептидний ланцюг клітин, що ростуть. Також економічно вигідним є поживне середовище на базі лізату клітин водоростей.

Мічення великих мембранних білків атомами ^{13}C і ^{15}N приводить до втрати чутливостей спектроскопічних досліджень унаслідок релаксації дипольних $^1\text{H}-^1\text{H}$ і гетероядерних ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$ чи $^1\text{H}-^{15}\text{N}$). Тому такі білки частково або повністю мітять атомами дейтерію, оскільки вони мають нижче гіромагнітне відношення

порівняно з протоном, що дозволяє уникнути передчасної релаксації. Сьогодні для ЯМР-спектроскопії використовуються потрібні мічені білки (^2H - ^{13}C - ^{15}N). Як і для інших ізотопів, дейтерування проводять, якщо клітини ростуть у культурі, додаючи дейтерій до мінімального культурального середовища. Як джерело вуглецю додають ^2H -амінокислотні суміші із водоростей, що росли на дейтерованій воді або ^2H -глюкозі. Але зауважимо, що екстенсивне дейтерування може приводити до зміни структури й активності мембранних білків і є непридатним для великих білків. При цьому може відбуватися перекриття ЯМР-спектрів, оскільки: 1) збільшується час обертальної кореляції, що приводить до розширення спектра; 2) зменшується величина хімічного зсуву через присутність деяких амінокислотних залишків (Ile, Leu, Val) у трансмембранних ділянках; 3) має місце висока частота зустрічальності α -спіральных ділянок, що зменшує величину хімічного зсуву. Ці проблеми дозволяють подолати використанням селективних схем мічення.

При селективному міченні ізотопи вводять у певні сайти поліпептидного ланцюга мембранних білків. Потім отримують ЯМР-спектр окремих типів амінокислотних залишків (наприклад, Gly, Ala, Thr, Val, Ile, Asn, та Gln), що містяться в послідовності досліджуваного білка. Зазвичай у культуральне середовище вводять амінокислоти, мічені ^{15}N і/або ^{13}C , поряд з неміченими ($^{14}\text{N}/^{12}\text{C}$). Не всі 20 амінокислот можна мітити ізотопами, тому що мічення деяких (глутамату) спричинить розведення ізотопу та його переходу в інші амінокислоти, якщо попередньо мічена амінокислота є їхнім попередником. Цієї проблеми можна позбутися, використовуючи безклітинні системи експресії. Саме так була синтезована велика кількість мембранних білків та отримано їх ЯМР-спектри з високою роздільною здатністю.

Інший підхід мічення великих білків полягає у включенні до специфічних місць поліпептидного ланцюга мічених ізотопами неприродних амінокислот, таких як *p*-метоксифенілаланін (*p*-OMePhe), *o*-нітробензилтирозин (*o*NBTyr), 2-аміно-3-(4-(трифлуорометокси)феніл)пропанова кислота (OCF₃Phe), трифлуорометил-1-фенілаланін.

Ефективним є введення в білок атомів дейтерію, включаючи їх до складу метильних груп залишків амінокислот. Для цього до

дейтерованого культурального середовища додають протоновані попередники амінокислот ізолейцину (α -кетобутират), лейцину і валіну (α -кетозовалерат). Такі сполуки є комерційними препаратами, для них розроблені схеми мічення, і вони використовуються для методу TROSY ЯМР. Також застосовується і мічений ^{13}C аланін. Мічення метильних груп доцільно проводити саме для мембранних білків, тому що у складі їхніх трансмембранних доменів є велика кількість гідрофобних амінокислотних залишків і вони залучені до упакування цих доменів у мембранному бішарі.

За допомогою рідинного ЯМР здійснюють картування мембранної топології інтегральних білків, для чого застосовують водорозчинні ліпофільні парамагнітні зонди, які вводять у білки (Kim, 2009). Прикладами таких зондів є Gd-DOTA та Gd-DTPA, які складаються з високополярного хелату, що оточує парамагнітний іон гадолінію (III) на зразок пастки (рис. 1.34). Така структура збільшує розчинність зонда і запобігає його небажаним взаємодіям із залишками Асп і Глу всередині поліпептидного ланцюга.

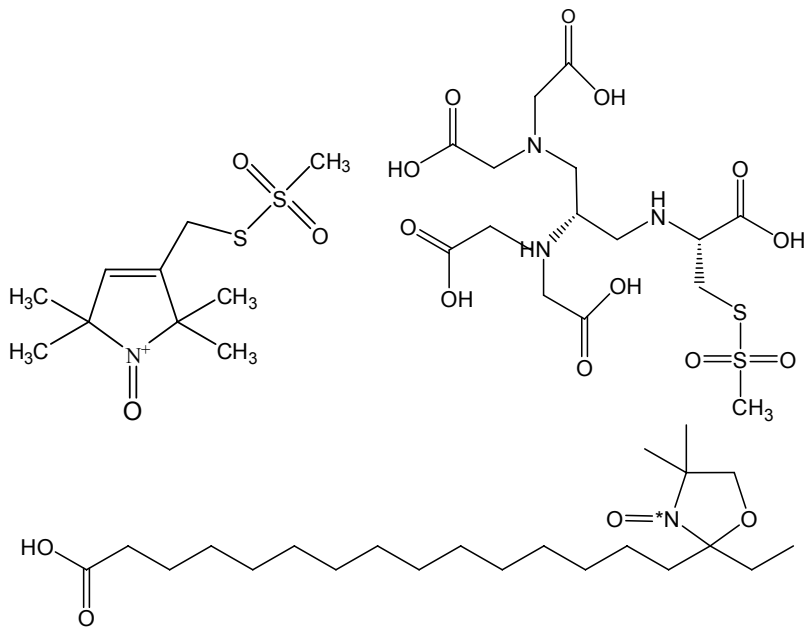


Рис. 1.34. Структура парамагнітних зондів на основі Gd-DOTA і Gd-DTPA, що використовуються для рідинного ЯМР

1.9. РЕНТГЕНІВСЬКА І НЕЙТРОННА СПЕКТРОСКОПІЯ

Високочутливими методами вивчення клітинної мембрани є розсіювання рентгенівських променів та нейтронів, оскільки за своєю структурою вона є рідинно-кристалічним об'єктом. Рентгенівські промені та нейтрони – ефективні засоби зондування мембран у режимі реального часу, оскільки вони уможливають аналіз деталей структури (просторові характеристики, зокрема тривимірну структуру) і динаміки (руху) на атомному рівні. Вони не руйнують структури мембрани, дозволяють проводити дослідження у заданих умовах, а також моделювати процеси функціонування мембран.

Рентгенівське випромінювання – це електромагнітне випромінювання, яке має енергію фотонів у діапазоні довжин хвиль у межах $10^{-5} \dots 10^{-2}$ нм (між ультрафіолетовим і гамма-випромінюванням). Воно виникає при гальмуванні швидких електронів у речовині та при переході електронів із зовнішніх електронних оболонок атома на внутрішні. Оскільки рентгенівські промені є електромагнітними хвилями, вони розсіюються зарядженими частками речовини. Фотони мають властивості як хвиль, так і часток, тому при пружному зіткненні їх із зарядженими частками вони випромінюються з тією ж частотою розсіяної хвилі, а при непружному ця частота зменшується. Хвильові властивості фотонів обумовлюють явища заломлення, відбиття, розсіювання, дифракції та поляризації рентгенівських променів.

Оскільки ці промені мають подвійні властивості (частинок і хвиль), їм притаманні два типи розсіювання – хвильове (релеївське, або когерентне) і комптонівське (некогерентне).

Когерентне розсіяне випромінювання використовують у рентгеноструктурному аналізі кристалічних речовин.

Нейтрони – елементарні частинки, які не мають електричного заряду і поряд із протонами входять до складу атомних ядер. Вони можуть випромінюватися при поділі ядер чи під час ядерних реакцій. Усі вільні нейтрони спочатку є швидкими нейтронами (енергія понад 0,1 MeV). Основна втрата енергії здійснюється на ядрах. При взаємодії нейтронів з ядрами відбувається

пружне розсіювання, непружне (коли швидкі й проміжні нейтрони сповільнюються) або поглинання їх речовиною. Під час пружного розсіювання нейтрони підлягають пружним зштовхуванням на ядрах атомів речовини-поглинача, при цьому нейтрони втрачають частину своєї першопочаткової енергії, відхиляються і розсіюються. Коли відбувається непружне розсіювання, проміжні нейтрони зіштовхуються з мішенню, яка набагато більша за них, вони не відштовхуються, а тимчасово поглинаються ядром-мішенню. Після цього нейтрон випускається зі зменшеною енергією, а збуджене ядро-мішень випромінює гамма-промені.

Можуть також відбуватися ядерні реакції різних типів, зокрема поділ ядра. Існують сполуки – сповільнювачі нейтронів, при взаємодії з якими відбувається пружне розсіювання. При зіткненні нейтронів з ядрами такої речовини-поглинача вони сповільнюються й енергія зменшується. Після багатьох зіткнень з ядрами нейтрони втрачають більшу частину енергії та стають проміжними (енергія в межах від 0,025 до 0,1 MeV) або тепловими (енергія менше 0,025 MeV). Після цього вони здійснюють теплові рухи всередині речовини, доки не будуть поглинені ядрами.

Сьогодні найефективнішим методом вивчення взаємного розташування атомів є дифракція мікрочасток (фотонів, електронів, нейтронів). Цими методами, (наприклад, структурної нейтронографії) було визначено структуру кристалів і різних молекул. *Дифракція* – це універсальне хвильове явище, яке спостерігається при проходженні хвиль чи потоків елементарних часток поблизу перешкод і проявляється в їхньому відхиленні від прямолінійного напрямку при взаємодії з перешкодами. Якщо розмір неоднорідностей середовища (перешкод) зіставний з довжиною хвилі, дифракція проявляє себе як ефект *розсіювання хвиль*. При дослідженні кристалів дифракційними методами їх опромінюють майже паралельним пучком часток, вивчають розподіл дифракції цих часток за різними напрямками, за отриманою дифракційною картиною судять про будову комірок кристалу. У цих методах використовуються такі частки: фотони з енергією 5–20 кеВ (рентгенівське і гамма-випромінювання), електрони з енергією 10–100 кеВ і нейтрони з 0,01–0,1 кеВ (теплові нейтрони). Хоча теорія дифракції для цих часток однакова, проте

фізична природа їхньої взаємодії з речовиною різна. Рентгенівські промені розсіюються електронними оболонками атомів, нейтрони – ядрами атомів, електрони – електричним потенціалом атомів. Тому ці частки використовуються у різних галузях структурної нейтронографії.

Дифракційний метод вивчення атомної чи магнітної структури кристалів, аморфних матеріалів і рідин за допомогою розсіювання нейтронів називається *нейтронографією*. Досліджуваний об'єкт опромінюється пучком нейтронів, які розсіюються на атомах речовини. Розсіювання реєструється нейтронним спектрометром, який вимірює інтенсивність розсіювання залежно від кута дифракції, аналогічні вимірювання проводяться рентгенівською дифрактометриєю. Інтерпретуючи отриманий дифракційний спектр, установлюють атомну структуру досліджуваного об'єкта. Оскільки нейтрони розсіюються на ядрах атомів, амплітуда їхнього розсіювання не залежить від порядкового номера хімічного елемента, на відміну від розсіювання електронів і рентгенівських променів. Це дозволяє визначити за допомогою нейтронографії положення атомів, розташованих один поряд з одним у таблиці Періодичної системи Менделєєва. Амплітуда розсіювання нейтронів не залежить від кута їхнього розсіювання, тому їх можна використовувати для вивчення атомної структури рідин і аморфних матеріалів. За дифракцією нейтронів отримують дані про атомну і магнітну структуру кристалів. Експерименти з розсіювання нейтронів, коли вони обмінюються енергією з досліджуваним об'єктом, дають інформацію про теплові коливання атомів у молекулах і кристалах. Пучки нейтронів отримують у ядерних реакторах. У безпосередній близькості до реактора міститься нейтронографічна апаратура (дифрактометри, нейтронні спектрометри). Енергія, що поглинається або втрачається нейтроном при взаємодії з кристалом, пов'язана з поглинанням або випроміненням фотонів. Вимірюючи енергію розсіюваних нейтронів, отримують інформацію щодо фотонного спектра.

Створення автоматичних нейтронних дифрактометрів, які керуються комп'ютером, і спеціальних комп'ютерних програм оброблення нейтронно-дифракційних даних дозволило застосувати нейтронографію для біологічних досліджень. Методи

рентгенівської та нейтронної спектроскопії ефективно використовуються нанобіотехнологією для вивчення структури наночастинок та їхніх ансамблів, макромолекул, прямого зондування каталітичної активності, вивчення динаміки фолдингу білків і складних полімерів тощо. Рентгенівські промені й нейтрони чутливі до структурних характеристик у межах від 10^{-3} нм до 10^3 нм і до динамічних властивостей з часовим масштабом від 10^{-18} с до 10^{-6} с для нейтронів. Вони легко генеруються з довжинами хвиль, які можна порівняти з атомними відстанями у твердих тілах і рідинах та з кінетичними енергіями, порівнянними з енергіями динамічних процесів у мембранах. Сучасні технології з використанням фокусувальної оптики і систем сповільнення дозволяють отримувати пучки цих часток. Це дає змогу визначити не тільки організацію атомів (структуру) з точністю до субнанометрів, а й відстежувати рух атомів або молекул (динаміка) у межах від аттосекунд (10^{-18} секунди) до багатьох секунд. Так учені змогли спостерігати за такими швидкими процесами, як перенесення електронів, та за такими повільними, як молекулярна дифузія.

За допомогою нейтронів і рентгенівських променів широко досліджуються штучні мембрани (везикули), які можуть бути використаними у нанобіотехнології як переносники ліків. Останніми роками почала розвиватися технологія *малокутового розсіювання* поблизу кута ковзання, яка дозволяє стежити за змінами структури у площині зразка за іншою координатою. Це дозволило досліджувати мембрани на нанорівні.

Методами розсіювання нейтронів на речовині отримано важливі дані щодо структури та властивостей біологічних мембран, зокрема визначено локалізацію в них води. За допомогою *малокутового розсіювання нейтронів* на поодиноких ліпосомах з використанням дейтерієвих міток вивчено параметри бішару з урахуванням проникнення води у гідрофільну частину мембран. Розраховано густину розсіювання бішару за допомогою сферичних оболонок, описано густину розсіювання двокомпонентного шару ліпід/сурфактант. З використанням мічених дейтерієм фрагментів ліпідного бішару проаналізовано порушення у цих бішарах і вивчено адсорбцію ними води. При вивченні природних і модельних ліпідних мембран (везикул) методом малокуто-

вого розсіювання нейтронів можна визначити такі їхні параметри, як розподіл за розмірами, розподіл розсіювальної густини вдовж товщі мембрани, ступінь проникнення розчинника в мембрану, параметри взаємодії мембран та везикул у розчинах, ступінь кластеризації мембран та везикул. Перевагою методу малокутового розсіювання є можливість визначення внутрішньої структури мембран шляхом варіації розсіювальної густини мембран на основі заміщення водень-дейтерій. Розсіювання рентгєнівських променів є обмеженим через слабку взаємодію з воднем, що приводить до слабого контрасту між компонентами в молекулах ліпідів мембран і розчинником. Роздільна здатність методу становить близько 1 нм, а точність визначення параметрів – менш ніж 1 нм.

Технологія *малокутового розсіювання і дифракції рентгєнівських променів* (англ., small-angle X-ray scattering and diffraction, SAXS) надає інформацію про очищені мембранні білки, при цьому досліджують тривимірні білкові кристали.

Виявилось, однак, що мембранні білки досить важко кристалізувати. При видаленні зі свого природного ліпідного оточення неполярні ділянки ліпідних молекул взаємодіють одна з одною, утворюючи агрегати – неупорядковані форми, які неможливо вивчати кристалографічним аналізом. Тому зусилля дослідників було спрямовано на створення нових методів кристалізації. Мембранні білки кристалізуються разом із детергентом і утворюють кристали двох типів. У кристалах першого типу, схожі на стоси мембран, неполярні ділянки латерально взаємодіють між собою, мембраноподібні шари зв'язують полярні ділянки білків. На жаль, такі кристали неможливо вивчати за допомогою дифракції з високою роздільною здатністю. У кристалах другого типу взаємодіють полярні ділянки білкових молекул, а невеликі амфіфільні сполуки й детергенти заповнюють проміжки між ними. При проведенні кристалізації важливо вірно обрати детергент з певним зарядом та розміром. Якщо ці параметри несприятливі, він може дестабілізувати кристалічну структуру білка.

Для уникнення проблем, які виникають під час кристалізації, мембранні білки перед проведенням цієї процедури включають у штучні мембрани – ліпідні бішари заданого складу, наприклад,

у так звані ліпідну кубічну фазу (англ., lipidic cubic phase), ліпідну губчасту фазу (англ., lipidic sponge phase), а також біцели. Така ліпідна фаза підтримує стабільність білкової молекули й тому сприяє ефективній кристалізації. Було успішно кристалізовано зв'язаний з G-білком A(2A) аденозиновий рецептор і мітохондріальний потенціалзалежний аніонний канал.

Метод малокутового розсіювання рентгенівських променів дозволяє прямо вивчати рідкокристалічну будову ліпідного бішару мембран і визначати їхні структурні параметри за різних умов, подібних до тих, що можуть виникати під час кристалізації (дані щодо кристалізації мембранних білків викладено в підрозд. 4.1). Цей метод ефективний для дослідження штучних мембран з метою встановлення їхньої придатності для включення в них мембранних білків, які будуть підлягати кристалізації (Joseph, 2011). Найчастіше використовуються мембраноміметичний мактрикс (lipidic cubic phase), який складається із природних ліпідів. За допомогою методу малокутового розсіювання рентгенівських променів вивчають такі параметри ліпідного бішару, як його товщина, кривизна (для виявлення оптимальних місць для включення білків), стабільність тощо. Це дозволяє встановити, чи може бути даний ліпідний матрикс використаний для кристалізації мембранних білків. Кристали білків, що отримують у ліпідній кубічній фазі, зазвичай дуже малі (мікрोकристали). Тому ширина пучка рентгенівських променів (10–20 мкм) має бути зіставна з розміром досліджуваного кристала (Cherezov, 2011).

Комбіновані методи розсіювання рентгенівських променів і нейтронів дозволяють ефективніше вивчати структуру мембранних білків і ліпідів. Було отримано дані про структурні параметри штучних ліпідних бішарів з фосфатидилхоліну і фосфатидилгліцеролу. Мембранні білки реконструюють у нанодиски, що містять фосfolіпіді, наприклад пальмітоолеїлфосфатидилгліцерол/1-пальмітоолеїл-2-олеїл-sn-гліцеро-3-фосфохолін (POPC/POPG) (див. підрозд. 5.3) і досліджують методом малокутового розсіювання, отримуючи інформацію щодо локалізації цих білків у нанодисках і про білково-ліпідні взаємодії. Таким чином було визначено розташування в нанодиску бактеріородопсину і підтверджено попередні теоретичні дані, отримані за допомогою комп'ютерного моделювання,

виходячи із кристалічної структури цього білка. Отже, методи малокутового розсіювання можуть бути використані для з'ясування найдрібніших елементів структури мембранних білків, які неможливо визначити іншими методами, котрі мають недостатню для цього роздільну здатність. Важливо, що, реконструюючи білки в нанодиски, можна провести визначення в оточенні, близькому до фізіологічного.

1.10. ДИФЕРЕНЦІЙНА СКАНУВАЛЬНА КАЛОРИМЕТРІЯ

Калориметрія включає в себе методи фізико-хімічного аналізу, які вимірюють теплоту хімічних реакцій, фазових переходів, а також теплоємність (теплоту, необхідну для зміни температури тіла). Теплоту визначають як функцію, що характеризує процес перерозподілу внутрішньої енергії у просторі; за відсутності теплоперенесення її неможливо виміряти.

Диференційна сканувальна калориметрія (ДСК) – ефективний експериментальний метод визначення термодинамічних властивостей біомакромолекул. Він дає змогу спостерігати за зміною структури та фазовими переходами білків, полінуклеотидів, ліпідних ансамблів та аналізувати перехідні стани, котрі виникають при плавленні біополімерів. На сьогодні метод зазнав значних удосконалень, розроблено програмне забезпечення для інтерпретації даних. Це відкрило нові можливості для вивчення впливу молекулярного оточення на структуру й поведінку білків, нуклеїнових кислот і ліпідів (Spink, 2008).

Метод диференційної сканувальної калориметрії дозволяє вивчати зміни структури клітинних мембран. Він базується на вимірюванні тепла, необхідного для нагрівання зразка (збільшення його температури) на дуже малу величину при безперервному підвищенні його температури. Теплоту визначають через тепловий потік – похідну теплоти за часом, вимірюється теплоємність тільки суспендованого матеріалу на тлі набагато більшої теплоємності розчину порівняння. Щоб визначити теплоту фа-

зового стану сполук, вимірюють власну теплоємність, тобто поглинання або виділення тепла, яке поглинається чи виділяється за відсутності фазових переходів. Тому цей калориметричний метод називають диференційним.

Теплові потоки визначаються за різницею температур у двох точках системи виміру в один момент часу. Виміри можна проводити як в ізотермічних умовах, так і в динамічному режимі, коли зміни температури нагрівача калориметра програмуються. Для цього використовуються сканувальні калориметри. Метод є найшвидшим способом визначення величини ізобарної теплоємності зразка в широкому діапазоні температур, тобто вимірює ендотермічні та екзотермічні переходи як функцію температури.

Диференційна сканувальна калориметрія (ДСК) використовується для вивчення рідких кристалів. При переході речовини із твердого стану в рідкий проміжним є рідкокристалічний стан, у якому вона виявляє властивості обох указаних станів і є анізотропною рідиною. За допомогою ДСК стало можливим спостерігати за мінімальними змінами енергії, які відбуваються при переході з рідкого стану в рідкокристалічний і з рідкокристалічного у твердий.

Метод диференційної сканувальної калориметрії дозволяє вимірювати зміни просторової структури біомолекул за теплом, яке вони виділяють чи поглинають. Ліпідний бішар біологічних мембран має в'язкість, близьку до в'язкості олії. Гідрофобна фаза, що являє собою жирнокислотні ланцюги мембранних ліпідів, замерзає при охолодженні мембран до температури нижче 10 °С, тобто твердіє, набуваючи властивості двовимірного кристалу. Фазові переходи із рідкого у твердий стан у мембранах із синтетичних фосфоліпідів відбуваються за більш високих температур, причому це залежить від хімічного складу фосфоліпідів.

Виявилось, що при змінах фазового стану ліпідів мембран виділяється або поглинається тепло, причому чим більше воно поглинається, тим значніші зміни структури бішару мають місце. Нагріваючи зразок мембрани, вимірюють його температуру під час його охолодження. Плавне зниження температури свідчить про відсутність фазових переходів ліпідів, якщо вона різко змінюється, це вказує на точку фазового переходу. За допомо-

гою калориметра записують криву теплоємності, тобто залежність теплоємності ліпідів мембран у суспензії від температури (рис. 1.35). Форма отриманих кривих надає інформацію щодо фазових переходів мембранних ліпідів та їхнього плавлення за різних умов. Параметрами кривої диференційної сканувальної калориметрії є температура фазового переходу ("плавлення"), температурний інтервал ("ширина") фазового переходу, загальна кількість тепла Q , що поглинається при плавленні (являє собою площу кривої й записується як $C = f(T)$). Важливим параметром є критична температура фазового переходу ($T_{кр}$), що характеризує стан ліпідів мембранних бішарів. Величина $T_{кр}$ залежить від довжини жирнокислотних ланцюгів ліпідів, зростання чи збільшення кількості атомів вуглецю.

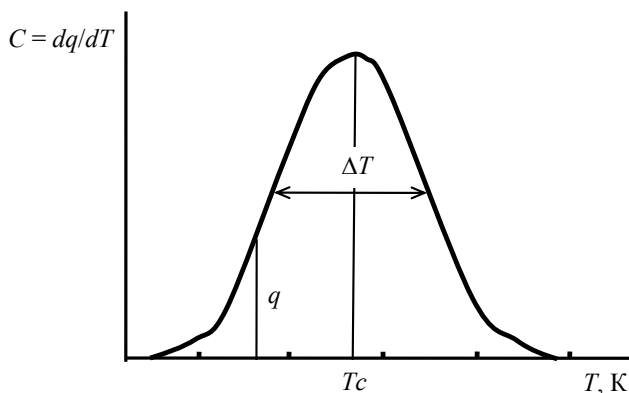


Рис. 1.35. Характеристика фазових переходів у ліпідах за даними диференційної сканувальної калориметрії. C – теплоємність, T – півширина фазового переходу, T_c – температура плавлення

За отриманими даними будують криву плавлення ліпідів, яка являє собою залежність частки рідкої фази в загальній кількості ліпідів мембран. За цією кривою можна визначити кількість рідких ліпідів у мембрані:

$$\alpha = \frac{m_1}{m_1 + m_s}$$

де m_1 – кількість ліпідів у рідкій фазі, m_s – кількість їх у твердій фазі.

За допомогою методу ДСК досліджують не тільки природні мембрани, а й штучні (наприклад, міцели та ліпосоми). Проте холестерол, який у великій кількості міститься в біомембранах, не дозволяє правильно вимірювати кількість вивільненого тепла, оскільки заважає фазовим переходам мембранних ліпідів.

Метод ДСК набув практичного застосування для вивчення транспорту протиракових препаратів гідрофобної природи у складі ліпідних везикул із диміристоїлфосфатидилхоліну. Оскільки форма калориметричних кривих залежить від фізико-хімічних властивостей препаратів, цей метод дозволяє передбачити взаємодію між хемотерапевтичними агентами та біологічними мембранами (Sarpietro, 2013).

Технологія диференційної сканувальної калориметрії використовується для вивчення взаємодії фармакологічних препаратів з мембранами. На модельних біліпідних мембранах показано, що ширина термограм, що відображають фазові переходи бішару, змінюється при інкорпорації препаратів у нього. Вивчення ліпідних бішарів шляхом вимірювання термодинамічних параметрів ліпідних бішарів дає змогу оцінити термічну поведінку ліпідних систем доставки препаратів у клітини, зокрема ліпосом.

1.11. КОЛОВИЙ ДИХРОЇЗМ

Явище колового (циркулярного) дихроїзму (КД) базується на залежності коефіцієнта поглинання світла від напрямку колової поляризації. Він був відкритий Еме Коттоном (A. Cotton) у 1911 р., тому в літературі може мати назву ефекту Коттона. КД характерний для оптично активних молекул, здатних повертати площину поляризованого світла. Цю площину можна розкласти на праву й ліву циркулярно поляризовані компоненти. Вони поглинаються зразком різною мірою за будь-якої довжини хвилі, тому зразок має різний коефіцієнт заломлення для двох компонент практично на всіх довжинах хвиль. Наслідком цього є фазовий зсув між двома компонентами, пропорційний різниці показників заломлення. Отже, дві циркулярно поляризовані компоненти розповсюджуються у середовищі з різною швидкістю і по-різному по-

глинаються речовиною. Світло, що проходить крізь них, називається еліптично поляризованим, а речовині властивий КД. При з'єднанні цих двох компонент фазовий зсув приводить до постійного обертання довгої осі еліптичної поляризації світла.

Оптично активні зразки мають різні коефіцієнти молярної екстинкції для ліво- (ϵ_L) та правообертального (ϵ_R) поляризованого світла. Кількісна міра КД – різниця між коефіцієнтом поглинання зразком право- та лівополяризованого по колу світла на одиницю його шляху в середовищі та одиницю концентрації оптично активної компоненти. Її виражають формулою $[\theta] = 4500/\pi (\epsilon_L - \epsilon_R)$, де коефіцієнти молярної екстинкції для ліво- та правообертального циркулярно поляризованого світла. Різницю $\epsilon_L - \epsilon_R$ виражають як $\Delta\epsilon$. Залежність $\Delta\epsilon$ від довжини хвилі являє собою КД-спектр. Його вимірюють за допомогою спеціального спектрофотометра, який називається КД-спектрополяриметром. Як джерело світла використовують ксенонову лампу, це дозволяє проводити вимірювання як в ультрафіолетовому, так і у видимому діапазонах (180–800 нм). КД-спектри аналізують за допомогою пакетів комп'ютерних програм, завдяки чому можна визначати їхню вторинну структуру. Наприклад, в Інституті білка РАН було створено пакет програм STRUCTURE, також працюють із програмою CDPго, розробленою у США.

Метод КД застосовується для вивчення структури мембранних білків, зокрема виявлення того, який тип їхньої просторової структури переважає в мембранах. Вторинна структура білка може бути визначена КД-спектроскопією у "дальньому ультрафіолетовому" спектральному діапазоні (190–250 нм). За цих довжин хвиль хромофорами є пептидні зв'язки, причому сигнал виникає, коли вони знаходяться у регулярній просторово впорядкованій структурі. α -Спіральні, β -складчасті та неупорядковані ділянки білка характеризуються певною формою та величиною КД-спектра. Наприклад, α -спіраль дає позитивну смугу при 190 нм і негативні смуги при 222 та 208 нм, β -складка – позитивну смугу при 195 нм і негативні смуги при 217 та 180 нм, неупорядкована форма – позитивну смугу при 195 нм і негативну смугу при 195 нм. Як і всі спектроскопічні технології, КД-сигнал відображає середнє значення навколишньої молекулярної попу-

ляції. Проте зауважимо: якщо методом КД можна визначити, що білок містить 50% α -спіралей, то виявити специфічні амінокислотні залишки, залучені у формування таких структур, цим методом не можна. Тому КД-спектр використовується як емпіричне правило, подібно до інфрачервоної спектроскопії.

КД-спектри білків у "ближній ультрафіолетовій" ділянці спектра (250–350 нм) дозволяє аналізувати деякі особливості третинної структури (рис. 1.36).

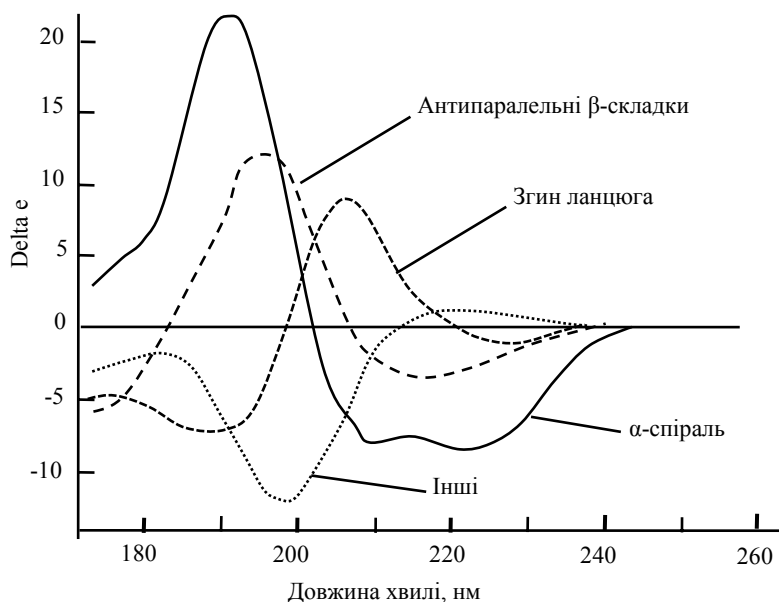


Рис. 1.36. КД-спектри α -спіральних, β -складчастих та непорядкованих ділянок у молекулі білка

За цих довжин хвиль хромофорами є ароматичні амінокислоти та дисульфідні зв'язки. КД-сигнал, який вони продукують, чутливий до загальної третинної структури білка. Сигнали в ділянці 250–270 нм належать залишкам фенілаланіну, у ділянці 270–290 нм – тирозину, 280–300 нм – триптофану. Дисульфідні зв'язки зумовлюють багато слабких сигналів у "ближній ультрафіолетовій" зоні спектра. Якщо білок зберігає вторинну структуру, але не має визначеної тривимірної структури (наприклад,

зазнав некоректного холдингу або має структуру типу "розплавленої глобули"), КД-сигнал становитиме близько нуля. З іншого боку, присутність значних сигналів у "ближній ультрафіолетовій" зоні свідчить про те, що білок у результаті холдингу набув чітко визначеної структури. Такий КД-спектр чутливий навіть до малих змін третинної структури завдяки білок-білковим взаємодіям та змінам у розчинниках.

Усі переховані властивості зумовлюють використання КД-спектроскопії для аналізу структури мембранних білків. Але інтерпретація КД-спектрів ускладнюється тим, що суспензії мембран є негомогенними, і тому отримані спектральні криві мають згладжену форму. Аналізуючи частину α -спіральних ділянок у молекулах мембранних білків, можна отримати інформацію про вплив на них зовнішніх факторів, якщо вони впливають на спіралізацію цих білків. Це може мати місце, наприклад, при власних змінах конформації молекул білків чи змінах при взаємодії молекул білків одна з одною.

Розроблено цілий ряд лінійних і нелінійних алгоритмів аналізу КД-спектрів мембранних білків, при цьому використовуються бази даних, отриманих для розчинних білків (Wallace, 2003). З допомогою програми CDPPro було проаналізовано КД-спектри 13 розчинних білків з відомою кристалічною структурою і показано подібну до мембранних білків закономірність розташування в них елементів вторинної структури. Методом КД у поєднанні з методами молекулярної динаміки досліджено роль трансмембранних доменів білків у їхньому заякорюванні в ліпідних бішарах ЕПР та апарату Гольджі. Для білка-продукту гена *fukutin*, залученого у процесі O-глікозилювання α -дистроглікану, встановлено, що стабільність α -спіральної конформації такого домену залежить від товщини бішару.

Контрольні запитання

1. Які мембранні структури можна спостерігати за допомогою електронної мікроскопії?
2. Які переваги має динамічна фазова мікроскопія перед традиційними мікроскопічними методами?

3. Наведіть приклади застосування растрового методу динамічних процесів.
4. Охарактеризуйте принцип методу лазерної сканувальної конфокальної мікроскопії.
5. Які біологічні процеси вивчають за допомогою лазерної сканувальної конфокальної мікроскопії з використанням дисків Ніпкова.
6. Для чого застосовують SERRS-біосенсори?
7. Охарактеризуйте вивчення мембранних білків за допомогою методу атомно-силової мікроскопії.
8. Які переваги мають флуоресцентні зонди для вивчення біологічних мембран?
9. За допомогою яких флуоресцентних зондів вивчають мікрров'язкість мембран?
10. Охарактеризуйте флуоресцентні зонди – аналоги флуоресцеїну.
11. Які флуоресцентні зонди застосовують для вивчення сигнальних систем клітини?
12. За допомогою яких флуоресцентних зондів визначають концентрацію внутрішньоклітинного кальцію?
13. Наведіть принцип методу AlphaScreen.
14. На чому базується метод FRET?
15. З якою метою в методі FRET застосовують флуоресцентні білки?
16. Які переваги технології HTRF перед методом FRET?
17. Наведіть схему визначення активності протеїназ методом HTRF.
18. Які донори й акцептори використовують у методі LANCE?
19. Чому стало можливим вивчати мембранні білки методом ЯМР-спектроскопії?
20. Охарактеризуйте напрямки вивчення мембранних білків методами малокутового розсіювання і дифракції рентгєнівських променів.
21. Яким чином диференційна сканувальна калориметрія надає інформацію щодо просторової структури клітинних мембран?

Список літератури

Heyduk T. Measuring protein conformational changes by FRET/LRET / T. Heyduk // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 13, № 4. – P. 292–296.

Ikawa T. Molecular scale imaging of F-actin assemblies immobilized on a photopolymer / T. Ikawa, F. Hoshino, O. Watanabe // *Phys. Rev. Lett.* – 2007. – Vol. 98. – P. 18101–18110.

Liu T. H. Measurement of membrane rigidity on trapped unilamellar phospholipid vesicles by using differential confocal microscopy / T. H. Liu, J. L. Xiao, C. H. Lee // *Appl. Opt.* – 2011. – Vol. 50, № 19. – P. 3311–3315.

Mavromoustakos T. M. The use of differential scanning calorimetry to study drug-membrane interactions / T. M. Mavromoustakos // *Methods Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 400. – P. 587–600.

McHaourab H. S. Toward the fourth dimension of membrane protein structure: insight into dynamics from spin-labeling EPR spectroscopy / H. S. McHaourab, P. R. Steed, K. Kazmier // *Structure.* – 2011. – Vol. 19, №. 11. – P. 1549–1561.

McIntosh L. P. Biosynthetic incorporation of ^{15}N and ^{13}C for assignment and interpretation of nuclear magnetic resonance spectra of proteins / L.P. McIntosh, F.W. Dahlquist // *Q. Rev. Biophys.* – 1990. – Vol. 23. – P. 1–38.

Prosser R. S. Current applications of bicelles in NMR studies of membrane-associated amphiphiles and proteins / R.S. Prosser, F. Evanics, J. L. Kitevski // *Biochemistry.* – 2006. – Vol. 45, № 28. – P. 8453–8465.

Shahin V. Providing unique insight into cell biology via atomic force microscopy / V. Shahin, N. P. Barrera // – *Int. Rev. Cytol.* – 2008. – Vol. 265. – P. 227–252.

Розділ 2

МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАН КЛІТИННИХ ОРГАНЕЛ

2.1. ВИДІЛЕННЯ КЛІТИННИХ ОРГАНЕЛ

Еукаріотичні клітини мають різні типи мембранних органел, які виконують специфічні функції. Для проведення біохімічного аналізу структури та функцій необхідно отримати високоочищені зразки. З цією метою було розроблено цілий ряд методів виділення субклітинних фракцій, найпоширенішим із яких є метод диференційного центрифугування. Першим етапом виділення субклітинних органел є гомогенізація клітин, яка дозволяє зруйнувати клітинну мембрану (і клітинну стінку, якщо така присутня). Метод включає:

- 1) даунс-гомонізацію – клітини руйнуються між двома твердими поверхнями, що обертаються;
- 2) фільтрацію – клітини вимушено проникають крізь пори дрібнішого розміру у фільтрі;
- 3) подрібнення – клітини руйнуються під час їхнього обертання разом зі скляними гранулами;
- 4) обробку ультразвуком (sonication) – клітини руйнуються внаслідок дії ультразвукових вібрацій;
- 5) солюбілізацію – клітинні мембрани руйнуються детергентами, зокрема тритоном X-100.

Для видалення складових клітинної стінки застосовується метод ферментативного розщеплення.

Вибір методу гомогенізації визначається типом тканини та специфічною метою експерименту. Зазвичай під час гомогенізації до буферного розчину додають ізотонічний розчин сахарози для запобігання розриву мембран органел унаслідок осмотичного шоку. Для видалення непошкоджених клітин та їхніх великих уламків гомогенат центрифугують за низьких швидкостей. Після гомогенізації проводять субклітинне фракціонування.

Диференційне центрифугування є одним із найпоширеніших методів розділення клітинних органел (Padh, 1992). Оскільки органели клітини мають різні розміри й вагу, під час центрифугування вони осідають з різними швидкостями. Це дозволяє вибірково осаджувати структурні елементи клітин без порушення їхньої структури й без втрати біологічних властивостей. За допомогою методу диференційного центрифугування у градієнті густини (наприклад, сахарози) можна отримати ядра, мітохондрії, мікросоми та плазматичні мембрани. У процесі ультрацентрифугування гомогенатів клітин і тканин фрагменти мембран рухаються за дії відцентрової сили й розподіляються вздовж центрифужної пробірки. Седиментація субклітинних частинок під час центрифугування залежить від їхнього розміру, густини і форми. Модифікацією методу диференційного центрифугування є зональне центрифугування за розміром. Після одноразового центрифугування органел розташовуються в центрифужній пробірці у смугах відповідно до їхнього коефіцієнта седиментації. Схему диференційного центрифугування показано на рис. 2.1.

Другим широко розповсюдженим методом отримання клітинних органел є рівноважне центрифугування у градієнті густини (Генніс, 1996). При цьому субклітинні частинки нашаровуються на градієнт густини і проводять центрифугування на високій швидкості. Речовина, що використовується для приготування градієнта, має бути легко розчинною у воді, фізіологічно нешкідливою та хімічно інертною; її розчин – нев'язким, прозорим у видимій ділянці спектра, вона також повинна створювати низький осмотичний тиск (Еванз, 1990). Більшість цих вимог задовольняє сахароза. Зазвичай градієнт густини формують, на-

шарувуючи у центрифужну пробірку концентрації сахарози, які збільшуються. Можуть бути використані також інші розчини, зокрема колоїдний розчин Percoll і хлорид цезію. При центрифугуванні органели осаджуються, коли вони досягають ділянки градієнта, що має еквівалентну їм густину. Цю процедуру також називають ізопікнічним рівноважним центрифугуванням.

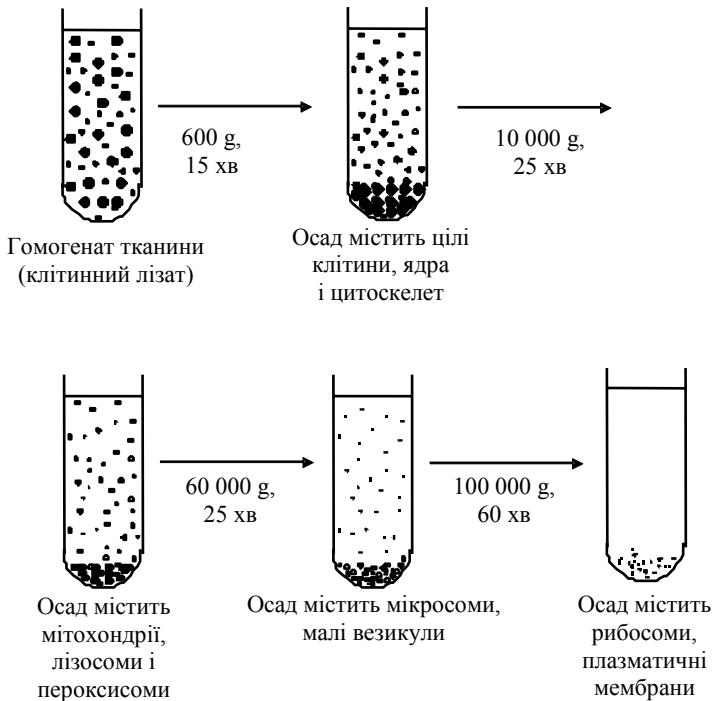


Рис. 2.1. Методика диференційного ультрацентрифування

Для розділення субклітинних компонентів варіюють швидкість і час центрифугування. Це дозволяє отримати три фракції: ядерну, мітохондріальну та мікросомальну, які містять відповідно великі, середні та найменші за розміром органели. Потім фракцію цих органел нашаровують на градієнт густини й центрифугують відповідно до густини та швидкості їхньої седиментації протягом різних проміжків часу. Отже, основні компоненти клітини осаджують у наступній послідовності: цілі клі-

тини та їхні фрагменти, ядра, мітохондрії, лізосоми, мікротільця, мікросоми (переважно фрагменти гладенького та шорсткого ендоплазматичного ретикулума, плазматична мембрана тощо), окремі компоненти мембранних структур. Порядок може відрізнятися залежно від типу клітин.

При використанні лише одного методу центрифугування отримати високоочищені органели не вдається, тому на практиці використовують обидва методи (диференційне центрифугування та центрифугування у градієнті густини). Кожен із цих методів для отримання органел, вільних від контамінації, потребує проведення додаткових процедур. Наприклад, при розробці методу отримання лізосом було виявлено, що навіть після ретельного очищення препарат забруднений мітохондріями. Повного очищення вдалося досягти, додаючи до суспензії клітин тритон WR-1339, який має дуже низьку густину й переважно акумулюється в лізосомах. Зниження щільності лізосом дозволяє їм легше відокремлюватись від мітохондрій під час центрифугування у градієнті густини.

2.2. МАРКЕРНІ ФЕРМЕНТИ МЕМБРАН

При виділенні будь яких мембранних органел необхідно проводити тест на присутність у препараті інших органел. Зазвичай це оцінюють за активністю ферментів, які містяться виключно в мембрані даної органели (Padh, 1992, Остапченко, 2006). Кожна біомембрана, залежно від свого функціонального призначення, має характерний набір ферментів, які називаються *векторними*, або *маркерними*. Такі мембранозв'язані ферменти специфічні для даного виду мембран, вони стабільні й мають високу активність, яку можна легко виміряти. До маркерних ферментів належать, наприклад, аденілатциклаза, 5'-нуклеотидаза, Na^+ , K^+ -АТФаза та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза (маркери плазматичних мембран), Ca^{2+} -АТФаза (маркер саркоплазматичного ретикулума), H^+ -АТФаза, цитохромоксидаза, сукцинатдегідрогеназа, НАДН-дегідрогеназа (внутрішній маркер мітохондріа-

льної мембрани), кисла фосфатаза (маркер лізосом) (Кравцов, 1990). Тепер маркерами лізосом вважають специфічні мембранні глікопротеїди LAMP1 и LAMP2, які містяться на мембрані лізосом і пізніх ендосом, та відсутні в мембранах інших органел. Дані про субклітинну локалізацію стандартних маркерних ферментів наведено в табл. 2.1.

Ці ферменти є векторними, оскільки взаємодіють із субстратом на одній поверхні мембрани, а виділяють продукт на іншій, тобто надають мембранній організації векторний характер. Переважно вони є інтегральними білками, міцно зв'язаними з мембраною. Важливим критерієм маркерних ферментів є їхня нездатність підлягати активації чи інгібуванню при виділенні окремих мембранних фракцій, а також те, що вони є тільки в мембрані даного типу.

При дослідженні різних субклітинних фракцій вимірюють активність багатьох маркерних ферментів і будують таблицю розподілу їхніх активностей (Еванз, 1990). Вона дозволяє оцінити ступінь збагачення цими маркерами виділених фракцій та ступінь забруднення їх іншими клітинними компонентами, а отже, і чистоту даного мембранного препарату. Присутність небажаної ферментативної активності у препараті свідчить про забруднення отриманої фракції органел. Чим більша активність маркерного ферменту у виділеній мембранній фракції порівняно з такою у вихідному гомогенаті тканини, тим вищий ступінь збагачення мембранного препарату порівняно з цим гомогенатом, і тим більш очищеним є отриманий препарат.

Недоліком описаного методу є те, що більшість маркерних ферментів втрачає активність при виділенні та тривалому зберіганні. Крім того, у більшості мембранозв'язаних ферментів активний центр розміщений на мембрані асиметрично. Тому в замкнених фрагментах мембран не вдається визначити активність маркерних ферментів унаслідок недосяжності для субстрату. Таке явище називають "латентною активністю ферменту". Її можна виявити при додаванні низьких концентрацій детергенту або іонофорів, що утворюють канали в замкнених мембранних везикулах.

Маркерні ферменти клітинних мембран (Еванз, 1990)

Фракція		Маркерний фермент	Номер за КФ
Плазматична мембрана	Базолатеральна	Аденілатциклаза	4.6.1
	Апікальна	Na ⁺ , K ⁺ -АТФаза 5'-Нуклеотидаза Лейцинамінопептидаза Глутамілтранспептидаза	3.6.1.37 3.1.3.5 3.4.11.1 2.3.2.12
Ендоплазматичний ретикулум		Глюкозо-6-фосфатаза NADPH-цитохром с-редуктаза Ca ²⁺ -АТФаза	3.1.3.9 1.6.2.4
Апарат Гольджі	Трансділянка і середня ділянка	Галактозилтрансфераза Сіалілтрансфераза NADPH-фосфатаза	2.4.1.38 2.4.99.1 3.6.1.22
	Внутрішня мембрана	Сукцинатдегідрогеназа Цитохромоксидаза Ротеноннечутлива NADPH-цитохром с-редуктаза	1.3.99.1 1.9.3.1 1.6.99.1
Мітохондрії	Зовнішня мембрана	Моноамінооксидаза	1.4.3.4
		Кисла фосфатаза β-Глюкуронідаза Арилсульфатаза	3.1.3.2 3.2.1.31 3.1.6.1
Лізосоми		Каталаза Карнітинпальмітоїлтрансфераза	1.11.1.6 2.3.1.21
Пероксисоми		Лактатдегідрогеназа	1.1.1.22
Цитозоль			

За допомогою визначення активності маркерних ферментів було охарактеризовано основні мембранні клітинні органели. Щоб контроль чистоти мембранного препарату був ефективним, проводять визначення активності не менше трьох маркерних ферментів, властивих даній мембрані (Рыбальченко, 1988). Наприклад, для плазматичної мембрани реєструють активність Na^+, K^+ - і $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаз та 5'-нуклеотидази. Проте недоліком цього методу є те, що деякі ферменти можуть міститися в декількох типах мембран, що характерно для 5'-нуклеотидази, активність якої можна виявити також в ендоплазматичному ретикулумі й апараті Гольджі. Хоча активність маркерних ферментів і дозволяє з високою точністю судити про ступінь очищення мембранного препарату, для оцінки чистоти й морфології виділеної мембрани необхідно також проводити електронну мікроскопію.

Активність маркерних ферментів вимірюють якнайшвидше після виділення мембранної фракції, при цьому препарат не заморожують і зберігають за температури 4 °С.

Одними із найбільш вивчених маркерних ферментів біологічних мембран є транспортні АТФази (аденозинтрифосфатази). Вони належать до класу гідролаз і каталізують реакцію гідролізу АТФ з вивільненням енергії, яка використовується для транспорту іонів крізь біологічні мембрани. Такі АТФази ще називають іонними насосами. Вони являють собою інтегральні мембранні білки, які легко змінюють свою конформацію у результаті зв'язування АТФ. Енергія цієї сполуки використовується на перехід ферменту в конформацію, у якій він має низьку спорідненість до іонів, зв'язаних в іонних центрах. При цьому іони вивільнюються, а АТФаза повертається у вихідну конформацію.

Усі АТФази поділяють на Р-, V- і F-типи. При роботі АТФаз Р-типу (фосфорильовані АТФази) залишок фосфорної кислоти переноситься з АТФ на залишок аспарагіну у складі активного центру ферменту. До АТФаз Р-типу належать, наприклад, Ca^{2+} -АТФаза, Na^+, K^+ -АТФаза плазматичної мембрани, а також Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматичного ретикулума. Ці ферменти інгібуються ванадатом, який заміщає фосфат в активному центрі ферменту. Активність Na^+, K^+ -АТФази пригнічується також серцевими глікозидами оубаїном і строфантинном, а Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматичного ретикулума – тапсиграїном.

АТФази V-типу (вакуолярні) схожі за будовою з АТФазами F-типу, але відрізняються субодиничною будовою, локалізацією та чутливістю до інгібіторів. Вони є в лізосомах, ендосомах, а також вакуолях і тонопластах рослин. Ці ферменти здійснюють перенесення протонів, а також беруть участь у транспорті аніонів та амінокислот. Під час роботи цих ферментів не утворюється ні проміжний фосфофермент, ні ковалентно зв'язаний продукт. До цього типу належать електрогенні протонні насоси тонопласта – H^+ -АТФаза і H^+ -пірофосфатаза (H^+ -РРаза). Інгібіторами АТФаз V-типу є дициклогексилкарбодіімід, нітрати та ціанід калію.

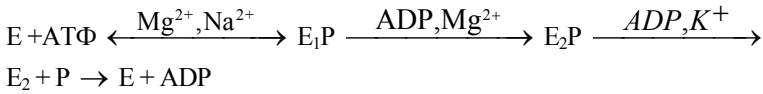
АТФази F-типу (F_0+F_1)-АТРази містяться у мембранах мітохондрій, хлоропластів, а також у бактеріальних мембранах. До них належить протонна АТФаза внутрішньої мембрани мітохондрій, яка являє собою складний ліпопротеїдний комплекс. Вона складається із гідрофільного сектора F_1 (має складну будову й каталізує гідроліз АТФ) і мембранного гідрофобного сектора F_0 (здійснює транспорт іонів крізь мембрану). Ці АТФази інгібуються дициклогексилкарбодіімідом та олігоміцином. АТФази F-типу, на відміну від АТФаз Р- і V- типів, не використовують АТФ, а здійснюють його синтез.

2.2.1. Na^+,K^+ -АТФаза плазматичних мембран

Na^+,K^+ -АТФаза, АТФаза фосфогідролаза (К.Ф. 3.6.1.3), є маркерним ферментом плазматичних мембран і виконує функцію Na^+,K^+ -насоса. Вона здійснює електрогенний антипорт іонів Na^+ і K^+ проти електрохімічного градієнта (три іони Na^+ виводяться із клітини, а всередину її надходять два іони K^+) за рахунок енергії гідролізу АТФ (Курський, 1993). Існування такого градієнта необхідно для осморегуляції, пов'язаного з натрієм транспорту органічних і неорганічних сполук, а також для функціонування електротрзбудливих мембран нервових та м'язових клітин.



Гідроліз АТФ цієї ферментною системою відбувається за схемою:



Активация ферменту проходить у присутності іонів Na^{+} та Mg^{2+} на внутрішній поверхні плазматичної мембрани, що викликає фосфорилування ферменту за рахунок кінцевої γ -фосфатної групи АТФ з утворенням проміжного комплексу EP (Takeuchi, 2009). Ця стадія інгібується іонами Ca^{2+} і не пригнічується оубаїном. Утворений фосфорильований продукт EP підлягає розпаду, що стимулюється іонами K^{+} на зовнішній поверхні мембрани. Разом із цим натрій вивільняється у позаклітинне середовище, а калій надходить усередину клітини. Ця стадія калійзалежного гідролізу ферменту інгібується серцевим глікозидом оубаїном. При гідролізі фосфорильованого комплексу вивільняється енергія, необхідна для транслокації K^{+} крізь мембрану в цитоплазму. Вважається, що фосфорильований фермент може перебувати у двох конформаційних станах: $E_1\text{P}$ та $E_2\text{P}$, рівновага між яким контролюється іонами Mg^{2+} , причому перша форма має більшу спорідненість з ADP, а друга – з K^{+} . Докладно вивчено кінетику взаємодії $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -АТФази з її субстратом АТФ, а також вплив на неї різних лігандів.

$\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -АТФаза має молекулярну масу 100 кДа і складається із трьох субодиниць – α , β і γ . Цей фермент за структурою є членом родини так званих FXYD білків (рис. 2.2) (Jorgensen, 2003). Існують чотири ізоформи α -субодиниці ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ і 4) і три ізоформи β -субодиниці ($\beta 1$, $\beta 2$ і $\beta 3$), які зумовлюють різноманітність функцій $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -АТФази. Кожна із них кодується окремим геном. Припускають, що молекула ферменту завжди асоційована з одним білком родини FXYD, проте остаточних даних не існує. α -Субодиниця необхідна для каталітичної функції ферменту, β -субодиниця також важлива для прояву ферментативної активності, а також відповідає за формування просторової структури ферменту і його вбудовування у плазматичну мембрану. Білки родини FXYD модулюють ферментативну активність $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -АТФази, збільшуючи або знижуючи її, що залежить від

типу тканини. Наприклад, мембранні білки фосфоламбан, сарколіпін, фосфолеман взаємодіють з молекулою ферменту, зменшуючи її спорідненість до іонів Na^+ і K^+ .

Велика α -субодиниця являє собою ліпопротеїн (100 кДа) і пронизує мембрану 10 разів, при цьому формуються гідрофільні петлі, спрямовані в цитоплазму (рис. 2.2). Вона містить центри зв'язування іонів Na^+ і K^+ та активний центр, який фосфорилується при транслокації іонів. Центр зв'язування оубаїну розташований на α -субодиниці на зовнішній поверхні мембрани. Мала β -субодиниця глікозилітована (маса коливається в межах 45–55 кДа) і пронизує ліпідний бішар лише один раз, причому N-кінець орієнтований у цитоплазму. Обидва поліпептиди утворюють компактну глобулу. α -Субодиниця кодується багатьма генами, у результаті альтернативного сплайсингу транскриптів утворюються різні ізоформи ферменту.

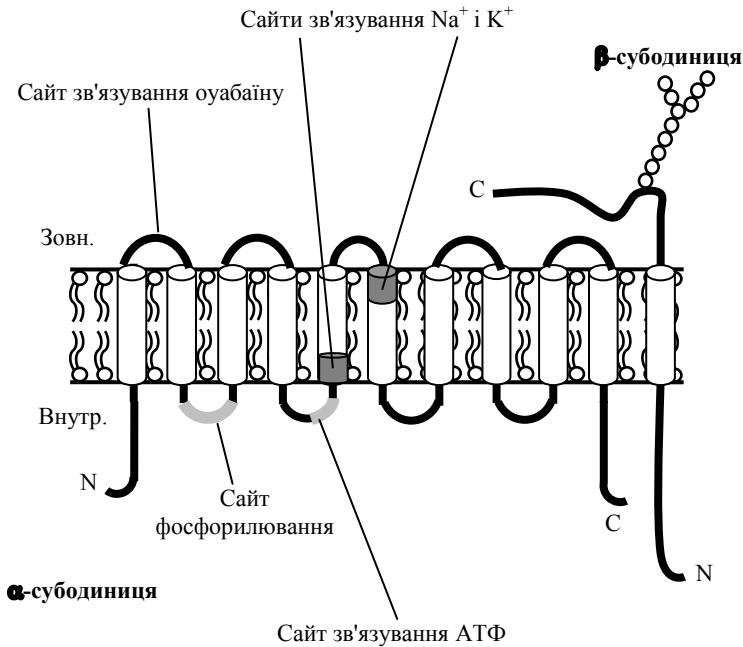


Рис. 2.2. Модель структури Na^+, K^+ -АТФази з урахуванням мембранної топології (Clausen, 2003)

Показано, що спорідненість оубаїнзв'язувального центру Na^+, K^+ -АТФази до серцевих глікозидів регулюється тими самими лігандами, які алостерично модифікують конформацію α -субодиниці. Виявлено, що дві групи лігандів сприяють зв'язуванню оубаїну з рецепторним центром ферменту: 1) $\text{Na}^+, \text{Mg}^{2+}$ і АТФ; 2) Mg^{2+} і P_n . Оскільки обидві групи "індукують" конформаційний стан ферменту E_2P , було зроблено висновок, що саме з цією конформацією найлегше зв'язуються серцеві глікозиди. Також було показано, що оубаїн зменшує спорідненість іонів калію з ферментом і не впливає на константу дисоціації для Na^+ . У присутності АТФ і Mg^{2+} натрій підвищує, а калій знижує швидкість взаємодії оубаїну з АТФазою. Вважається, що Na^+, K^+ -АТФазна система взаємодіє з оубаїном, якщо рецептор розташований на зовнішній поверхні мембрани. Строфантин, що є, як і інші серцеві глікозиди, специфічним інгібітором натрій-калієвого насоса, діє тільки ззовні мембрани.

Функцією Na^+, K^+ -АТФази є генерація трансмембранного електричного градієнта і підтримка потенціалу спокою, що є важливим для функціонування електрозбудливих тканин, зокрема скелетних м'язів та мозку. Утворений градієнт концентрації іонів Na^+ забезпечує перебіг багатьох транспортних процесів за механізмом ко-транспорту, зокрема Na^+ /глюкозний ко-транспортер, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінник. Також він необхідний для транспорту амінокислот і вітамінів у клітини. Градієнт іонів Na^+ , утворений Na^+, K^+ -АТФазою, забезпечує також реадсорбцію цих іонів і води у клубочковій зоні нефронів та адсорбцію рідини із легень і кишечника. Na^+, K^+ -АТФаза також бере участь у клітинній осморегуляції.

Показано, що низькі дози оубаїну, нездатні інгібувати фермент і приводити до зміни внутрішньоклітинного рівня Na^+ і K^+ , ініціюють цілий ряд процесів, зокрема клітинний ріст і генну експресію. Виявлено, що Src зв'язується з Na^+, K^+ -АТФазою і активується при зв'язуванні з ферментом оубаїну, ініціюючи каскад сигнальної трансдукції. При зв'язуванні оубаїну з молекулою ферменту також трансактивується рецептор епідермального фактора росту (EGFR), унаслідок чого активуються білки-компоненти сигнальних систем: She, Grb, Ras, Raf, MEK, і ERK.

Комплекс Na^+, K^+ -АТФази з оубаїном інтерналізується у клітину за клатринзалежним механізмом. Фермент також бере участь у процесах сигнальної трансдукції, взаємодіючи з рецептором інозитол-1,4,5-трифосфату на епітеліальних клітинах. Зв'язування оубаїну змінює характер цієї взаємодії, викликаючи синхронізовані коливання концентрації Ca^{2+} , які приводять до активації транскрипційного фактора NF-kB.

Ці дослідження дозволили розширити уявлення про функції Na^+, K^+ -АТФази. Загальновизнано, що ендогенні кардіотонічні стероїди посилюють скорочення скелетної та серцевої мускулатури, підвищуючи концентрацію внутрішньоклітинного кальцію в міоцитах. Іони Ca^{2+} надходять у клітину за допомогою $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінника, це приводить до інгібування активності Na^+, K^+ -АТФази. Високі концентрації Ca^{2+} також посилюють скорочення м'язів, проте в цьому випадку фермент інгібується внаслідок збільшення концентрації внутрішньоклітинного Na^+ , навіть коли це має місце тільки в обмеженому просторі цитоплазми. Ці дані свідчать про те, що взаємодія ендогенних лігандів з оубаїнзв'язувальним сайтом Na^+, K^+ -АТФази зумовлює виникнення різних процесів у клітинах, що залежить від концентрації цих лігандів. Припускають, що передача сигналу, ініційована взаємодією лігандами з молекулою Na^+, K^+ -АТФази, бере участь у розвитку таких патологій, як гіпертрофія та ішемія.

Оскільки Na^+, K^+ -АТФаза інгібується серцевим глікозидом *оубаїном* (строфантином G) (рис. 2.3), то, застосовуючи його, можна визначити активність цього ферменту (Рыбальченко, 1988). Вимірюють АТФазну активність у середовищі без інгібітора та віднімають від неї значення активності за його присутності. АТФазна активність виражається як кількість неорганічного фосфору, відщепленого від АТФ за одиницю часу.

Для фіксації гідролізу АТФ під дією Na^+, K^+ -АТФази застосовують спектрофотометричний метод, який базується на вимірюванні кількості неорганічного фосфату – продукту реакції гідролізу АТФ. Його кількість визначають за методом Фіске – Суббароу (Рыбальченко, 1988). Для проведення реакції виявлення неорганічного фосфору використовують молібденову кислоту, котра при взаємодії з фосфорною кислотою утворює ком-

плексну сполуку, відновлення якої супроводжується виникненням розчину синього кольору. Застосовуючи розчин $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, будують калібрувальний графік, за яким визначають концентрацію неорганічного фосфору в пробі. Методом Фіске – Суббароу також користуються для визначення інших маркерних ферментів біомембран, таких як Mg^{2+} -залежна Ca^{2+} -АТФаза, H^+ , K^+ -АТФаза, 5'-нуклеотидаза.

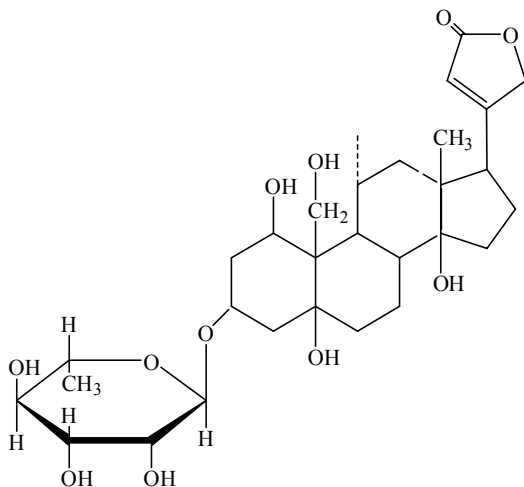


Рис. 2.3. Структурна формула оубаїну

При визначенні активності Na^+ , K^+ -АТФази у пробі вносять інкубаційне середовище, яке містить субстрат (АТФ) та іони Na^+ і K^+ . Паралельно до проб додають інгібітор ферменту – оубаїн. Ініціюють реакцію додаванням очищеного ферменту або білка мембранного препарату, інкубують за температури 37°C , зупиняють реакцію холодною трихлороцтовою кислотою. Осаджують білок, центрифугуючи проби за швидкості 3000 об./хв. Вміст неорганічного фосфору визначають за методом Фіске – Суббароу. Вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі за довжини хвилі 820 нм. Віднімаючи від загальної АТФазної активності ($A_{\text{заг}}$) активність у середовищі, що містить оубаїн ($A_{\text{оу}}$), отримують значення активності маркерного ферменту – оубаїнзалежної Na^+ , K^+ -АТФази.

2.2.2. Mg^{2+} -залежна Ca^{2+} -АТФаза плазматичних мембран

Ферменти Ca^{2+} -АТФази містяться у плазматичній мембрані та мембранах клітинних органел. Виявлено три види кальцієвих помп: Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматичного ретикулула (SERCA – Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase), натрієвий калієвий обмінник (NCX) і Ca^{2+} -АТФаза плазматичної мембрани (PMCA – plasma membrane calcium ATPase). Функцією Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани та Na^+/K^+ -обмінника є видалення Ca^{2+} з клітини для підтримання трансмембранного електрохімічного градієнта цього іона (Di Leva, 2008). У клітинах, що не діляться, концентрація цитозольного кальцію становить менше ніж 0,1 мкМ, що в 10 000 разів менше від позаклітинної. Унаслідок дуже великого трансмембранного електрохімічного градієнта іони Ca^{2+} надходять у клітину через кальцієві канали, тому для нормального перебігу процесів внутрішньоклітинної сигналізації дуже важливо підтримувати низьку концентрацію кальцію в цитозолі. Кальцій депонується у сарко/ендоплазматичному ретикулулі й може вивільнитися при стимуляції.

Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани експресуються у багатьох тканинах: мозку, нирок, серця, еритроцитах, також вона може бути присутня у мікросомах та мітохондріях (Zylińska, 2000). Ca^{2+} -АТФази виконують важливу роль у клітині, регулюючи рівень цитоплазматичного кальцію, який має широкий спектр ефектів: від запуску проліферації клітин до їхньої загибелі. Крім участі в короточасних подіях сигнальної трансдукції, Ca^{2+} -АТФаза плазматичної мембрани залучена також у регуляцію клітинного росту та диференціацію.

Mg^{2+} -залежна Ca^{2+} -АТФаза є маркерним ферментом плазматичних мембран, що здійснює транспорт іонів Ca^{2+} проти градієнта їхньої концентрації з клітини у міжклітинний простір, використовуючи енергію гідролізу АТФ. Як для прямої, так і для зворотної реакції необхідні іони Mg^{2+} . У прямій Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазній реакції магній бере участь у вигляді хелатного комплексу Mg^{2+} -АТФ²⁻, що є "істинним" субстратом реакції, або як ефектор, який безпосередньо зв'язується з білком. Транспорт Ca^{2+}

крізь плазматичну мембрану за участю Ca^{2+} -АТФази здійснюється за рахунок гідролізу АТФ: одна молекула якого витрачається на видалення одного іона Ca^{2+} . Ca^{2+} -АТФаза з високою спорідненістю зв'язується з Ca^{2+} (K_m 100–200 нМ). Він ефективний, коли внутрішньоклітинна концентрація цих іонів дуже низька, і тому бере участь у забезпеченні нормального рівню Ca^{2+} у клітині. Оскільки Ca^{2+} є вторинним посередником, його рівень має бути дуже низьким для запобігання порушень у сигнальній трансдукції.

Як і Na^+ , K^+ -АТФаза, Ca^{2+} -АТФаза плазматичної мембрани належать до АТФаз Р-типу (субклас Р2В), утворюючи під час роботи фосфорильований залишок аспартату в активному центрі. АТФ взаємодіє із двома сайтами молекули Ca^{2+} -АТФази, які мають різну афінність: $K_m^1 = 1\text{--}2,5$ мкМ і $K_m^2 > 100$ мкМ. Ca^{2+} -АТФаза може існувати у двох конформаційних станах: Е1 і Е2. Е1 зв'язує АТФ та іони Ca^{2+} у цитозолі з утворенням високоенергетичного аспартилфосфатного інтермедіату. Білок зазнає конформаційних змін і переходить у форму Е2, яка транспортує Ca^{2+} на позаклітинну поверхню мембрани. Після гідролізу ацилфосфату фермент повертається у стан Е1. Стехіометрія процесу дорівнює 1 : 1 – транслокація однієї молекули Ca^{2+} супроводжується гідролізом однієї молекули АТФ. На відміну від Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани, для роботи Ca^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулума характерна стехіометрія 2 Ca^{2+} /1 молекула АТФ. Для першої коефіцієнт Хілла щодо Ca^{2+} становить 1, для другої – 2.

Механізм роботи Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани був запропонований Карафолі в 1991 р. (рис. 2.4) (Carafoli, 1991). Ca^{2+} -АТФаза зв'язується з комплексом Ca^{2+} -кальмодулін, що зумовлює її активацію, оскільки афінність Ca^{2+} -зв'язувального центру збільшується у 20–30 разів. При цьому швидкість вивільнення Ca^{2+} із клітини підвищується в 10 разів. Комплекс кальцій-кальмодулін, який зв'язується з кальмодулінзв'язувальним сайтом, що приводить до конформаційних змін її молекули.

Усі ізоформи Ca^{2+} -АТФази мають схожу структуру, до складу якої входять 10 трансмембранних доменів. Велика внутрішньоклітинна петля розташована між трансмембранними доме-

нами 4 і 5 і містить АТФ-зв'язувальний сайт і залишок аспартату, що підлягає фосфорилуванню. Біля С-кінця поліпептидного ланцюга знаходиться кальмодулінзв'язувальний домен. Вважається, що він є аутоінгібіторним доменом, який регулює активність Ca^{2+} -АТФази, зв'язуючись із цитоплазматичними петлями між трансмембранними доменами 2 і 3, а також 4 і 5, унаслідок чого блокується зв'язування і розщеплення АТФ. Зв'язування кальмодуліну приводить до дисоціації цього домену, розщеплення АТФ з наступною активацією ферменту. Розташування Ca^{2+} -АТФази у плазматичній мембрані подібне до інших АТФаз Р-типу.

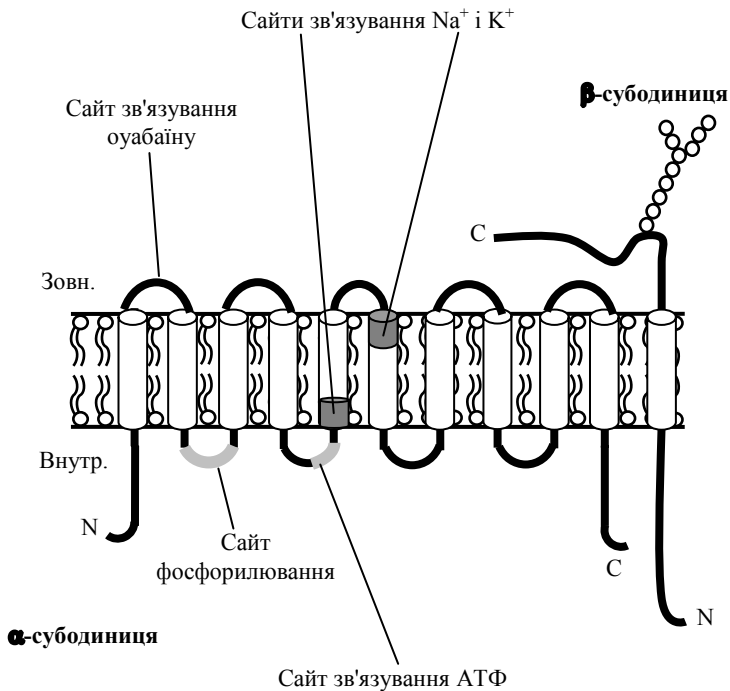


Рис. 2.4. Стадії роботи Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани (Carafoli, 1991)

Вільний кальмодулінзв'язувальний домен Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани взаємодіє з двома сайтами молекули помпи

й виконує роль репресора її активності, оскільки перекриває доступ до АТФ-зв'язувального сайту її молекули. Кальмодулін взаємодіє з чотирма іонами Ca^{2+} , які після цього зв'язуються з аутоінгібіторним доменом ферменту. При цьому активність помпи стимулюється: підвищується афінність до кальцію та збільшується кількість обертів.

Деякі ізоформи Ca^{2+} -АТФази містять PDZ-домен, локалізований на С-кінці. Його назва є аббревіатурою, яка складається з перших літер назв трьох білків: post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor і білок zonula occludens-1. Цей домен містить 80–90 амінокислотних залишків і входить до складу багатьох бактеріальних, дріжджових, вірусних, рослинних і тваринних білків, що беруть участь у трансмембранному транспорті іонів та процесах сигнальної трансдукції. PDZ-домен сприяє зв'язуванню трансмембранних білків із цитоскелетом.

Досліджено 4 ізоформи Ca^{2+} -АТФази, кожна із яких кодується окремим геном і експресується в різних тканинах організму. У результаті альтернативного сплайсингу цих чотирьох генів виникли різні субтипи цих ізоформ, сьогодні знайдено таких 20 варіантів. Ізоформа 1 найширше розповсюджена у тканинах людини, разом з ізоформою 4 вона присутня в серці. Ізоформи 2 і 3 переважно знайдені в ЦНС, вони дуже швидко активуються і беруть участь у процесах проведення збудження у нервових та м'язових клітинах. У тканині мозку існують різні типи Ca^{2+} -АТФаз плазматичної мембрани, залучені в регуляцію рівня кальцію в зоні синапсу, причому Ca^{2+} необхідний для вивільнення синаптичних везикул. Ca^{2+} -АТФаза плазматичної мембрани експресується у клітинах ссавців, рівень її експресії не перевищує 1% від рівня загальних мембранних білків. У мозку це значення в 10 разів вищим, ніж у незбудливих клітинах (Zylińska, 2000).

Ca^{2+} -АТФаза плазматичної мембрани стимулюється при безпосередній взаємодії з кальмодуліном. Крім цього, вона може стимулюватися за альтернативними шляхами: за участю протеїнкіназ (протеїнкінази А і С), дії кислих фосфоліпідів або насичених жирних кислот. У результаті стимуляції насамперед змінюється афінність помпи до кальцію, а також кількість її обертів.

Порушення функціонування Ca^{2+} -АТФаз пов'язано з виникненням цілої низки хвороб, таких як нейросенсорна глухота,

діабет, гіпертонія. Наприклад, при гіпертонії зростає вміст внутрішньоклітинного кальцію, відбувається стимуляція м'язового скорочення, унаслідок – підвищується тонус судин. Причиною такого пригнічення активності вважають інтенсифікацію процесів вільнорадикального окиснення, оскільки фермент є дуже чутливим до ліпопероксидації, під час якої відбувається окиснення SH-груп його активного центру.

Структура та механізм дії Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани схожі з такими для Ca^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулула. Відмінністю є наявність додаткової петлі на COOH -кінці поліпептидного ланцюга, експонованої в позаклітинний простір (рис. 2.5). Функцією її є зв'язування з кальмодуліном. Комплекс Ca^{2+} -кальмодулін зв'язується з Ca^{2+} -АТФазою і активує її, у 20,30 разів збільшуючи афінність Ca^{2+} -зв'язувального центру. Кальмодулін також підвищує швидкість вивільнення кальцію із клітини в 10 разів.

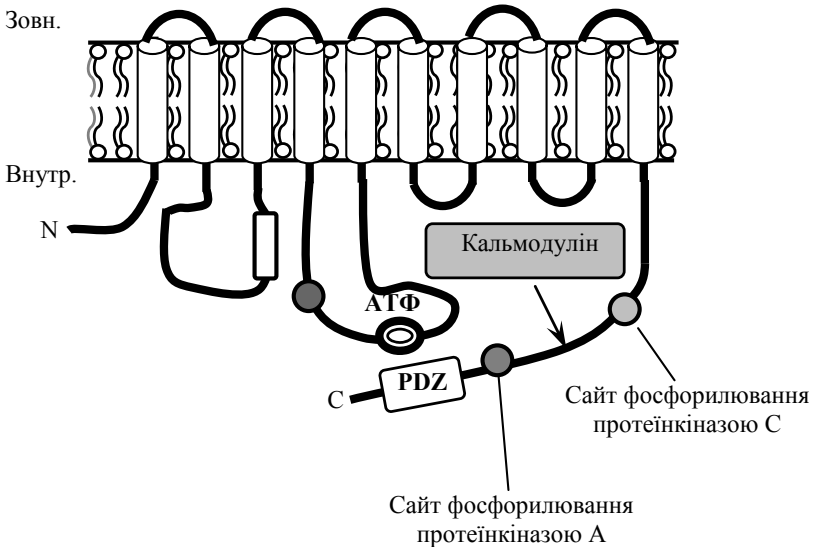


Рис. 2.5. Модель структури Mg^{2+} -залежної Ca^{2+} -АТФази з урахуванням мембранної топології та вторинної структури (Zylińska, 2000)

Визначити активність Mg^{2+} -залежної Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани можна за кількістю неорганічного фосфору, котрий вивільнюється під час реакції ферментативного гідролізу АТФ. Для інгібування активності цього ферменту використовуються ванадат натрію, який є його потужним інгібітором. Принцип визначення ферменту аналогічний до принципу визначення Na^+, K^+ -АТФази (див. підрозд. 2.2.1). Проводять ферментативну реакцію гідролізу АТФ Mg^{2+} -залежною Ca^{2+} -АТФазою у присутності іонів Ca^{2+} і Mg^{2+} . Паралельно проводять реакцію з інгібітором та без нього. Вміст відщепленого органічного фосфату визначають за методом Фіске – Суббароу. Активність Mg^{2+} -залежної Ca^{2+} -АТФази виражають як різницю між загальною та Mg^{2+} -залежною АТФазною активністю (швидкість гідролізу АТФ у середовищі без кальцію з додаванням ванадату натрію).

Активність Mg^{2+} -залежної Ca^{2+} -АТФази також можна визначити іншим методом з використанням теофіліну. Даний метод застосовується для визначення активності Mg^{2+} -залежної Ca^{2+} -АТФази тільки у плазматичній мембрані. При цьому використовують теофілін – інгібітор Mg^{2+} -залежної Ca^{2+} -АТФази виключно плазматичної мембрани. Теофілін (диметилксантин) є похідною пурину, гетероциклічним алкалоїдом рослинного походження. Ця сполука використовується як кардіотонічний препарат, що викликає розслаблення кровеносних судин мозку, а також шкіри й легень. Пригнічуючи надходження іонів кальцію за участю Ca^{2+} -АТФази, теофілін зменшує скоротливу активність гладенької мускулатури. Крім цього, він інгібує фосфодіестеразу, викликаючи накопичення у клітинах цАМФ, а також пуринові (аденозинові) рецептори. Інкубаційне середовище містить іони Ca^{2+} , Na^+ , теофілін. Додають очищену Mg^{2+} -залежну Ca^{2+} -АТФазу (або мембранний препарат) та ініціюють реакцію субстратом – АТФ. Далі проводять операції, аналогічні до описаних вище. Вміст відщепленого неорганічного фосфору за методом Фіске – Суббароу. Активність ферменту розраховують як різницю між загальною (у середовищі, що містить кальцій) та Mg^{2+} -залежною АТФазною активністю (у середовищі без кальцію з додаванням ЕДТА).

2.2.3. H^+,K^+ -АТФаза плазматичних мембран

H^+,K^+ -АТФаза (АТФ фосфогідролаза (H^+/K^+ -обмінна), К.Ф. 3.6.3.10) є гетеродимерним комплексом, котрий знаходиться у секреторних пухирцях та в ендоплазматичних каналцях парієтальних клітин шлунка. Вона виконує функцію іонного насоса, здійснюючи антипорт протонів та іонів калію через апікальну мембрану цих клітин за рахунок енергії гідролізу АТФ. Стехіометрія цього процесу становить $2H^+/2K^+/АТФ$ за рН 6,1 і знижується до $1H^+/1K^+/АТФ$, коли рН у порожнині шлунка стає меншим за 3,0. 1 моль АТФ зв'язується із 2 моль АТФази з утворенням 1 моль фосфоферменту за фізіологічної концентрації АТФ.

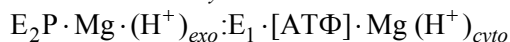
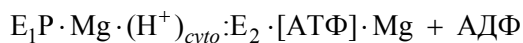
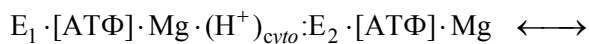
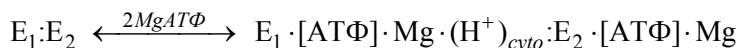
H^+,K^+ -АТФаза відповідає за секрецію парієтальними клітинами шлункового соку. З порушенням її функціонування пов'язано виникнення гастритів, дуоденітів, виразкової хвороби шлунка. За участю H^+,K^+ -АТФази протон транспортується з цитоплазми в порожнину шлунка, а іон калію – усередину клітини. В одному напрямку з протонами проти градієнта концентрації переносяться іони хлору. Іони калію, що надходять у клітину, виходять з неї за градієнтом концентрації разом з іонами хлору через апікальну мембрану парієтальних клітин. Утворення протонів відбувається внаслідок розкладання вугільної кислоти H_2CO_3 до H^+ і HCO_3^- під дією карбоангідрази. Іони HCO_3^- в обмін на Cl^- через базолатеральну мембрану за градієнтом концентрації надходять у кров. У результаті в порожнину шлунка секретується соляна кислота у вигляді іонів H^+ і Cl^- , а іони K^+ повертаються у клітини.

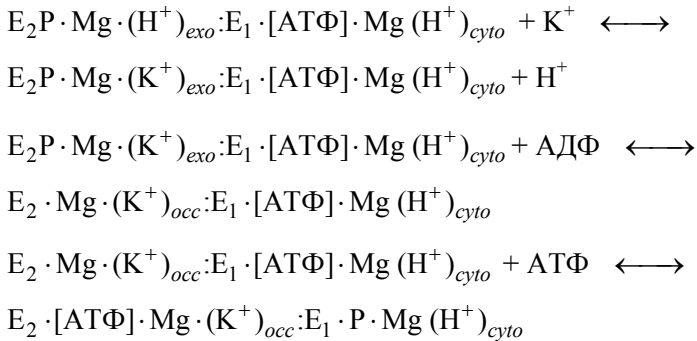
За структурою H^+,K^+ -АТФаза є α,β -гетеродимером (Shin, 2009). Каталітична α -субодиниця складається з 1033 або 1034 амінокислотні залишки. Вона містить 10 трансмембранних сегментів. Внутрішньомембранні частини сегментів ТМ4, ТМ5, ТМ6 і ТМ8 містять послідовності кислих амінокислотних залишків, які формують іон-зв'язувальний домен. Лізин в положенні 791, локалізований у 5-му трансмембранному сегменті H^+,K^+ -АТФази шлунка, в інших ізоформах ферменту заміщується на серин. Вважається, що цей залишок визначає специфічність ферменту стосовно транспорту іонів H^+ з клітини. β -Субодиниця складається

з 291 амінокислотного залишку і має 1 трансмембранний сегмент, N-кінець якого експонований у цитоплазму. Позаклітинний домен β -субодиниці містить 6 або 7 сайтів N-глікозилювання, необхідних для фолдингу цього ферментного білка, дозрівання і транспорту до плазматичної мембрани. Олігомерна структура H^+, K^+ -АТФази шлунка повністю формується в ендоплазматичному ретикулумі, після чого фермент транспортується у вигляді гетеродимеру до апікальної мембрани.

Неактивною формою H^+, K^+ -АТФази шлунка є $[\alpha\beta]_2$ гетеродимерний олігомер (форма E1) (Morth, 2007). Фермент зазнає структурних змін з утворенням мономерного гетеродимеру (форми E2). Показано, що в E1 формі іон-зв'язувальний домен ферменту на внутрішній частині мембрани взаємодіє з АТФ та двома іонами Mg^{2+} , унаслідок чого $\alpha\beta$ -фосфатні залишки нуклеотиду наближаються до акцепторного залишку аспартату ферменту. Після цього γ -фосфатний залишок переноситься на каталітичну субодиницю білка та ініціює конформаційні зміни його молекули з переходом форми E1 у форму E2, у якій іонні сайти зв'язуються з іонами водню. При цьому протон вивільнюється назовні, а іон калію зв'язується із зовнішньою поверхнею мембрани, зверненою в порожнину шлунка. АТФ виконує подвійну роль у транспортному циклі H^+, K^+ -АТФази. АТФ фосфорилує фермент та викликає перехід $K^+ \cdot E2 \rightarrow E1 + K^+$.

У 1976 р. було показано, що шлункова секреція соляної кислоти залежить від дії електронейтрального АТФ-залежного $H^+ - K^+$ обмінника. Дія H^+, K^+ -АТФази є останньою ланкою секреції HCl, у результаті чого дійшли висновку, що інгібітори протонної помпи більш ефективно пригнічують її, ніж агоністи рецепторів.





Існує цілий ряд сполук, які інгібують активність H^+, K^+ -АТФази. Їх використовують для зниження шлункової секреції соляної кислоти при лікуванні таких хвороб, як виразки шлунка та дванадцятипалої кишки, хронічного гастриту, гастроєзофагального рефлюксу тощо. Ці сполуки називаються інгібіторами протонної помпи (ІПП). Прикладами їх є омепразол, лансопразол, пантопразол і рабепразол. Усі ІПП інгібують H^+, K^+ -АТФазу шлунка, ковалентно зв'язуючись із ферментом. Вони перетворюються на активну форму в кислому середовищі порожнини секреторних каналців активних парієтальних клітин у безпосередній близькості від поверхні ферменту, підлягаючи протонуванню та перетворенню у сульфенамід. Після цього ці сполуки зв'язуються з одним або більше залишками цистеїну H^+, K^+ -АТФази, які знаходяться на ділянці поліпептидного ланцюга, експонованій у позаклітинне середовище.

Активність H^+, K^+ -АТФази, як і описаних вище АТФаз (див. підрозд. 2.2.1), визначають за кількістю неорганічного фосфору (вимірюють за методом Фіске – Суббароу), відщепленого від субстрату (АТФ) за одиницю часу. У наведеному методі оуабайн входить до складу інкубаційного середовища для інгібування H^+ -АТФазної активності. Активність H^+, K^+ -АТФази виражають як різницю між загальною АТФазною активністю (швидкістю гідролізу АТФ у середовищі без калію) й активністю K^+ -АТФази (швидкістю гідролізу АТФ у середовищі з додаванням КСІ).

2.2.4. 5'-Нуклеотидаза плазматичних мембран

5'-Нуклеотидаза (5'-АМФаза, К.Ф. 3.1.3.5) каталізує гідроліз складноефірного зв'язку між залишком неорганічного фосфату і 5'-ОН-групою рибози або дезоксирибози нуклеозидмонофосфатів. Ці ферменти присутні у плазматичних мембранах бактеріальних, рослинних і тваринних клітин. Вони можуть мати як трансмембранну, так і поверхневу локалізацію. 5'-Нуклеотидази гідролізують широкий ряд пуринових і піримідинових 5'-мононуклеотидів, 5'-динуклеотидів і 5'-тринуклеотидів, а також УДФ-глюкозу і ФАД, однак переважним субстратом цих ферментів є 5'-мононуклеотидази.

Аналіз первинної структури кДНК бактерій і хребетних тварин показав, що 5'-нуклеотидази різних організмів є філогенетично спорідненими ферментами. Цитозольні 5'-нуклеотидази контролюють внутрішньоклітинний рівень 5'-мононуклеотидів, а мембранні форми цих ферментів беруть участь у каскадних реакціях перетворення позаклітинного АТФ на аденозин (у зв'язку з цим вони цікаві у фармакологічному плані). Імовірно, фізіологічні функції ферментів, виділених із різних організмів і в різних клітинах відрізняються. Наприклад, мембранозв'язана форма ферменту, закорена в мембрані за допомогою фосфатидилінозитулу, бере участь у клітинно-клітинних і клітинно-матриксних взаємодіях, а також у процесах сигналізації. 5'-Нуклеотидаза короткочасно експресується в певних типах клітин, її активність регулюється зовнішніми факторами. Показано, що вона може вивільнюватися в позаклітинне середовище. Молекулярні аспекти та особливості функціонування 5'-нуклеотидази описані в багатьох роботах (Babiyshuk, 2006).

5'-Нуклеотидаза складається із 548 амінокислотних залишків її молекулярна маса становить 61 kDa. С-кінець має послідовність з гідрофобних амінокислот, яка замінюється на глікозилфосфатидилінозитол, зв'язаний з Ser523. Амінокислотні послідовності двох форм ферменту ссавців ідентичні на 90%.

За субклітинною локалізацією, молекулярним механізмом дії та кінетичними характеристиками 5'-нуклеотидази тварин поділяють на три основні форми: одну мембранозв'язану (екто-5'-нуклеотидаза, e-N) і дві розчинні форми. Перша містить у своїй структурі глікозилфосфатидилінозитольний "якір" і розташована на зовнішньому боці плазматичної мембрани. Вона гідролізує виключно нуклеозид-5'-монофосфати, не діючи на 2'- і 3'-монофосфати. Дві цитозольні розчинні форми (цитоплазматична 5'-нуклеотидаза-I, c-N-I і (цитоплазматична 5'-нуклеотидаза-II, c-N-II) мають подібні характеристики, але відрізняються за афінністю до 5'-АМФ. Гідроліз 5'-АМФ є стереоселективним, L-енатіомер не гідролізується. Значення K_m для 5'-АМФ мають мікромолярний порядок.

АДФ, АТФ і аденозин-5'-метилендифосфат є високоефективними конкурентними інгібіторами 5'-нуклеотидази, конканавалін А – неконкурентний. Значення константи інгібування мають мікромолярний порядок, а у випадку аденозин-5'-метилендифосфату – наномолярний. Неорганічний фосфат не здатний ефективно інгібувати фермент, його активність максимальна при слабколужних рН (7-8). Метилксантини (наприклад, теофілін і кофеїн) також здатні інгібувати 5'-нуклеотидазу. Активність ферменту не залежить від двовалентних катіонів, проте може зростати при додаванні мілімолярних концентрацій Mg^{2+} . Такі іони металів, як Pb^{2+} і Hg^{2+} можуть інгібувати ферментативну активність при хронічній інтоксикації. Природним лігандом екто-5'-нуклеотидази є Zn^{2+} , молярне співвідношення зв'язування цинк/фермент становить 2. У зв'язку з цим за наявності дефіциту цинку в лімфоцитах людини 5'-нуклеотидазна активність зменшується. Екто-5'-нуклеотидаза є $\alpha\alpha$ -димером, стабілізованим дисульфідними зв'язками. Глікозилфосфатидилінозитольний "якір" ферментів з печінки шурів і плаценти людини містить манозу, глюкозамін, жирні кислоти представлені міристиновою і пальмітиновою.

Гідроліз 5'-монофосфату за дії 5'-нуклеотидази у різних організмів має важливе фізіологічне значення. Цей фермент є кін-

цевою ланкою каскаду перетворення позаклітинних тринуклеотидів на нуклеозиди. Він бере участь у двох метаболічних шляхах: інактивації та катаболізму АТФ та утворення аденозину. Зворотне поглинання нуклеозидів забезпечує поповнення пулу нуклеотидів у клітині. АТФ є нейромедіатором, він зв'язується з пуринергічними рецепторами, які містяться на поверхні клітин багатьох тканин, включаючи серцево-судинну та нервову системи, скелетні м'язи. Позаклітинна інактивація АТФ необхідна для регуляції рівня цього нейромедіатору. Утворений аденозин зв'язується із специфічними рецепторами та індукує цілий ряд каскадів, які беруть участь у реалізації таких фізіологічних функцій, як вазодилатація, зменшення ступеня фільтрації в ниркових каналцях, інгібування вивільнення реніну та нейротрансмітерів, пригнічення імунної відповіді та запальних реакцій. АТФ накопичується у секреторних везикулах холергергічних і адренергічних нейронів, а також у хромафінних клітинах і тромбоцитах. АТФ і АДФ можуть також вивільнюватися екзоцитозом. При вивільненні цих нуклеотидів значення їхньої позаклітинної концентрації знаходяться в межах мілімолів. Такі високі концентрації АТФ і АДФ ефективно інгібують екто-5'-нуклеотидазу, тому при вивільненні АТФ із клітин утворення позаклітинного аденозину під час гідролізу цих нуклеотидів (АТФ і АДФ) пригнічується.

5'-нуклеотидаза є маркерним ферментом плазматичної мембрани, хоча її активність також може бути виявлена в мембранах ендоплазматичного ретикулума. Цей фермент широко використовується для оцінки чистоти мембранних фракцій. Активність 5'-нуклеотидази визначають за кількістю неорганічного фосфору, звільненого в результаті гідролізу АМФ, для чого використовують метод Фіске – Суббароу (Рыбальченко, 1988). Інкубаційне середовище містить субстрат – АМФ. До нього додають очищений фермент чи мембранний препарат, інкубують при 37 °С. Зупиняють реакцію, додаванням ТХО, осаджують білок центрифугуванням. Вміст неорганічного фосфору визначають за методом Фіске – Суббароу.

2.2.5. Лужна фосфатаза плазматичних мембран

Лужна фосфатаза (лужна фосфогідролаза моноєфірів ортофосфорної кислоти, *p*-нітрофенілфосфатаза, К.Ф. 3.1.3.1) є мембранозв'язаним ферментом, що міститься на зовнішньому боці плазматичної мембрани і гідролізує нуклеозидмонофосфати при високих рН (8–10). Лужні фосфатази людини поділяють на чотири типи: тканинонеспецифічна, кишкова, плацентарна та ембріональна (Міао, 2002).

Тканинонеспецифічна лужна фосфатаза широко розповсюджена в багатьох тканинах, включаючи печінку, кістковий мозок, нирки, і тому називається також ЛВК-типом (*liver/bone/kidney*). Лужна фосфатаза закріплюється у мембрані за допомогою глікозилфосфатидилінозитолу, який приєднується до її молекули під час посттрансляційної модифікації. Тканинонеспецифічна лужна фосфатаза присутня у плазматичній мембрані гіпертрофованих хондроцитів, остеобластів та одонтобластів, а також сконцентрована в мембранах везикул, які відпуковуються від цих клітин. Хоча тривимірна структура ферменту досі не з'ясована, методом комп'ютерного моделювання було показано, що тканинонеспецифічна і плацентарна форми ферменту виявляють 57% ідентичність і 74% гомології (Le Du, 2001).

Плацентарна лужна фосфатаза людини є гомодимером із двома дисульфідними зв'язками і має два цинкзв'язувальні сайти, магній- та кальційзв'язувальні сайти в ділянці контакту мономерів. Активний центр містить два цинкзв'язувальні сайти, магнійзв'язувальний сайт і залишок серину в положенні 102, за яким приєднується фосфат. Лужна фосфатаза ссавців має специфічний домен – *stowp*-домен, який являє собою гнучку петлю.

Фізіологічними субстратами тканинонеспецифічної лужної фосфатази є неорганічний пірофосфат, піридоксаль-5'-фосфат і, можливо, фосфоетаноламін. Установлено, що цей фермент відіграє важливу роль у процесах мінералізації. За його дії у клітинах зменшується вміст неорганічного пірофосфату, який є інгібітором утворення гідроксилапатиту, оскільки для синтезу цієї

сполуки необхідний неорганічний фосфат. Піридоксаль-5'-фосфат – активна форма вітаміну B₆ – необхідний для функціонування нейронів, він, зокрема, бере участь у процесах утворення нейромедіаторів (дофаміну, серотоніну, гістаміну, ГАМК, таурину). Ця сполука нездатна проникати у клітини. Тканинонспецифічна лужна фосфатаза дефосфорилує піридоксаль-5'-фосфат з утворенням піридоксалю, що може вільно проникати в клітини. Те, що фосфоетаноламін є субстратом даної форми ферменту, остаточно не підтверджено. Піридоксаль-5'-фосфат, як і неорганічний пірофосфат, накопичується у плазмі крові та сечі мишей, нокаutowаних за геном тканинонспецифічної лужної фосфатази, і людей з відсутністю цього ферменту.

Факторами, що посилюють експресію гена лужної фосфатази, є білки Sp3, прогестин, фактор, що стимулює колонії гранулоцитів (G-CSF), цАМФ і ретиноева кислота. Остання є активною формою вітаміну А і регулятором росту, вона посилює експресію шляхом взаємодії з відповідним рецептором і елементом відповіді на ретиноеву кислоту в промоторі гена тканинонспецифічної лужної фосфатази. 1,25-Дигідроксिवітамін D – активована форма вітаміну D і регулятор мінералізації, також посилює експресію гена цього ферменту шляхом посттранскрипційних модифікацій, підвищуючи стабільність мРНК. Фосфати теж здатні активувати експресію гена тканинонспецифічної лужної фосфатази. β-Гліцерофосфат активує експресію цього ферменту, а також може стимулювати процеси мінералізації.

Лужна фосфатаза належить до маркерних ферментів плазматичних мембран. Її активність можна визначити декількома методами, наприклад, за *n*-нітрофенолом, який відщеплюється від субстрату *n*-нітрофенілфосфату, а також за неорганічним фосфатом.

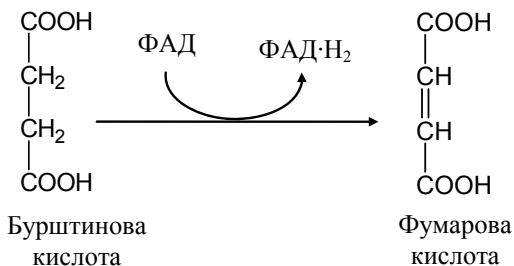
Активність лужної фосфатази визначають спектрофотометрично за швидкістю гідролізу штучного субстрату – *n*-нітрофенілфосфату. До інкубаційного середовища додають субстрат, очищений фермент або мембранний препарат та інкубують при 37 °С. Вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 405 нм, додають по краплині 20%-ву HClO₄, перемішують і знову вимірюють оптичну густину. Вміст *n*-нітрофенолу визначають за калібрувальним графіком.

Іншим методом визначення активності лужної фосфатази (за Боданським) вимірюють кількість неорганічного фосфору, котрий вивільнюється при гідролізі β -гліцерофосфату натрію під впливом ферменту. Метод був розроблений для визначення активності ферменту в сироватці крові, проте він придатний і для роботи з мембранним препаратом як джерелом ферменту. Для лужної фосфатази визначення проводять у буферному середовищі при рН 8,4–0,0, а для кислоти – при рН 4,5–5,0. Для цього змішують гліцерофосфатний буфер, білок мембранного препарату, інкубують за температури 37 °С, додають 10%-ву ТХО та центрифугують. У надосадовій рідині визначають вміст неорганічного фосфору (з використанням молібденового розчину та аскорбінової кислоти). Вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі або фотоелектроколометрі (довжина хвилі 630–690 нм). Активність фосфатази також виражається кількісно в міліграмах неорганічного фосфору, що утворюється в результаті дії фосфатази, яка міститься у 100 мл ферментного препарату або сироватки крові (одиниці Боданського – ВЕ).

Визначення кислоти фосфатази відрізняється лише тим, що його проводять у кислому середовищі, оскільки рН-оптимум цього ферменту становить близько 4,95. Активність ферменту розраховують так само, як і для лужної фосфатази.

2.2.6. Сукцинатдегідрогеназа мітохондрій

Сукцинатдегідрогеназа (К.Ф. 1.3.99.1) є маркерним ферментом внутрішньої мітохондріальної мембрани, міцно зв'язаним з ліпідним бішаром за допомогою контакту з якірними білками. Цей фермент також називають **сукцинат-кофермент Q редуктазою**. Він бере участь і в реакціях циклу трикарбонових кислот (каталізуючи реакцію окиснення бурштинової кислоти до фумарової) і також є компонентом II комплексу електронотранспортного ланцюга мітохондрій (каталізуючи реакцію відновлення убіхінону до убіхінолу за участю коферменту ФАД) (Rutter, 2010).



Сукцинатдегідрогеназа свині сформована гідрофільною "головою", яка звернена у матрикс, і гідрофобним "хвостом", вбудованим у внутрішню мембрану, з коротким сегментом, що виступає в міжмембранний простір (Yankovskaya, 2003). Гідрофільна "голова" складається з двох субодиниць, які утворюють каталітичний кор (Sdh1 і Sdh2 у дріжджів та SdhA і SdhB у ссавців). Каталітичний кор (Sdh1 і Sdh2) містить редокс-кофактори, що беруть участь у транспорті електронів до убіхінону. Sdh1, у межах якої знаходиться сайт зв'язування сукцинату, ковалентно зв'язана з ФАД. Sdh2 має 3 Fe-S-центри, які опосередковують транспорт електронів до убіхінону. Sdh2 також формує межу розділення між каталітичним доменом і доменом, заякореним у мембрану.

Мембранний домен складається із двох субодиниць (Sdh3 і Sdh4 у дріжджів та SDHC і SDHD у ссавців). Він містить гем на межі контакту Sdh3 і Sdh4, які зв'язуються з ним за допомогою залишків гістидину. Сукцинатдегідрогенази ссавців містять два сайти зв'язування убіхінону (високо- і низькоафінний) (Yankovskaya, 2003). Високоафінний сайт (QP-проксимальний) розташований на зверненому в міжмембранний простір боці внутрішньої мітохондріальної мембрани і сформований залишками амінокислот Sdh2, Sdh3 і Sdh4 субодиниць. Він знаходиться на відстані 7 Å від 3Fe-4S редокс-центру і є домінуючим сайтом у сукцинатдегідрогенази дріжджів. Другий (низькоафінний) сайт зв'язування убіхінону (QD – дистальний) розташований ближче до зверненого в міжмембранний простір боці внутрішньої мітохондріальної мембрани. На відміну від відновлення ФАД за участю двох електронів, відновлення убіхінону відбувається поетапно. QP-сайт стабілізує відновлений семихі-

нон, що сприяє повному відновленню убіхінону, протонування якого відбувається за допомогою консервативного залишку тирозину в одному із сайтів його зв'язування.

Різні види сукцинатдегідрогенази відрізняються за кількістю гемів та їхніми редокс-властивостями. До того ж, субодиниці у складі мембранного домену більш варіабельні, ніж висококонсервативний каталітичний коровий домен (Rutter, 2010). Значення гему в еукаріотичних сукцинатдегідрогеназ не з'ясовано. Гем не є необхідним для відновлення убіхінону за участю QR сайту, проте він може опосередковувати транспорт електронів до дистального QD сайту.

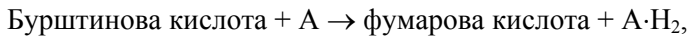
Ферментативна реакція, каталізована сукцинатдегідрогеназою, починається зі зв'язування сукцинату молекулою ферменту, що перебуває у відкритому стані Sdh1. Це приводить до закриття домену, переміщення сукцинату до ізоалоксазинового кільця ФАД, де він окиснюється. Окиснення сукцинату залежить від ковалентного приєднання ФАД до залишку гістидину активного центру. Таке ковалентне приєднання підвищує редокс-потенціал ФАД до ~60мВ. Процес окиснення сукцинату включає в себе відщеплення двох електронів від ФАД з наступним перенесенням їх до Fe/S центрів.

Каталітична активність сукцинатдегідрогенази модулюється посттрансляційним фосфорилуванням і ацетилюванням, а також інгібуванням активного центру. У ссавців оборотне ацетилювання за залишками лізину та фосфорилування субодиниці Sdh1 посилює каталітичну активність ферменту. Також вона контролюється інтермедіатами циклу Кребса, включаючи оксалоацетат, що є потужним інгібітором ферменту. Сукцинат викликає дисоціацію оксалоацетату, при цьому фермент активується. Інгібування оксалоацетатом є шляхом модуляції активності сукцинатдегідрогенази, який забезпечує регуляцію метаболічного статусу мітохондрій.

Інгібіторами сукцинатдегідрогенази є ртутеорганічні сполуки, N-алкіламіди малеїнової кислоти, фенілглюксаль, 2,3-бутандіол. Оборотними інгібіторами щодо сукцинату є діаніони маленової та щавелевооцтової кислот.

Сукцинатдегідрогеназа є маркерним ферментом внутрішньої мембрани мітохондрій. За її активністю ідентифікують чистоту отриманого мембранного препарату під час фракціонування клітин і клітинних органел.

Визначення активності сукцинатдегідрогенази базується на реакції відновлення тривалентного заліза до двовалентного, як акцептор (А) використовується фериціанід калію (червона кров'яна сіль):



де А – $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $\text{А} \cdot \text{Н}_2$ – $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Як акцептори можуть використовуватися різні речовини (наприклад, 2,6-дихлорфеноліндофенол, цитохром с).

Інкубаційне середовище містить субстрат – бурштинову кислоту. До нього додають очищений фермент (білок мембранного препарату чи суспензію мітохондрій) фериціанід калію та преінкубують за температури 30 °С для інгібування цитохромоксидази. Ініціюють реакцію додаванням фериціаніду калію, інкубують і зупиняють реакцію ТХО. Осаджують білок центрифугуванням та вимірюють оптичну густину надосадової рідини на спектрофотометрі за довжини хвилі 420 нм. Для розрахунку активності сукцинатдегідрогенази будують калібрувальну криву за вмістом фериціаніду калію (від 100 до 1000 мкг). Для цього проводять усі вказані вище операції, використовуючи як джерело ферменту суспензію мітохондрій. За отриманим калібрувальним графіком визначають кількість фериціаніду калію у пробах. Активність сукцинатдегідрогенази виражають у наномолях сукцинату за 1 хв на 1 мг білка.

Контрольні запитання

1. Наведіть алгоритм отримання плазматичних мембран.
2. Які мембранні органели осаджуються за швидкості 15 000 g?
3. Яким чином за активністю маркерних ферментів визначають чистоту мембранного препарату?

4. Поясніть, чому маркерні ферменти біомембран також називають векторними.

5. Перерахуйте критерії відбору маркерних ферментів.

6. Чому активність маркерних ферментів вимірюють тільки у щойно виділених мембранних препаратах?

7. З якою метою при визначенні активності маркерних ферментів біомембран після додавання ТХО перед вимірюванням кількості неорганічного фосфору білок осаджують центрифугуванням?

8. Які зв'язки утворюються між атомом міді та атомом азоту в складі комплексної сполуки при перебігу біуретової реакції?

9. Яким чином використовують ванадат натрію для визначення активності ферменту $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази?

10. Чому при розрахунку активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази активність Mg^{2+} -АТФази вимірюють у середовищі без кальцію?

11. З якою метою до складу інкубаційного середовища при визначенні активності H^+, K^+ -АТФази входить оубаїн?

12. У мембранних препаратах яких клітинних органел може бути виявлена активність 5'-нуклеотидази?

13. Наведіть реакцію гідролізу *n*-нітрофенілфосфату за дії лужної фосфатази.

14. Яка сполука є джерелом неорганічного фосфату при визначенні активності лужної фосфатази?

15. З якою метою при визначенні активності маркерних ферментів біологічних мембран визначають кількість неорганічного фосфору?

Список літератури

Beguin P. The γ subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function / P. Beguin, X. Wang, D. Firsov // EMBO J. – 1997. – Vol. 16. – P. 4250–4260.

Carafoli E. Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport / E. Carafoli, M. Brini // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2000. – Vol. 4. – P. 152–161.

Guerini D. The significance of the isoforms of plasma membrane calcium ATPase / D. Guerini // Cell Tissue Res. – 1998. – Vol. 292, № 2. – P. 191–197.

Hoshi K. Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice / K. Hoshi, N. Amizuka, K. Oda, et al. // *Histochem. Cell. Biol.* – 1997. – Vol. 107. – P. 183–191.

Juhaszova M. Distinct distribution of different Na⁺ pump alpha subunit isoforms in plasmalemma. Physiological implications / M. Juhaszova, M.P. Blaustein // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1997. – Vol. 834. – P. 524–536.

Vagin O. Plasma membrane delivery of the gastric H,K-ATPase: the role of beta-subunit glycosylation / O. Vagin, S. Denevich, G. Sachs // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2003. – Vol. 285. – P. C. 968–C976.

Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects / H. Zimmermann // *Biochem J.* – 1992. – Vol. 285, Pt 2. – P. 345–365.

Zouzoulas A. The effect of the gamma modulator on Na/K pump activity of intact mammalian cells / A. Zouzoulas, P. B. Dunham, R. Blostein // *J. Membr. Biol.* – 2005. – Vol. 204. – P. 49–56.

Розділ 3

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ МЕМБРАННИХ ЛІПІДІВ

3.1. ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ

3.1.1. Тонкошарова хроматографія

Сьогодні існує багато методів розділення й аналізу ліпідів. Серед них найчастіше використовуються фракціонування за розчинністю в різних розчинниках, колонкова хроматографія на силікагелі й оксиді алюмінію, тонкошарова, а також високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ). Оскільки фракцію ліпідів зазвичай отримують у невеликій кількості, найбільш адекватним методом їхнього аналізу є тонкошарова хроматографія – швидкий і зручний для виконання, причому він дозволяє провести як кількісний, так і якісний аналіз ліпідів різних класів.

Для вивчення ліпідів біомембран насамперед необхідно володіти методами отримання їх із біологічного матеріалу. Існує цілий ряд методичних підходів до екстракції ліпідів, їхнього розділення та аналізу. Оскільки ліпіди утримуються в мембрані за рахунок водневих зв'язків, гідрофобних і електростатичних взаємодій, для виділення їх застосовують полярні розчинники. Зауважимо, що метанол і етанол порушують структуру мембрани і викликають денатурацію мембранних білків. Найчастіше для екстракції використовують суміші розчинників, які містять хлороформ і метанол. Вибір методу екстракції залежить від того, якою є мембрана: у вигляді осаду чи у вигляді концентрованої суспензії або розведеного завису.

Велика кількість жирних кислот ліпідів містить подвійні зв'язки і може зазнавати пероксидного окиснення. Для його уник-

нення використовують розчинники, які попередньо піддавали перегонці. Під час екстракції із суміші слід видаляти кисень, проводити її слід за кімнатної або нижчої температури. Не рекомендується зберігати ліпіди в сухому стані навіть на короткий час, їх слід розчиняти в органічному розчиннику.

Для розділення та аналізу ліпідів, екстрагованих із біологічного матеріалу, існує цілий ряд методів, це, зокрема, фракціонування за розчинністю в різних розчинниках, колонкова і тонкошарова хроматографія. При дослідженні ліпідів мембран переважно аналізуються невеликі кількості цих сполук, тому для їхнього розділення найчастіше застосовується тонкошарова хроматографія на силікагелі (Wewer, 2013). Даний метод дозволяє проводити як якісний, так і кількісний аналіз ліпідів різних класів: багатьох фосфоліпідів, сфінголіпідів (гангліозидів, церебросидів, сульфатидів) тощо, що є характерними для мембран (рис. 3.1; 3.2).

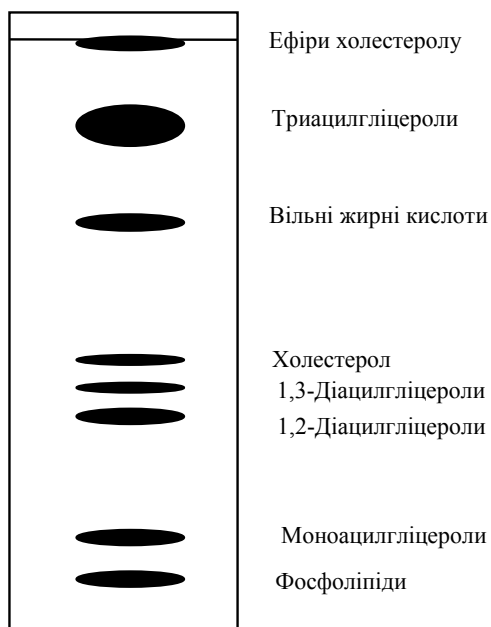


Рис. 3.1. Схематичне зображення розділення ліпідів методом тонкошарової хроматографії на силікагелі G (розчинник – гексан:діетиловий ефір мурашиної кислоти)

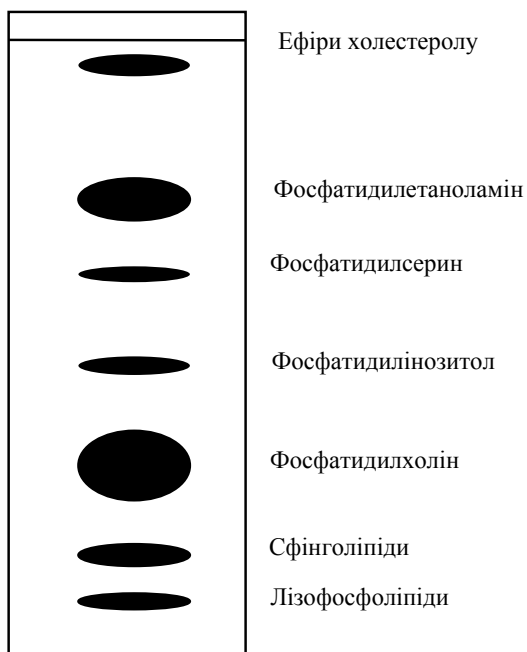


Рис. 3.2. Схематичне зображення розділення фосфоліпідів мембран методом тонкошарової хроматографії на силікагелі Н (розчинник – хлороформ:метанол:оцтова кислота (25:15:4:2))

Для тонкошарової хроматографії використовують такі сорбенти, як силікагель, оксид алюмінію, целюлозу та сефарозу. Їх наносять на пластинку з фольги, пластику чи алюмінію. Щоб уникнути розтікання розчинника по сорбенту, при проведенні хроматографії використовуються полярні розчинники (наприклад, суміш хлороформ:метанол), подібні до тих, що застосовують при екстракції ліпідів із біологічного матеріалу.

Розділення проводять у хроматографічних камерах, стінки яких слід вистилати фільтрувальним папером для прискорення насичення їх парами розчинника. Папір має бути добре просякнутим парами розчинника. Кришку необхідно щільно притиснути до країв хроматографічної камери, знімати її можна тільки на короткий час, щоб помістити туди пластинку. У камері пластинки не повинні прилягати одна до одної, оскільки це призведе до

неякісного розділення ліпідів. Для ефективного розділення хроматографічні пластинки активують, підігріваючи їх при температурі 110 °С протягом 30 хв. Пластинку розкреслюють м'яким олівцем, зразки наносять на неї мікропіпеткою з тонким наконечником або скляним капіляром. Робити це слід обережно, щоб не пошкодити шар сорбенту.

Для ідентифікації ліпідів використовують стандартні зразки ліпідів (чисті зразки всіх досліджуваних ліпідів), які наносять на пластинки одночасно з досліджуваними екстрактами.

Кожен ліпід-стандарт зважують і розчиняють у суміші хлороформ:метанол (1:1). Як стандарти, залежно від мети дослідження, зазвичай використовують фосфатидилхолін, лізофосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин, триацилгліцероли, холестерол і його ефіри, жирні кислоти, цереброзиди, сульфатиди, фосфатидилінозитолі. На кожну пластинку одночасно з ліпідним екстрактом наносять стандартні зразки (10 мкг кожного ліпиду в 10 мкл розчинника). Після нанесення зразків слід зачекати, поки розчинник повністю випариться. Залежно від розміру хроматографічної пластинки використовують 80–150 мл системи розчинників. Розділення закінчують, коли фронт розчинника доходить до рівня на 1–2 см нижче верхнього краю пластинки. Пластинки виймають із камери і висушують у витяжній шафі.

Плями ліпідів на хроматографічних пластинках виявляють різними методами: у парах йоду, амоній молібденовокислим та сульфатною кислотою (фосфоліпіди), нінгідрином в ацетоні (фосфоліпіди з аміногрупами: фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин), α -нафтолом у суміші метанол:вода (гліколіпіди: цереброзиди, сульфатиди, гангліозиди). Спектри ліпідів можна проаналізувати на денситометрі.

При розділенні ліпідів, склад яких є різноманітним (наприклад, при відокремленні лізофосфоліпідів від вихідних негідролізованих ліпідів) розділення може бути неповним. У цьому випадку слід використовувати дві системи розчинників і проводити *двовимірну хроматографію* (рис. 3.3).

Зразок наносять в одному куті пластинки і проводять розділення у першій системі розчинників. Плями при цьому мають розташовуватися вздовж одного краю пластинки. Пластинку

висушують, повертають її під кутом 90^0 так, щоб плями розміщувалися внизу, і проводять розділення у другій системі розчинників. Паралельно на цій самій пластинці проводять розділення стандартних зразків ліпідів у кожній системі розчинників.

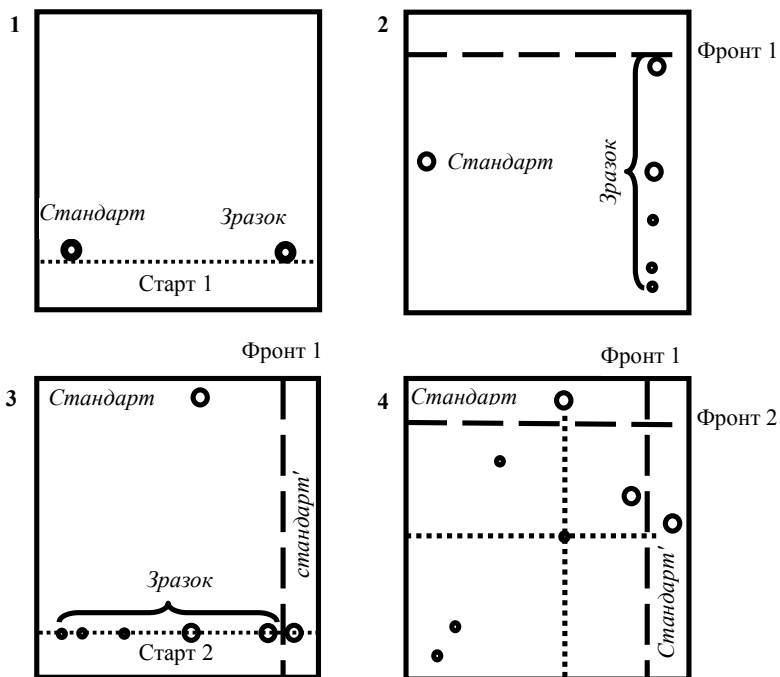


Рис. 3.3. Двовимірна тонкошарова хроматографія ліпідів мембран:
 1 – ліпіди наносять у вигляді плям у правий нижній кут пластинки, у лівій частині наносять стандарт; 2 – положення ліпідів після хроматографії в першому напрямку; 3 – пластинку повертають на 90° , щоб її лівий бік опинився внизу, наносять той самий стандарт; 4 – при розділенні у другій системі розчинників ліпіди піднімаються вгору по пластинці

Ліпіди мембран переважно є фосфоліпідами, проте містять також мінорні компоненти – неполярні ліпіди. До них належать холестерол і його ефіри, моно-, ди- та триацилгліцероли. При виділенні ліпідів мембран вони не виявляються у загаль-

ній фракції, а опиняються у мембранних везикулах (наприклад, ендоплазматичного ретикулума або апарату Гольджі). При виборі розчинника слід урахувати полярність суміші та її кислотність або основність.

Неполярні ліпіди розділяють у тонкому шарі силікагелю, використовуючи систему розчинників : гептан : діетиловий ефір: льодяна оцтова кислота (60:40:2, о/о). Фосфоліпіди залишаються на старті, а інші ліпіди розподіляються таким чином: ефіри холестеролу, моноацилгліцероли, холестерол, діацилгліцероли, жирні кислоти, триацилгліцероли.

Фосфоліпіди розділяють у тонкому шарі силікагелю, використовуючи систему розчинників: хлороформ:льодяна оцтова кислота:вода у співвідношенні 60:50:1:4, о/о. Цю систему можна використовувати для розділення фосфатидилетаноламіну, фосфатидилхоліну, фосфатидилінозитулу і сфінгомієліну. Лізофосфоліпіди залишаються на лінії старту. Кардіоліпіни мігрують швидше за фосфатидилетаноламін. Неполярні ліпіди переміщуються разом із розчинником.

Для розділення кислих фосфоліпідів використовуються системи розчинників ацетон:легкий петролейний ефір, (1:3, о/о). Пластинки підсушують, продуваючи азотом, а потім елюють у тому ж напрямку сумішшю хлороформ:метанол:льодяна оцтова кислота:вода (80:13:8:0,3, о/о). У першій системі розчинників ліпіди переміщуються до верхнього краю пластинки, що перешкоджає їхньому перекиданню з кислими фосфоліпідами. Так розділяють кардіоліпіни, фосфатидні кислоти, церамідолігогексозиди, фосфатидилгліцерол і фосфатидилетаноламін.

При обробленні мембран фосфоліпазою А утворюється суміш фосфоліпідів і лізофосфоліпідів. Розділити їх можна методом тонкошарової хроматографії з використанням сумішей – хлороформ:метанол:ацетон:оцтова кислота:вода (10:4:2:1, о/о). При проведенні хроматографії обов'язково слід працювати зі стандартними зразками.

Для розділення гангліозидів застосовують суміші розчинників типу пропанол і вода (7:3, о/о) або хлороформ, метанол та 2,5 М аміак (60:4:9, о/о). При розділенні не слід використовувати кислоти, оскільки вони приводять до розщеплення гангліозидів.

Особливо актуальними є методи розділення поліфосфоінозитидів (Генніс, 1997). Інозитол-4,5-дифосфат є вторинним посередником у Ca^{2+} -поліфосфоінозитольній системі трансдукції сигналу. Він розщеплюється фосфопіпазою C на діацилгліцерол та інозитол-1,4,5-трифосфат, які також є вторинними посередниками цієї системи та ініціюють каскади білкового фосфорилування. Діацилгліцерол активує протеїнкіназу C, а інозитол-1,4,5-трифосфат викликає вивільнення іонів кальцію з ендоплазматичного ретикулула. Інозитол-1,4,5-трифосфат далі гідролізується до інозитол-1,4-дифосфату, а останній – до інозитол-1-монофосфату. Він включається у синтез фосфатидилінозитулу, який фосфорилується з утворенням фосфатидилінозитол-4-фосфату, а потім – фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату. Три утворені поліфосфоінозитиди можна розділити за допомогою тонкошарової хроматографії сумарних фосфоліпідів. Крім цього, фосфоліпіди можна піддати лужному гідролізу, а утворені інозитолфосфати розділити за допомогою хроматографії на папері або іонообмінної хроматографії, наприклад ВЕРХ. Деякі дослідники використовують ліпіди, у яких інозитол мічений за ^{32}P чи ^{14}C .

Для розділення поліфосфоінозитидів береться пластинка із силікагелем Н, який містить 1% оксалату калію як хелатуючого агента. Це дозволяє позбутися іонів кальцію, котрі перешкоджають міграції фосфотидилінозитол-4,5-дифосфату під час тонкошарової хроматографії. Відокремлення фосфотидилінозитол-4-фосфату та фосфотидилінозитол-4,5-дифосфату від інших фосфоліпідів здійснюють на пластинках із силікагелем Н у системі розчинників метанол:хлороформ:аміак:вода (48:40:5:10, о/о) або пропанол:4 н гідроксид амонію (2:1, о/о). Фосфотидилінозитол перекривається зі сфінгомієліном, фосфатидилсерином, фосфатидилетаноламіном і фосфатидною кислотою. Також фосфоінозитиди можна відокремити від інших фосфоліпідів методом двовимірної хроматографії. При цьому спочатку використовують систему розчинників хлороформ:метанол:28% аміак (65:38:8, о/о), а потім – бутанол:вода:льодяна оцтова кислота (6:1:1, о/о).

3.1.2. Газова хроматографія

Хроматографічні методи дослідження мембранних ліпідів є різноманітними. Протягом тривалого часу використовувалися тонкошарова хроматографія, газова хроматографія та високо-ефективна рідинна хроматографія (high performance liquid chromatography, HPLC). Для ідентифікації та кількісного аналізу жирних кислот у складі мембранних ліпідів вельми популярною є капілярна газова хроматографія та комбінація газової хроматографії із мас-спектрометрією (Wewer, 2013).

Газова хроматографія дозволяє розділяти леткі речовини і базується на їхньому розподіленні між рухомою (газоподібною) і нерухомою (твердою або рідкою) фазами (Poole, 2012). У газо-адсорбційній хроматографії застосовують як тверду основу (нерухома фаза) силікагель або активоване вугілля, на якому відбувається адсорбція. За газорідинної хроматографії нерухомою є рідка фаза, а рухомою – газ, компоненти розділяються за спорідненістю до рідкої фази.

Залежно від агрегатного стану нерухомої фази розрізняють газово-адсорбційну хроматографію (нерухома фаза – тверде тіло) і газово-рідинну хроматографію (нерухома фаза – рідина, нанесена тонким шаром на твердий носій).

Розділення компонентів у газовій хроматографії базується на різниці швидкостей руху і розмиття концентраційних зон досліджуваних речовин, які рухаються у потоці газової фази відносно шару нерухомої, причому ці речовини мають бути розподілені між обома фазами. Газ-носії (повітря, N_2 , Ar, CO_2 та ін.) зазвичай повинен мати високу чутливість детектування. За допомогою газової хроматографії можна виконувати якісне та кількісне визначення компонентів сумішей будь-яких органічних і неорганічних газів, рідин, твердих тіл, тиск пари яких за температури колонки знаходиться в діапазоні 0,133–133,0 Па (0,001–1,0 мм. рт. ст.). Сполуки, які не підпадають під ці вимоги, перетворюються на леткі речовини й аналізуються.

Прилад, який здійснює розділення, називається газовим хроматографом (рис. 3.4).

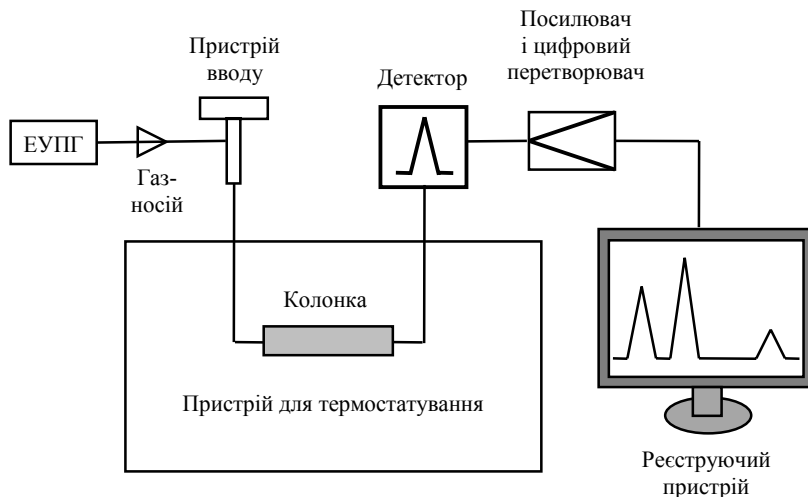


Рис. 3.4. Схема будови газового хроматографа:
ЕУПГ – система "електронного керування потоками газів"

Певна кількість аналізованої суміші (у газоподібному та рідкому стані) вводиться у хроматограф за допомогою пристрою введення. Для введення суміші використовується мікрошприц або газовий кран-дозатор. У пристрої рідкі проби випарюються і надходять у хроматографічну колонку. У ній здійснюється розділення суміші на окремі компоненти. Під час розділення одночасно проходять процеси сорбції-десорбції речовин між рухомою та нерухомою фазами. При цьому сполуки, які слабко сорбуються нерухомою фазою, будуть просуватися по колонці з більшою швидкістю, і навпаки. Із колонки розділені компоненти суміші разом з газом-носієм потрапляють у детектор, який реєструє речовини, що відрізняються від газу-носія за фізичними чи фізико-хімічними властивостями, і перетворює їх на електричний сигнал. Далі відбувається посилення чи перетворення сигналу в аналогову напругу з наступним перетворенням його в цифрову форму. Реєструючий пристрій (комп'ютер) буде графік залежності сигналу детектора від часу. Цей графік називається хроматограмою.

Формування, очищення і стабілізація потоку газу-носія та допоміжних газів, необхідних для живлення детектора, здійснюється системою підготовки газів. Вона називається "електронне керування потоками газів" (ЕУПГ). Температурні режими пристрою введення, колонки й детектора підтримуються за допомогою відповідних термостатів, які входять до складу системи термостатування. Вона містить також датчики вимірювання температури, нагрівачі, терморегулятори та системи перемішування повітря або охолодження.

Газова хроматографія дозволяє визначити з високою точністю жирнокислотний склад мембранних ліпідів (рис. 3.5). Її зазвичай поєднують із мас-спектрометрією. При розділенні жирних кислот мембранних ліпідів їх попередньо модифікують з утворенням метилових ефірів, оскільки вони довше утримуються на колонці, що перешкоджає їхньому ефективному розділенню.

3.2. ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ

Мембранні ліпідні смуги, або стріпи (англ., Membrane Lipid Strips) – гідрофобні мембрани розміром 2×6 см, придатні для визначення 100 пмоль 15 різних біологічно важливих ліпідів, присутніх у клітинних мембранах. Вони використовуються для того, щоб з'ясувати, як досліджуваний білок взаємодіє з одним чи декількома ліпідами. Зв'язані білки визначають за допомогою антитіл проти цих білків. Створено цілий ряд таких мембран, які широко використовуються для вивчення білок-ліпідних взаємодій за участю білків, компонентів клітинних сигнальних систем. Наприклад, за допомогою фосфатидилінозитолфосфатних мембранних стріпів (PIP Strips™ Membranes) виявляють білки, котрі містять фосфоінозитидзв'язувальні домени, і досліджують їхню взаємодію з відповідними ліпідами – фосфоінозитидами. Білки ідентифікують Western-блотингом за допомогою систем детекції на базі лужної фосфатази і пероксидази хрому.

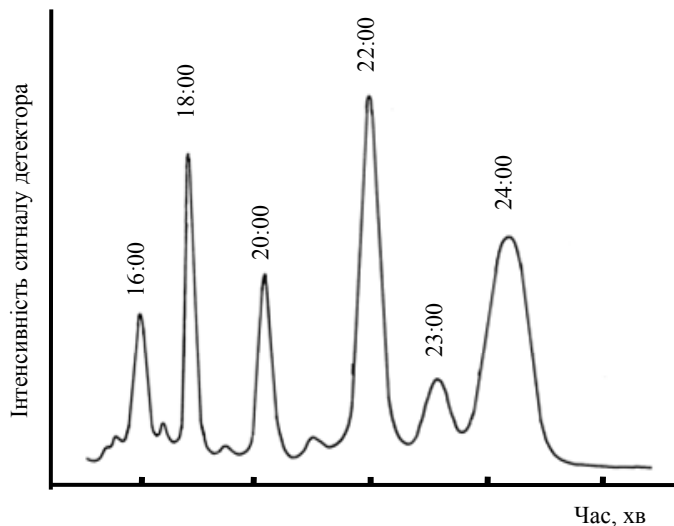


Рис. 3.5. Хроматограма жирних кислот глюкоцереброзидів (газова хроматографія)

3.3. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ МЕМБРАННИХ РАФТІВ

Для вивчення структурної організації мембранних рафтів створено цілий ряд методів виділення цих структур. Найчастіше використовується метод, який базується на використанні детергентів (Peter, 2010).

Екстрагування клітин холодними неіонними детергентами або лужними карбонатами дозволяє отримати мембранну фракцію, яку можна відокремити центрифугуванням у градієнті густини сахарози. Ці мембранні рафти залучені до сортування білків і, ймовірно, координують процеси сигнальної трансдукції.

Мембрану обробляють тритоном X-100 при +4 °С, після чого виділяють так звану детергент-резистентну фракцію центрифугуванням на градієнті густини сахарози. Таким чином реконструюють вихідну мембрану. Проте виявилось, що при отриманій

мембрані холестерол і глікосфінголіпіди перегруповуються у нові структури, які не існували в батьківській мембрані.

Детергенти холат натрію, CHAPS, твін-20, луброл WX та тритон X-110 використовують для одержання детергент-резистентної фракції, однак після оброблення мембран тритоном X-100 при центрифугуванні у градієнті густини отримують більш відокремлені зони, які більшою мірою підлягають реконструкції та аналізу. Залишається дискусійним питання: чи є така детергент-резистентна фракція ідентичною за структурою функціональним доменам мембран живих клітин. По-перше, її ізолювання проводять за низьких температур протягом тривалого часу, а температура є головним фактором, що визначає динаміку ліпідів. Зниження температури нижче оптимальної приводить до утворення асоціатів між ліпідами та між ліпідами і білками, які не існують *in vivo* за фізіологічної температури. По-друге, можливо, за дії детергентів порушується білок-ліпідні асоціати, що існують у мембрані живої клітин, і утворюються нові. Проте існують дані, що деякі білки із абсолютно різних клітин виявляються у детергент-резистентній фракції. Вивчення структури такої фракції мембран із еритроцитів методом електронної мікроскопії заморожування-сколювання показало, що вихідна мембрана зазнає значних перебудов, викликаних тритоном X-100.

По-третє, продемонстровано, що цей детергент вибірково солюбілізує фосфоліпіди, присутні на цитоплазматичному боці клітинної мембрани, що сприяє злиттю під час виділення сфінголіпідів і збагачених на холестерол доменів.

Удосконалення методів отримання мембранних доменів полягало у використанні "м'яких" детергентів, наприклад Brij 98, який погано солюбілізує фосфоліпіди із мембран, злитті мембранних фрагментів із різних джерел з утворенням об'єднаних детергент-резистентних мембран, зміні мембранної асиметрії. Було виявлено, що успішне отримання таких фракцій залежить також від складу буферного середовища. Для стабілізації фазового стану фосфатидилетаноламіну і фосфатидилсерину, які переважають на цитоплазматичному боці мембрани, необхідна наявність інших іонів, ніж для цвітер-іонних полярних ліпідів. Іони кальцію шкідливо впливають на стабільність мембранних

фосфоліпідів, викликаючи розшарування фосфатидилетаноламіну та фосфатидилсерину на дві фази.

Існують інші методи отримання мембранних рафтів без використання детергентів. Вони базуються на ультразвуковому дезінтегруванні за низьких температур. Проте в даному випадку також можуть утворитися нові білок-ліпідні ансамблі. Витримування фібробластів за температури $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ приводить до збільшення розміру мембранних рафтів порівняно з нанокластерами, що існують у мембрані при $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$, та до перерозподілу маркерів цих рафтів.

Ефективний метод виділення із мембрани доменів, асоційованих з Т-клітинним рецептором, базується на інкубації лімфоцитів з гранулами, укритими антитілами до цього рецептора. Після абсорбції антигену на клітинних мембранах їх фрагментують, обробляючи азотом для утворення пор. Таким методом отримують рафти, що містять сигнальні комплекси, здатні зберігати свою цілісність під час механічних впливів.

Ліпідні мембранні рафти поряд з кавеолами формують мембранні комплекси подібного складу, які забезпечують швидку й ефективну трансдукцію сигналу, взаємодіючи з великою кількістю сигнальних молекул. Для їхньої ідентифікації, виділення та розділення створено цілий ряд методів. Найчастіше використовуються детергентні й недетергентні методи фракціонування на градієнті густини сахарози. Для солюбілізації мембран і відокремлення ліпідних рафтів від кавеоларних доменів застосовують такі неіонні детергенти, як NP-40, октилглюкозид, CHAPS, луброл. У випадку недетергентного фракціонування клітини руйнують ультразвуком, при цьому критичною є сила впливу цього фактора. Кожну фракцію, отриману на градієнті густини сахарози, ретельно аналізують на наявність маркерів клітинних органел, які можуть забруднювати отримані плавучі фракції. Також фракції аналізують методом імуноблотингу на присутність ізоформ білка кавеоліну.

Кавеоларні домени відокремлюють від мембранних рафтів за допомогою імунологічних методів. Візуалізацію мембранних рафтів і кавеол здійснюють за допомогою атомно-силової мікроскопії (Henderson, 2004). Використання світлової мікроскопії,

включаючи флуоресцентну, є обмеженим, оскільки розмір цих структур (50–100 нм) менший за поріг визначення цього методу. Однак, для з'ясування локалізації кавеол ефективною є лазерна сканувальна конфокальна мікроскопія (принцип описано в підрозд. 1.3), тому що вона дає можливість аналізувати колокалізацію двох білків у мембрані. Використовуючи антитіла, мічені флуоресцентними мітками методом FRET (описано в підрозд. 1.6.3), можна вивчати взаємодію мембранних рафтів і кавеол.

Для вивчення функцій кавеол і мембранних рафтів використовують β -циклодекстрин, який порушує їхнє функціонування. Не проникаючи у клітину, він зв'язується з холестеролом і порушує їхнє функціонування. Аналогічну дію має полієновий антибіотик і стеролозв'язувальний агент філіпін (filipin).

3.4. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСІВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН

Пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) мембран – окисна деградація ліпідів, ініційована вільними радикалами (наприклад, супероксид-аніоном кисню) (Yin, 2011). Під час реакцій біологічного окиснення у клітинах утворюються вільні радикали, які мають на зовнішній валентній орбіталі неспарений електрон. До активних форм кисню відносять: OH^\bullet – гідроксильний радикал, – супероксидний аніон, H_2O_2 – пероксид водню. Вони мають високу хімічну активність і вступають у реакцію з ненасиченими жирними кислотами ліпідів мембран, порушуючи їхню структуру.

Пероксидне окиснення мембранних фосfolіпідів є одним із найпоширеніших механізмів деструкції мембранних структур (Catalá, 2012). Активні форми кисню та різні форми пероксидів утворюються у плазматичних і ядерних мембранах, пероксисомах та лізосомах, цитозолі. Їхній вміст регулюється роботою ферментативних і неферментативних систем (Болдырев, 2006). Ліпопероксиди необхідні для нормального функціонування клітинних мембран.

Основними процесами ПОЛ є активація і деградація радикалів жирних кислот ліпідів, вбудовування у ліпіди попереднього активованого молекулярного кисню, реорганізація подвійних зв'язків у спряжених подвійних зв'язках. Результатом цього є деструкція мембранних ліпідів і самих біомембран. ПОЛ відбувається як у тварин, так і в рослинних тканинах. Кінцевими продуктами ПОЛ є ліпідні гідропероксида, тому цей процес і називається пероксидним окисненням ліпідів. У числі продуктів ПОЛ є малоновий діальдегід, 4-гідроксиноненаль і коротколанцюгові леткі вуглеводні:

- R^\bullet – вільний радикал жирної кислоти;
- $R-O-O^\bullet$ – пероксидіон жирної кислоти;
- $R-O-OH$ – гідропероксид жирної кислоти;
- $HC=O-CH_2-C=OH$ – малоновий діальдегід;
- $R-CH=CH-CH_2-CH=CH_2$ – дієнові кон'югати.

Під час атаки поліненасиченої жирної кислоти у складі ліпиду молекулярним киснем утворюється пероксидний радикал (рис. 3.6). Він може взаємодіяти з іншою молекулою ліпиду та руйнувати її з утворенням нового ліпідного радикала. Одним із продуктів цієї реакції є гідропероксид ліпиду, порівняно стійка сполука (Yin, 2011). Із пероксидного радикала може також утворюватися ендпероксидний радикал ліпиду. При його розпаді утворюється цілий ряд продуктів, у тому числі малоновий діальдегід. Різні молекулярні продукти є маркерами окиснення ліпідів (рис. 3.7).

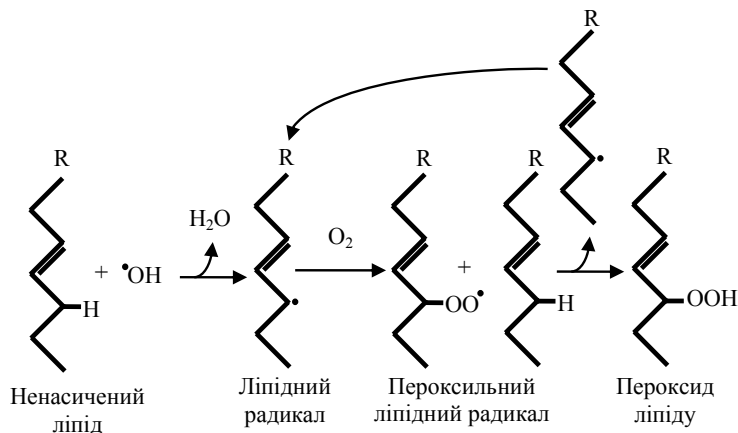


Рис. 3.6. Схема реакцій пероксидного окиснення ліпідів

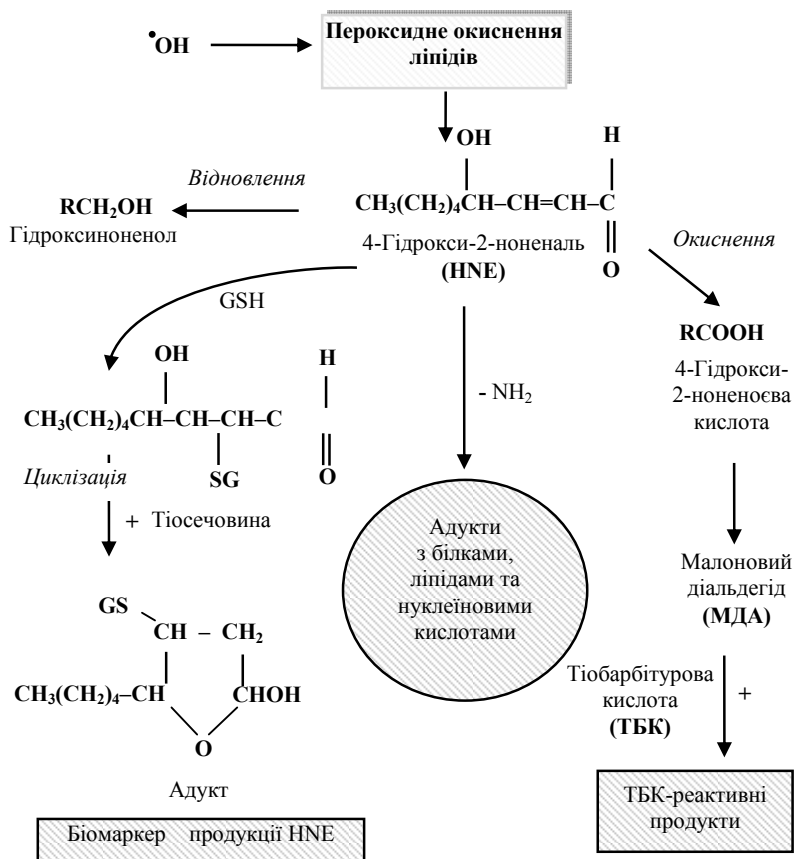


Рис. 3.7. Сполуки – маркери пероксидного окиснення ліпідів

F₂-Ізопростани є важливими маркерами ПОЛ, вони утворюються в результаті неферментативного окиснення арахідонової кислоти, що приводить до розвитку оксидативного стресу.

Чим більше подвійних зв'язків міститься у жирній кислоті, тим більшою є їхня здатність вступати в реакції переокиснення. Іони Fe²⁺ та аскорбінова кислота найефективніше прискорюють ПОЛ.

Активація процесів ПОЛ, незалежно від факторів індукції, може спричинити деструктивні зміни у клітинах. Це пов'язано з накопиченням продуктів, здатних інактивувати мембранні ферменти, по-

рушувати білок-ліпідні взаємодії в мембранах, утворювати міжмолекулярні зшивки, змінювати в'язкість ліпідної фракції, що перешкоджає утворенню ферментосубстратного комплексу.

У клітинах існує багато ферментів, що здійснюють реконструкцію пошкоджених або змінених під впливом АФК складових елементів мембрани. Фосфоліпази видаляють із мембрани пошкоджені фосфоліпіди, що дозволяє зберегти її динамічну цілісність. Оскільки окиснені фосфоліпіди є переважним субстратом мембранної фосфоліпази А₂, ніж нативні, ПОЛ стимулює активність цього ферменту. Це має важливе фізіологічне значення для процесів репарації та детоксикації мембран.

Ліпопероксидази у клітині утворюються внаслідок двох процесів: неферментативного вільнорадикального окиснення, яке відбувається за ланцюговим механізмом, та ферментативного аутоокиснення. У першому випадку поліненасичені жирні кислоти підлягають аутоокисненню, що ініціюється первинними вільним радикалами. Вільнорадикальні реакції ініціюються активними формами кисню: супероксидним аніон-радикалом $O_2^{\bullet-}$, синглетним киснем O_2^{\bullet} , гідроксильним радикалом OH^{\bullet} .

Існує велика кількість методів дослідження процесів ПОЛ. Методи визначення його маркерів (ТБК-активних продуктів, основ Шиффа й дієнових кон'югатів, а також активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази) розроблено багато років тому, сьогодні вони вдосконалюються і широко використовуються.

Сучасними методами дослідження ПОЛ є аналіз оксистеролів, F(2)-ізопростанів і окиснених фосфоліпідів за допомогою газової та рідинної хроматографії, мас-спектрометрії, а також визначення 4-гідрокисноненалю імунними методами (Spickett, 2010). У результаті співробітництва 15 лабораторій було розроблено метод визначення продуктів ПОЛ (малонового діальдегіду, 4-гідрокисноненалю) методом HPLC у плазмі крові людей, опроміненої ультрафіолетовим світлом у різних дозах.

Ранні методи дослідження процесів ПОЛ базувались на колориметричному визначенні продуктів реакції гідропероксидів або малонового діальдегіду з хімічними реагентами з утворенням хромофорів. Спочатку ці методи розроблялися для аналізу

продуктів ПОЛ у їжі, потім вони були модифіковані для біологічних і біомедичних аналізів. Реакція тіобарбітурової кислоти з малоновим діальдегідом була описана в 1944 р. дослідниками Кохом і Ліверседжем (Kohn, Liversedge). Відтоді метод, розроблений на її основі, став одним із найпопулярнішим у дослідженні ПОЛ. Зникнення подвійних зв'язків, яке відбувається за реакції ПОЛ, можна оцінити методом визначення йодного числа (грами I₂, який адсорбується 1 г жиру × 100) або визначити методом HPLC. Існує декілька методів визначення гідропероксидів, які базуються, наприклад, на їхній здатності окиснювати йодиди до йоду або сполуки, які містять залізо (II), до заліза (III), що визначається спектрофотометрично за довжини хвилі 234 нм (Spickett, 2010). Також розроблено метод визначення дієнових кон'югатів, які утворюються під час ПОЛ із поліненасичених жирних кислот після відщеплення від них водню. Більшість цих методів сьогодні широко використовується, але й створено багато нових аналітичних методів оцінювання продуктів ПОЛ; паралельно з цим розширюються список сполук, які утворюються під час цього процесу. Деякі методи визначення класів продуктів ПОЛ, таких як карбоніли і гідропероксиди, є неспецифічними і можуть виявити відразу декілька продуктів.

Найбільш інформативним, хоча й досить технічно складним методом є мас-спектрометрія, яку поєднують з газовою і рідиною хроматографією. Цей підхід дозволяє ідентифікувати компоненти зразка згідно з їхньою масою і картиною фрагментації, а також за часом утримання.

Мас-спектрометрія (мас-спектральний аналіз) – метод дослідження речовини шляхом визначення відношення маси до заряду (якості) і кількості заряджених частинок, що утворюються при тому чи іншому процесі впливу на речовину. На відміну від оптичних і рентгенівських методів, мас-спектрометрія визначає не випромінювання чи поглинання енергії молекулами або атомами, а самі частинки речовини. Мас-спектр являє собою залежність інтенсивності іонного струму (кількості) від відношення маси до заряду (якості). Атоми хімічних елементів мають специфічну масу, тому точне визначення маси аналізованої молекули дозволяє визначити її елементний склад.

Для проведення газової хроматографії необхідні леткі реагенти, у більшості випадків її проведення вимагає застосування триметилсилілових агентів. Рідинна хроматографія не потребує летких сполук, реагенти можна іонізувати і піддавати електро-розпиленню з наступним застосуванням мас-спектрометрії. Перевагою мас-спектрометрії для аналізу продуктів ПОЛ є те, що цей метод не залежить від природи функціональних груп та їхньої реактивності. Поєднання газової хроматографії та мас-спектрометрії застосовується для аналізу й інших продуктів окиснення жирних кислот, гідроксिनореналю, тоді як рідинна хроматографія у комбінації з мас-спектрометрією застосовується для продуктів окиснення фосфоліпідів, F₂-ізопростанів і аддуктів альдегід-білок (Spickett, 2010).

3.4.1. Визначення вмісту гідроксильного радикала

Гідроксильний радикал – це короткоживучий радикал •ОН з високою реакційною здатністю, який належить до реактивних форм кисню і є компонентом оксидативного стресу. У клітині він утворюється з пероксиду водню за присутності перехідного металу, такого як залізо. •ОН радикал має короткий час життя, і тому не знешкоджується жодним антиоксидантним ферментом. З ним може реагувати лише глутатіон. Утворений •ОН радикал дуже швидко реагує з будь-якою молекулою, окиснюючи її. Зокрема, він ініціює процеси ПОЛ.

Уміст гідроксильного радикала (•ОН-радикала) визначають за методом (Steiner, 1990), який базується на взаємодії гідроксильних радикалів з диметилсульфоксидом (CH₃–SO–CH₃), у результаті якої утворюється метансульфінова кислота (CH₃–SOOH) і метильний радикал (CH₃•). Кількість продукту реакції – метансульфінової кислоти, що відображає кількість ОН-радикалів, визначається за допомогою колориметричного методу.

При визначенні •ОН-радикала у клітинах тварин, їм за 30 хв до декапітації вводять внутрішньочеревно 1 М диметилсульфоксид, який є ловцем ОН-радикалів. У таких концентраціях ця

сполука швидко абсорбується і розподіляється в усіх тканинах. Змішують гомогенат клітин, додають бутанол, насичений H_2SO_4 , і вортексують. Верхню бутанольну фазу переносять в ацетатний буфер для розділення на дві фази. Нижню водну фазу переносять у пробірку, що містить Fast Blue BB Salt (4-аміно-2,5-діетоксибензаналід діазотована подвійна сіль цинку, 4-бензоїламіно-2,5-діетоксибензендіазолін геміцинк хлорид) та інкубують за кімнатної температури у темряві. Додають суміш толуен:бутанол (1:1), вортексують. Верхню фазу промивають сумішшю бутанол:вода у співвідношенні 1:1 для видалення залишків діазонієвої солі, які не прореагували. Центрифугують, верхню фазу переносять у кювету і додають піридин для стійкості забарвлення. Вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 420 нм відносно чистого бутанолу. Вміст ОН-радикала визначають за калібрувальною кривою (як стандарт використовують 10–300 мкМ розчини бензенсульфінової кислоти) і виражають у нмоль/мг білка.

3.4.2. Виявлення пероксильних радикалів і гідропероксидів

Первинними продуктами ПОЛ є нестабільні ліпідні сполуки. Єдиним методом визначення пероксильних радикалів є електронний парамагнітний резонанс, або ЕПР (electron spin resonance, ESR), у якому неспарені електрони генерують спіновий сигнал. Оскільки пероксильні радикали є нестабільними, вони реагують зі спіновими мітками і стабілізують їх, унаслідок чого генерується типовий ЕПР спектр, який залежить від виду радикала (Holley, 1993). Недоліком методу є його низька чутливість, а також те, що він потребує стаціонарних концентрацій вільних радикалів у межах мікромолів. Цей метод успішно застосовується *in vitro*: за його допомогою було ідентифіковано алкоксильні радикали, які утворюються із пероксильних. Цей метод важко застосовувати для визначення продуктів ПОЛ *in vivo*, хоча є дані про його використання для їхніх аналізів у тканинах, а також у клініці.

Ліпопероксиди також відносять до ранніх продуктів ПОЛ, визначення їх здійснюється за допомогою декількох методів. Одним із найстаріших методів є йодометричний. Як було каза-

но вище, результатом окиснення йодидів за їхньої взаємодії з гідропероксидами є утворення йоду. Його кількість можна обчислити різними способами – титруванням тіосульфатом натрію, за реакцією утворення трийодидів (I_3^-) тощо.

Ліпопероксида можна визначити за допомогою HPLC або методами хемілюмінесценції, перевагою яких є те, що класи ліпідів можуть бути розділені з використанням звичайної фазової хроматографічної системи (Miyazawa, 1994). Відокремлення гідропероксидів від інших сполук, наприклад антиоксидантів, здійснюють методом екстракції за Фолчем. Цей підхід також комбінують з HPLC (як для очищення, так і для аналізу). З його використанням неокиснені ліпіди відокремлюють від ліпідних гідропероксидів. Елюент змішують з люмінолом або ізолумінолом, який окиснюється гідропероксидами у присутності пероксидази, що супроводжується емісією світла. Цей метод надзвичайно чутливий, він дозволяє визначити пікомолярні концентрації матеріалу.

3.4.3. Виявлення вільних альдегідів (ТБК-активних продуктів)

Визначення малонового діальдегіду проводять з використанням тіобарбітурової кислоти (ТБК, англ. thiobarbituric acid) і називають (TBARS Assay). Цей метод було розроблено в 1944 р. дослідниками Кохом і Ліверсіджем (Kohn, 1944). Він базується на реакції МДА з ТБК у кислому середовищі за температури 95–100 °С, у результаті якої утворюється комплекс, що має рожеве забарвлення і поглинає за довжини хвилі 532 нм. Реакцію проводять таким чином. Біологічний зразок інкубують у буферному середовищі, яке містить сульфат заліза, аскорбінову кислоту, НАДН та АДФ. Реакцію зупиняють додаванням ТХО (контрольна проба); у проби для визначення вмісту ТБК-активних продуктів ТХО додається перед інкубацією. Білки осаджують центрифугуванням за швидкості 150 g, до супернатанту додають ТБК і кип'ятять для розвитку забарвлення. Після цього вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі за довжини хвилі 532 нм.

Вміст забарвленого рожевого комплексу також можна визначити, вимірюючи флуоресценцію за довжини випромінювання

світла 553 нм. При цьому визначають не тільки вміст вільного МДА, а також вміст ліпопероксидів, які утворюють цю сполуку при розпаді, що ініціюється іонами металів. Тому до складу реагентів входять іони металів, найчастіше Fe^{3+} і Cu^{2+} . Слід ураховувати, що МДА, як і інші продукти ПОЛ, є високо реактивним і може реагувати з амінами (наприклад, залишками лізину у складі білків) з утворенням основ Шиффа. Проте в біологічних зразках з високим вмістом білка вміст вільного МДА може бути низьким, тому що аддукти основ Шиффа не реагують з ТБК, і продукт-хромофор, який можна виміряти за допомогою методу TBARS, не утворюється. Головною проблемою цього методу є відсутність специфічності. ТБК реагує з великою кількістю альдегідів, які продукуються не тільки під час ПОЛ (глюкозою, дезоксирибозою, аскорбіновою кислотою) а також із амінокислотами гомоцистеїном, проліном, аргініном і глутаматом. Через це застосування цього методу для аналізу біологічних рідин є проблематичним. Тому сполуки, які визначають за допомогою TBARS Assay і які називаються ТБК-активними продуктами, найчастіше вважаються еквівалентами МДА. Комплекси, що є структурно різними, можна відокремити методом обернено фазової HPLC.

3.4.4. Визначення основ Шиффа та дієнових кон'югатів

У процесі пероксидного окиснення на стадії утворення вільних радикалів у молекулах поліненасичених вищих жирних кислот виникає система спряження подвійних зв'язків, що супроводжується виникненням нового максимуму у спектрі поглинання – $\lambda_{\text{макс}} = 233$ нм (Костюк, 1984). На цій властивості ґрунтується метод визначення основ Шиффа та дієнових кон'югатів. Спочатку проводять екстракцію, гомогенізуючи зразок із додаванням екстрагувальної суміші (гептан та ізопропіловий спирт у співвідношенні 1:1). Після цього суспензію центрифугують, вортексують надосадову рідину, досягаючи розділення фаз гептану та ізопропілового спирту. У гептановій фазі визначають вміст основ Шиффа на флуориметрі за довжини хвилі $\lambda_{\text{збуд}} = 360$ нм і $\lambda_{\text{скан}} = 420$ нм. Як контроль використовують верхню гептанову

фазу екстрагувальної суміші без білка. Для визначення дієнових кон'югатів із пробірок, у яких визначають основи Шиффа, відбирають екстрагувальну суміш і додають 96% етиловий спирт. Вортексують та вимірюють оптичну густина на спектрофотометрі за довжини хвилі $\lambda = 233$ нм. Як оптичний контроль використовують гептанову фазу екстрагувальної суміші без білка з додаванням до неї 96% етилового спирту у співвідношенні 1 : 5.

3.4.5. Визначення F(2)-ізопростанів

Важливим кроком дослідження продуктів ПОЛ стала розробка методів аналізу F₂-ізопростанів. Ці сполуки вперше були описані в 1990 р. дослідниками Л. Робертсом і Дж. Морроу (L. J. Roberts, J. D. Morrow) (Morrow, 1990). F₂-ізопростани є простагландиноподібними сполуками, які утворюються під час неферментативного пероксидного окиснення арахідонової кислоти, ініційованого вільними радикалами (рис. 3.8). Ці некласичні ейкозаноїди проявляють потужну біологічну активність як медіатори запалення, що посилюють сприйняття болю. Вони є маркерами ПОЛ та оксидативного стресу.

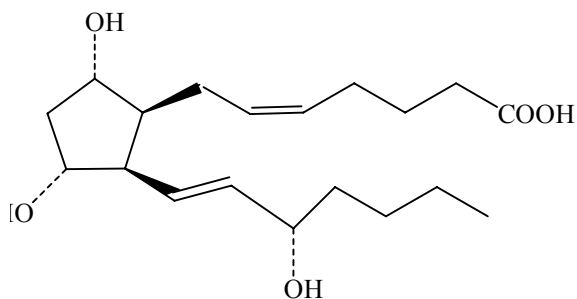


Рис. 3.8. Структурна формула одного з F₂-ізопростанів

F₂-ізопростани синтезуються шляхом алільного вивільнення водню від арахідонової кислоти, при цьому утворюється арахідонільний радикал. Він взаємодіє з киснем, потім відбувається ендоциклізація з утворенням біциклічного ендопероксиду, який взаємодіє з другою молекулою кисню. У результаті радикальної атаки на атоми C7, C10 і C13 утворюються чотири субродини,

які позначаються як 5-, 8-, 12- і 15-ізомери і відрізняються розміщенням ОН-груп біля атома карбону.

F₂-ізопростани – специфічні стабільні продукти ПОЛ. Хоча вони є мінорними компонентами, при оксидативному стресі їхній рівень може зростати більш ніж у 100 разів. Вони також пов'язані з виникненням багатьох хвороб, крім того, їхній рівень модулюється антиоксидантним статусом.

Одним із перших запропонованих методів визначення F₂-ізопростанів була газова хроматографія, мас-спектрометрія (Morrow, 1990). Процедура аналізу цих сполук включає такі етапи: екстракцію, хроматографічне розділення шляхом твердофазової екстракції, HPLC, афінної та тонкошарової хроматографії з наступним визначенням: а) газовою хроматографією – мас-спектрометрією або б) рідинною хроматографією – мас-спектрометрією чи в) імунологічними методами.

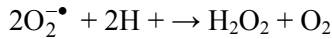
Було запропоновано також метод вимірювання кількості F₂-ізопростанів у біологічних рідинах і тканинах шляхом газової хроматографії та мас-спектрометрії (Milne, 2007). Отримання F₂-ізопростанів здійснювалося твердофазовою екстракцією з використанням сорбенту silica-Sep-Pak, очищали методом тонкошарової хроматографії, а потім отримували триметилсилілові похідні цих сполук, які аналізували газовою хроматографією та мас-спектрометрією.

3.4.6. Визначення активності антиоксидантних ферментів

Рівень ПОЛ у нормі контролюється цілим рядом антиоксидантних сполук і ферментів. Вони пригнічують вільнорадикальне окиснення. До антиоксидантів належать природні або синтетичні сполуки, зокрема аскорбінова кислота (вітамін С), токоферол (вітамін Е), β-каротин (провітамін А), лікопін, убіхінон (коензим Q), поліфеноли (флавоноїди, таніни, антоціани) (Оковитий, 2009).

Антиоксидантні ферменти – це супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза та глутатіонредуктаза, усі вони є гем-вмісними. Ці ферменти найактивніші в печінці, надниркових залозах і нирках, де вміст мітохондрій, цитохрому P₄₅₀ і пероксисом особливо великий.

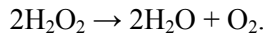
Супероксиддисмутаза (супероксид:супероксид-оксидоредуктаза, superoxide dismutase, КФ 1.15.1.1) (СОД) каталізує реакцію дисмутації супероксидних радикалів, вона перетворює супероксидні аніони на пероксид водню:



СОД представлена родиною металоферментів. Ізоферменти СОД знаходяться і в цитозолі, і в мітохондріях, вони є ніби першою лінією захисту, тому що супероксидний аніон утворюється зазвичай першим із активних форм кисню при витоку електронів із дихального ланцюга. Фізіологічною функцією СОД є захист клітин від пошкодження вільними радикалами.

У нормі супероксиддисмутази підтримують стаціонарну концентрацію супероксидних радикалів на певному рівні, захищаючи тим самим клітинні структури від пошкоджувальної дії як самих радикалів $\text{O}_2^{\bullet-}$, так і від появи гідроксильних радикалів, які можуть утворюватися з $\text{O}_2^{\bullet-}$ і OH^{\bullet} . СОД є індукованим ферментом: при активації пероксидного окиснення його синтез посилюється.

Каталаза ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$ -оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6) – гем-вмісний фермент класу оксидоредуктаз. Вона руйнує пероксид водню, який може ініціювати утворення найактивнішої форми OH^{\bullet} :

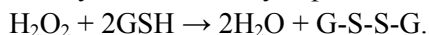


Каталаза знаходиться переважно в пероксисомах, де утворюється найбільша кількість пероксиду водню, а також у лейкоцитах, де вона захищає клітини від наслідків "респіраторного вибуху".

Активність каталази в еритроцитах залишається постійною при ряді захворювань, однак при злов'язній та інших макроцитарних анеміях збільшується так званий каталазний індекс (відношення величини каталазної активності певного об'єму крові до кількості еритроцитів у цьому об'ємі), що має істотне діагностичне значення.

Глутатіонпероксидаза (КФ 1.11.1.9) – найважливіший фермент, що забезпечує інактивацію активних форм кисню, який захищає організм від окисного пошкодження. Вона каталізує відновлення пероксидів ліпідів у відповідні спирти і відновлення пероксиду водню до води. У відновлення пероксидів беруть участь трипептид глутатіону (γ -глутамілцістеїнілгліцин). Сульфгідрильна група глутатіону (GSH) є донором електронів, при

її окисненні утворюється окиснена форма глутатіону, в якій 2 молекули глутатіону пов'язані дисульфідним зв'язком:



Окиснений глутатіон відновлюється глутатіонредуктазою:



Глутатіонпероксидаза, яка відновлює гідропероксиди ліпідів у складі мембран, як кофермент використовує селен (необхідний мікроелемент їжі). За його нестачі активність антиоксидантного захисту знижується. Глутатіонпероксидаза знешкоджує не тільки H_2O_2 , а й різні органічні ліпідні пероксили, які утворюються у організмі під час активації ПОЛ (гідропероксиди лінолевої та ліноленової кислот, холестерин-7 β -гідропероксид). Глутатіонпероксидаза захищає від окисної атаки білки, ліпіди, НАДФН, НАДН, відновлює ліпідні пероксили. Нестача або інгібування глутатіонпероксидази стимулює ПОЛ.

Каталази і глутатіонпероксидази виконують приблизно однакову роль у відновленні H_2O_2 в печінці. Проте активність глутатіонпероксидази має значно більше значення: каталаза переважно міститься у пероксисомах, а глутатіонпероксидаза – у цитозолі й мітохондріях.

3.4.6.1. Визначення активності супероксиддисмутази

Метод Чеварі

Метод Чеварі та співавт. ґрунтується на здатності супероксиддисмутази конкурувати з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидні аніони, що утворюються в результаті аеробної взаємодії відновленої форми нікотинамідаденідинуклеотиду (НАДН) і феназинметасульфату (ФМС) (Чеварі, 1985). У результаті цієї реакції НСТ відновлюється з утворенням гідразинтетразолію. У присутності СОД відсоток відновлення НСТ зменшується.

Визначення полягає в наступному. До клітинного лізату додають фосфатний буфер, буфер, який містить НСТ, ФМС та ЕДТА. Вимірюють оптичну густину проб за довжини хвилі 540 нм на спектрофотометрі. Додають НАДН на трис-ЕДТА буфері, витримують проби при 30 °С, повторно визначають оптич-

ну густину через 10 хв за тих самих умов. Розраховують відсоток пригнічення ступеня відновлення НСТ у пробі. Активність ферменту визначають за калібрувальною кривою та виражають в умовних одиницях за хвилину на 1 мг білка.

Метод визначення за аутоокисненням адреналіну

Для вимірювання супероксиддисмутази також запропоновано метод, який базується на інгібуванні процесу аутоокиснення адреналіну (Сирота, 1999). Проводиться вимірювання оптичної густини розчину, зумовлену накопиченням проміжного продукту окиснення адреналіну, що має максимум поглинання за довжини хвилі 347 нм. Оскільки класичне вимірювання ферментативної активності за накопиченням продукту або зменшенням субстрату є ускладненим у випадку супероксиддисмутази, активність виражають в умовних одиницях (ум. од.) – це міра інтенсивності інгібування аутоокиснення адреналіну. За 1 ум. од. беруть кількість ферменту, що приводить до 50% інгібування утворення окисненої форми адреналіну. Змішують карбонатний буфер, біологічний зразок і розчин адреналіну й вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 347 нм протягом 3–5 хв. Активність СОД виражають в ум. од.·(хв·мг білка)⁻¹.

3.4.6.2. Визначення активності каталази

Існує багато методів визначення активності каталази: манометричний або полярографічний методи (базуються на ресстрації O₂, що утворюється у процесі реакції), спектрофотометричний (оснований на вимірюванні поточної концентрації пероксиду водню), перманганатометричний і йодометричний методи (базується на вимірюванні залишкової концентрації пероксиду водню).

Принцип описаного методу визначення активності каталази ґрунтується на здатності пероксиду водню утворювати із солями молібдену стійкий забарвлений комплекс (Короліук, 1988).

До біологічного зразка додають розчин пероксиду водню, зупиняють реакцію додаванням молібдату амонію. Вимірюють інтенсивність забарвлення на спектрофотометрі за довжини хвилі = 410 нм проти контролю, який замість пероксиду водню містить дистильовану воду.

3.4.6.3. Визначення активності глутатіонпероксидази

Глутатіонпероксидази – родина ферментів, які захищають організм від окисного пошкодження. Вони каталізують реакцію відновлення пероксидів ліпідів до відповідних спиртів та відновлення пероксиду водню до води.

Активність глутатіонпероксидази визначають за накопиченням окисненого глутатіону (GSSG) (Власова, 1990). До реакційної суміші, що містить фосфатного буфер і ЕДТА, додають клітинний лізат і відновлений глутатіон. Реакцію запускають додаванням пероксиду водню, зупиняють додаванням ТХО. Центрифугують і вимірюють оптичну густину (поглинання окисненого глутатіону) за довжини хвилі 260 нм.

3.4.6.4. Визначення активності глутатіон-S-трансферази

Глутатіон-S-трансфераза (GST) – родина багатофункціональних ферментів, які захищають клітину від дії генотоксичних факторів і апоптозу. Вони каталізують кон'югацію різних ксенобіотиків з відщепленням глутатіону.

Метод визначення GST базується на утворенні оптично активного кон'югату в результаті перетворення відновленого глутатіону (GSH) за дії глутатіон-S-трансферази. Такий кон'югат утворюється при взаємодії толової групи глутатіону з 1-хлоро-2,4-динітробензолом (ХДНБ), що приводить до зростання поглинання за довжини хвилі 340 нм. Величина оптичної густини пропорційна активності ферменту.

Змішують фосфатний буфер, відновлений глутатіон, лізат клітин, ХДНБ, інкубують і вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 340 нм. Активність ферменту визначають за накопиченням оптично активного кон'югату і виражають у наномолях останнього на 1 мг білка за 1 хв. Метод придатний для визначення активності GST у клітинних лізатах, гомогенатах тканин, плазмі крові та лізаті еритроцитів.

Контрольні запитання

1. Перерахуйте методи, які використовуються для дослідження мембранних ліпідів.
2. За допомогою яких розчинників здійснюють екстракцію мембранних ліпідів?
3. Яким чином проводять ідентифікацію ліпідів після проведення тонкошарової хроматографії?
4. У чому полягає метод Фолча?
5. Яким чином визначають фосфоліпіди в мембранних препаратах?
6. Для чого при виявленні фосфоліпідів на хроматограмах використовують розчин фосфорномолібденової кислоти?
7. Яким чином на хроматограмах виявляють гангліозиди?
8. Який сорбент зазвичай використовують для виявлення інозитолфосфатів методом колонкової хроматографії?
9. У чому полягає принцип визначення вмісту жирних кислот у фракції ліпідів мембран методом газорідної хроматографії?
10. Назвіть методи дослідження процесів ПОЛ, які були розроблені найпершими?
11. Яка специфічність колориметричного визначення продуктів ПОЛ?
12. Який зміст TBARS Assay?
13. Назвіть переваги дослідження ПОЛ за допомогою мас-спектрометрії?
14. Яким чином аналізують F2-ізопростани?
15. Який принцип визначення основ Шиффа?
16. На чому базуються методи визначення активності супероксиддисмутази?
17. Які існують методи визначення активності каталази?
18. За якою сполукою визначають активність глутатіонпероксидази?
19. З якою метою при визначенні активності глутатіон-S-трансферази використовують 1-Cl-2,4-динітробензол?
20. З якою метою при визначенні гідроксильного радикала використовують диметилсульфоксид?

Список літератури

Catalá A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions / A. Catalá // *Chem. Phys. Lipids.* – 2009. – Vol. 157, № 1. – P. 1–11.

Chen Y. Cold induces micro- and nano-scale reorganization of lipid raft markers at mounds of T-cell membrane fluctuations / Y. Chen, J. Qin, J. Cai // *PLoS One.* – 2009.– Vol. 4, № 4. – P. 5386–5394.

Lingwood D. Detergent resistance as a tool in membrane research / D. Lingwood, K. Simons // *Nat. Protoc.* – 2007. – Vol. 2, № 9. – P. 2159–2165.

Locke D. Lipid rafts prepared by different methods contain different connexin channels, but gap junctions are not lipid rafts / D. Locke, J. Liu, A. L. Harris // *Biochemistry.* – 2005. – Vol. 44, № 39. – P. 13027–13042.

Michel F. Biomarkers of lipid peroxidation: analytical aspects / F. Michel, D. Bonnefont-Rousselot, E. Mas // *Ann. Biol. Clin. (Paris).* – 2008. – Vol. 66, № 6. – P. 605–620.

Nourooz-Zadeh J. Key issues in F2-isoprostane analysis / J. Nourooz-Zadeh // *Biochem. Soc. Trans.* – 2008. – Vol. 36. – P. 1060–1065.

Oh P. Immunoisolation of caveolae with high affinity antibody binding to the oligomeric caveolin cage. Toward understanding the basis of purification / P. Oh, J. E. Schnitzer // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, № 33. – P. 23144–23154.

Quinn P. J. Structure and thermotropic phase behaviour of detergent-resistant membrane raft fractions isolated from human and ruminant erythrocytes / P. J. Quinn, C. Tessier, D. Rainteau // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – Vol. 1713, № 1. – P. 5–14.

Розділ 4

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ МЕМБРАННИХ БІЛКІВ

4.1. СОЛЮБІЛІЗАЦІЯ МЕМБРАННИХ БІЛКІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ДЕТЕРГЕНТІВ

Очищення й аналіз таких білків ставлять перед дослідниками цілу низку специфічних проблем, із якими вони зазвичай не стикаються, працюючи з розчинними білками. Мембранні білки, як правило, не розчиняються у воді й погано розчиняються в органічних розчинниках. Тому для їхньої солюбілізації та очищення доводиться застосовувати детергенти або інші речовини, які руйнують мембрану.

Мембранні білки поділяють на зовнішні (периферичні) і внутрішні (інтегральні) відповідно до тих методів, які застосовують для їхньої солюбілізації. Периферичні білки вдається солюбілізувати, майже не порушуючи цілісності мембрани, тоді як виділення інтегральних білків зазвичай потребує її руйнування. Вивчення хімічної природи білків ускладнено тим, що вони в мембрані перебувають у комплексі з ліпідами та вуглеводами, тому для дослідження таких білків застосовуються різні хімічні та фізичні методи.

Для виділення інтегральних мембранних білків існує багато спеціальних методів, проте більшість схем очищення ґрунтується на тих самих хроматографічних і гідродинамічних методиках, які використовують для розчинних білків. Це хроматографія на ДЕАЕ-целюлозі, сефарозі чи гідроксилапатиті, гель-фільтрація, центрифугування у градієнті густини сахарози та ін.

Оскільки виділення інтегральних білків здебільшого пов'язано з руйнуванням мембрани, у багатьох випадках слід упевнитися, що у процесі виділення та очищення білка його функціональна активність не була порушеною або втраченою. Для цього, зокрема, можна спробувати провести реконструкцію, тобто знову вбудувати очищений білок у мембрану. Функціональну активність деяких мембранних білків, таких як іонні канали або транспортні білки, можна охарактеризувати й виміряти тільки в реконструйованих мембранних системах. Для інших мембранних білків, які виконують функції ферментів і рецепторів, корисні відомості можна отримати, використовуючи солюбілізовані препарати.

Для очищення інтегральних мембранних білків і отримання їх у біохімічно активній формі необхідні детергенти, які дозволяють солюбілізувати білки й зберегти їх у розчині (Arnold, 2007). Для цього інтегральні білки необхідно екстрагувати з мембранного бішару та вмонтувати в детергентні міцели. Тепер для виділення таких білків застосовується ціла низка детергентів з різною хімічною структурою.

Детергенти – це амфіпатичні молекули, що містять полярні групи ("голівка") і довгий вуглеводневий гідрофобний ланцюг ("хвіст"). На відміну від повністю полярних чи неполярних молекул, амфіпатичні молекули виявляють унікальні властивості у воді. Їхні полярні групи утворюють водневі зв'язки з молекулами води, тоді як вуглеводневий ланцюг агрегує внаслідок гідрофобних взаємодій. Ці властивості дозволяють детергентам розчинятись у воді. У водний розчинах вони формують сферичні структури – *міцели*, кожна із яких містить кілька детергентних молекул. Унаслідок своєї амфіпатичної природи детергенти здатні солюбілізувати гідрофобні структури у воді. Залежно від своєї структури й концентрації у водному розчині детергенти можуть утворювати різні типи міцел.

Детергенти солюбілізують мембранні білки, копіюючи їхнє ліпідне двошарове оточення. Міцели, утворені за допомогою детергентів, є аналогічними бішарам, що формують біологічні мембрани. Білки вбудовуються в такі міцели за допомогою гідрофобних взаємодій.

Гідрофобні ділянки мембранних білків, які зазвичай вбудовані в мембранний ліпідний бішар, оточуються шарами детерге-

нтних молекул, їхні гідрофільні частини експонуються у водне середовище, що й сприяє утриманню мембранних білків у розчині. Повне видалення детергенту може привести до агрегації внаслідок утворення кластерів за рахунок гідрофобних ділянок і в результаті – до преципітації мембранних білків.

Хоча фосфоліпіди можуть використовуватися як детергенти у середовищі, що стимулює утворення бішару, вони формують великі структури – *везикули*, які важко ізолювати. Ліозофосфоліпіди утворюють міцели, подібні за розміром до детергентних, проте вони є надто дорогими для широкого використання в білковій біохімії, через що синтетичні детергенти є найзручнішими для виділення мембранних білків.

Розчинення мембран за допомогою детергентів можна розділити на кілька відмінних стадій (рис. 4.1). За низьких концентрацій детергенти зв'язуються з мембраною, деструктуруючи ліпідний бішар. За вищих концентрацій, коли бішари насичені детергентами, мембрана дезінтегрується з утворенням змішаних міцел, у яких гідрофобні ділянки мембранних білків оточені гідрофобними ланцюгами міцел.

На кінцевих стадіях солюбілізація мембран зумовлює формування змішаних міцел, які складаються із ліпідів, детергентів і детергентних міцел, що містять білки (зазвичай один білок на міцелу). Наприклад, солюбілізація мембран, які містили родопсин, дигітоніном приводила до утворення комплексів, до складу яких входила одна молекула родопсину на міцелу зі 180 молекул дигітоніну.

Інші комбінації міцел, що містять ліпіди, детергенти та комплекси ліпід-білок-детергент, є можливими при використанні проміжних концентрацій детергенту. Міцели, що містять комплекси білок-детергент, можна відокремити від інших міцел за їхнім зарядом, розміром і густиною.

Дуже важливим є правильний вибір детергенту, оскільки саме він руйнує біомембрану, заміщуючи ліпіди, що оточують ті чи інші білки, і визначає стабільність білка в розчині. Відповідні вимоги до детергентів і правил роботи з ними створюють додаткові проблеми, крім тих, із якими зазвичай стикаються при очищенні білків. Сьогодні не існує якогось одного детергенту або єдиного методу реконструкції, який би виявився придатним для всіх мембранних білків.

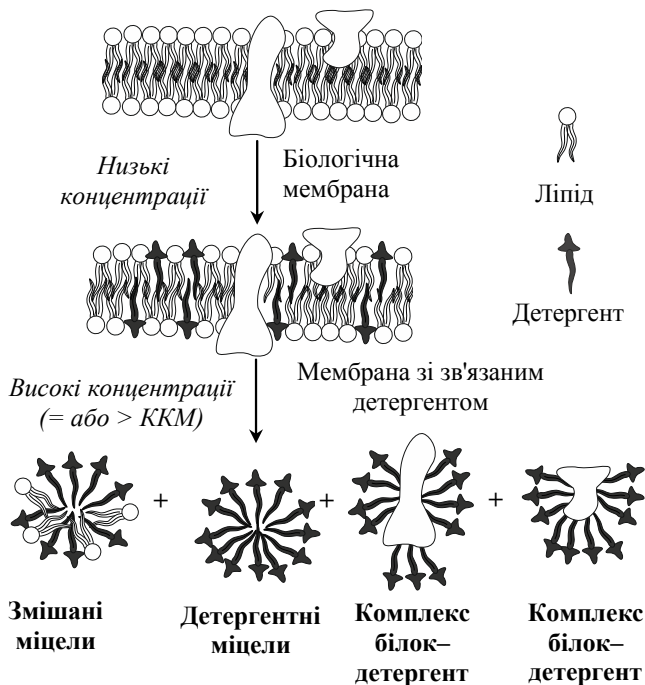
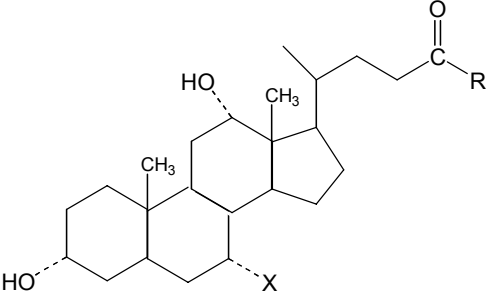


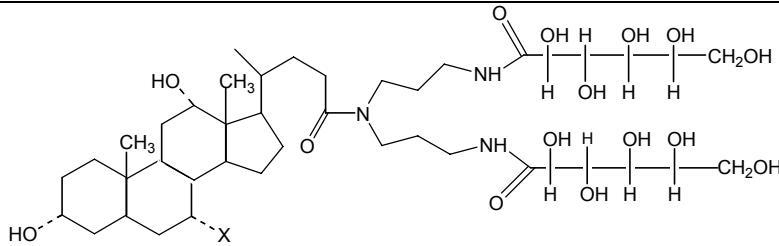
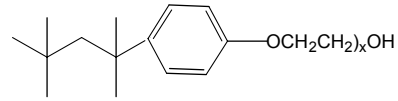
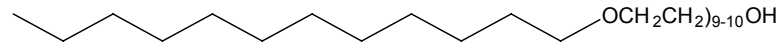

Рис. 4.1. Стадії солюбілізації біологічної мембрани за допомогою детергентів

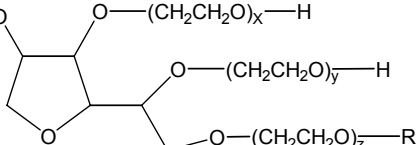
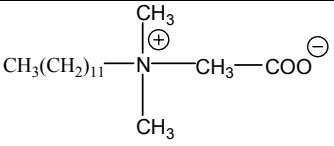
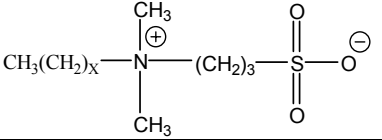
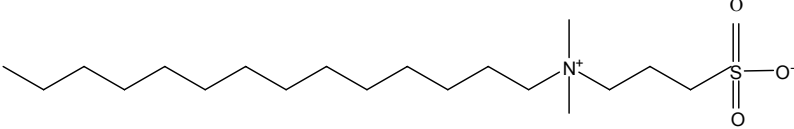
Нині існує багато детергентів з різними комбінаціями гідрофобних і гідрофільних груп. Їхня класифікація базується на природі групи гідрофільної "голівки". За цією класифікацією їх поділяють на іонні, неіонні та цвітер-іонні детергенти (Bhairi, 2001). У табл. 4.1. наведено найуживаніші детергенти. Наприклад, компанією Anatrace® High-Purity Detergents and Lipids, яка виробляє реагенти для дослідження мембранних білків, розроблено такі детергенти: ANAPOE®-X-100 (TRITON® X-100), CHAPS, ANAGRADE® (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate), n-DODECYL- β -D-MALTOPYRANOSIDE, ANAGRADE® (n-Dodecyl- β -D-maltoside), SODIUM CHOLATE, ANAGRADE® C₂₄H₃₉O₅Na, TRITON® X-100 (t-Oct-C₆H₄-(OCH₂CH₂)_xOH, x = 9-10) (www.anatrace.com).

Структурні формули та назви детергентів (Еванз, 1990; Bhairi, 2001)

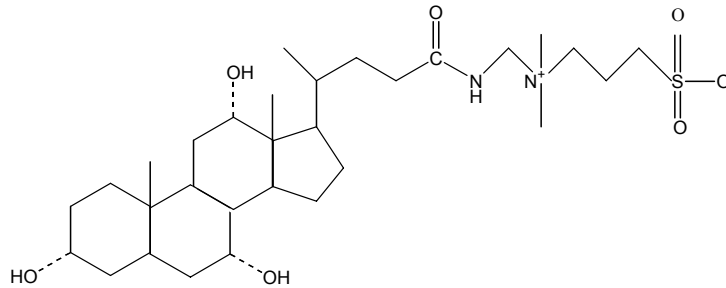
179

Найуживаніші детергенти	
$R-O-(CH_2)_x-CH_3$ <p>R = глюкоза $x = 8$ – <i>n</i>-ноніл-β-D-глюкопіранозид $x = 7$ – <i>n</i>-октил-β-D-глюкопіранозид</p>	$R-S-(CH_2)_x-CH_3$ <p>R = мальтоза $x = 11$ – додецил-β-D-мальтозид $x = 9$ – децил-β-D-мальтозид</p>
Алкільні глікозиди	
 <p>Солі жовчних кислот</p>	<p>$x = H$; R = ONa⁺ – дезоксихолат натрію (3α,12α-дигідрокси-5β-холаноат-24) $x = H$; R = NH-CH₂-CH₂-SO₃Na⁺ – тауродезоксихолат натрію $x = OH$, R = O⁻Na⁺ – холат натрію (3α,7α,12α-тригідрокси-5β-холаноат-24)</p>
$CH_3(CH_2)_x-C(=O)-N(CH_3)-CH_2-\underset{\begin{array}{c} \\ OH \\ \\ H \end{array}}{C}-\underset{\begin{array}{c} \\ H \\ \\ OH \end{array}}{C}-\underset{\begin{array}{c} \\ OH \\ \\ H \end{array}}{C}-\underset{\begin{array}{c} \\ OH \\ \\ H \end{array}}{C}-OH$	<p>$x = 8$ – MEGA-10 $x = 7$ – MEGA-9 $x = 6$ – MEGA-8</p>

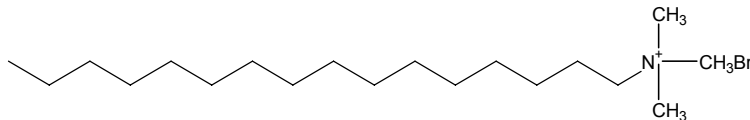
Найуживаніші детергенти	
 <p style="text-align: center;">Глюкаміди</p>	$x = \text{H}$ – дезокси Big CHAP $x = \text{OH}$ – Big CHAP
	$x = 9-10$ – тритон X-100 , NP-40 <i>(n</i> -трет-октил)-феніловий ефір поліетиленгліколю, 9-10) $x = 7-8$ – відновлений тритон X-114
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_y-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x-\text{H}$	$y = 12, x = 8$ – GENAPOL X-080 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_y-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x-\text{H}$, $y = 12, x = 10$ – GENAPOL X-100 $y = 11, x = 10$ – GENAPOL C-100 $y = 11, x = 23$ – BRIJ 35
 <p style="text-align: center;">(додецилловий ефір поліетиленгліколю, 9-10)</p>	$y = 11, x = 9$ – C_{12}E_9 – THESIT, Луброл PX
 <p style="text-align: center;">$y = 11, x = 8$ – C_{12}E_8 (додецилловий ефір октаетиленгліколю, Атлас G2127)</p>	

Найуживаніші детергенти	
 <p style="text-align: center;">$W + X + Y + Z = 20$</p>	<p>$X = 98, Y = 67, Z = 98$ – PLURONIC F-127</p> <p>$R = C_{11}H_{23}CO_2^-$ (laurate) – TWEEN 20</p> <p>$R = C_{17}H_{33}CO_2^-$ (oleate) – TWEEN 80</p>
Моно- та полідисперсні поліоксіетилену	
 <p style="text-align: center;">$pH \geq 6$</p>	<p>EMPIGEN BB (<i>n</i>-додецил-<i>N,N</i>-диметилглiцин)</p>
	<p>$x = 7$ – Цвітергент 3-08</p> <p>$x = 9$ – Цвітергент 3-10</p> <p>$x = 11$ – Цвітергент 3-12</p> <p>$x = 15$ – Цвітергент 3-16</p>
 <p style="text-align: center;">(N-тетрадецил-<i>N,N</i>-диметил-3-амоній-1-пропілсульфонат)</p>	<p>$x = 13$ – Цвітергент 3-14</p>

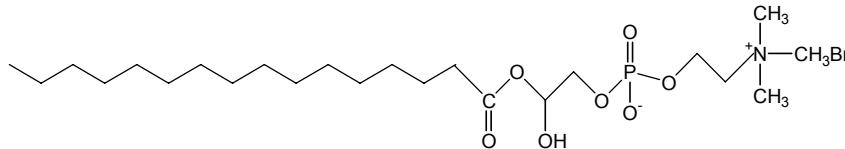
Найуживаніші детергенти



CHAPS (3-(3-холамідопропіл)-диметиламоній-1-пропілсульфонат)



ЦТАБ (гексадецилтриметиламоній бромід цетримід)



Лізофосфатидилхолін (лізолецитин)

Цвігер-іонні детергенти

Іонні детергенти містять "голівку", на якій групи формують сітку зарядів. Вони можуть бути позитивно зарядженими (катионні) або негативно зарядженими (аніонні). До аніонних детергентів належать солі жовчних кислот – холат і дезоксихолат, до катіонних – алкілтриметиламонієві солі, а до цвітер-іонних – CHAPS (3[(3-холамідопропіл)-диметиламоній]-1-пропансульфонат (англ. 3[(3-cholamidopropyl)-dimethylammoniol]-1-propanesulphonate). Наприклад, додецилсульфат натрію (SDS) містить негативно заряджену сульфатну групу і є аніонним детергентом, тоді як цетилтриметил-1-амоній бромід (ЦТАБ) має позитивно заряджену триметиламонієву групу і є катіонним детергентом. Крім цього, іонні детергенти містять вуглеводневий (алкільний) ланцюг (SDS, ЦТАБ) або більш складну жорстку стероїдну структуру (дезоксихолат натрію) (Bhairi, 2001).

Між однаково зарядженими полярними групами в детергентних міцелах спостерігається відштовхування. Тому розмір міцел визначається комбінованим ефектом гідрофобного притягання бічних ланцюгів та силою відштовхування іонних груп. У результаті цього нейтралізація заряду груп "голівки" при підвищенні концентрації протилежного іона приводить до утворення міцел більшого розміру. Розмір міцел також збільшується при подовшанні вуглеводневого ланцюга.

В окрему групу дослідники виділяють *солі жовчних кислот*, що є аніонними детергентами, які містять жорсткі стероїдні гідрофобні структури (наприклад, натрієва сіль холієвої та деоксихолієвої кислот). Крім аніонної карбоксильної групи в кінці короткого вуглеводневого ланцюга, вони також містять гідроксильні групи на стероїдній структурі, утворюючи таким чином чітко визначену полярну групу "голівки". Солі жовчних кислот поєднуються в малі агрегати, можуть зв'язуватися з таурином або гліцином за кінцевою карбоксильною групою. На відміну від сферичних міцел, утворених алкільними неіонними детергентами, міцели, утворені солями жовчних кислот, формуються завдяки своїй ригідній структурі.

Як і для іонних детергентів, розмір міцел солей жовчних кислот залежить від концентрації протилежно заряджених іонів. Через низьку pK_a (5–6) незв'язаних солей жовчних кис-

лот і слабку розчинність самих жовчних кислот вони є корисними лише за лужних рН.

Разом із тим, pK_a зв'язаних солей жовчних кислот є набагато нижчою, тому вони можуть використовуватися в ширшому діапазоні рН. Дигідроксисолі жовчних кислот і деоксихолат є більш ефективними, ніж тригідроксисолі жовчних кислот при солюбілізації мембран і при дисоціації білок-білкових взаємодій.

Серед аніонних детергентів виділяють сполуки: ВАТС, TOPPS (трет-октил-фенілпропансульфонова кислота), ВАТС (4'-аміно-7-бензамідотаурохолева кислота – синтетична похідна таурохолевої кислоти, що застосовується для солюбілізації глікозилфосфатидилінозитол-якірних мембранних білків). TOPPS має таку саму ароматичну гідрофобну структуру, як і тритон X-100, проте замість неіонних поліоксіетиленових груп він має іонну сульфонатну групу в гідрофільній "голівці". Цей детергент використовується при ренатурації хімічно або термічно денатурованої ангідрози В.

Неіонні детергенти включають такі речовини, як октил- β -D-глюкопіранозид (октилглюкозид) і поліоксіетиленові похідні типу тритону X-100, лубролу РХ і твінів. У них є незаряджені гідрофільні групи в "голівці", що містять поліоксіетиленові компоненти (BRIJ, тритон) або глікозидні групи (октилглюкозид, додецилмальтозид). Узагалі неіонні детергенти найкраще придатні для руйнування ліпід-ліпідних або ліпід-білкових взаємодій, ніж білок-білкових. Тому вони вважаються неденатуруючими й широко використовуються для виділення мембранних білків у біологічно активній формі. На відміну від іонних детергентів, солі справляють мінімальний вплив на розмір міцел неіонних детергентів. Детергенти з поліоксіетиленовими групами в "голівці" можуть містити алкілполіетиленові прості ефіри із загальною формулою $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_xOH$ або фенільне кільце між алкільним ланцюгом та ефірним угрупованням. Тритон X-100 та NP-40 належать до останнього класу. Поліоксіетиленовий ланцюг утворює невпорядковане кільце й в подальшому видаляється із гідрофобного кору міцели. Детергенти з укороченими поліоксіетиленовими ланцюгами утворюють у воді агрегати та в'язкі розчини за кімнатної температури, тоді як довші ланцюги не агрегують узагалі. Детергенти, що містять ароматичні кільця,

поглинають в ультрафіолетовій ділянці спектра і тому заважають спектрофотометричному визначенню білків при 280 нм. На сьогодні синтезовано гідрогеновані похідні цих детергентів з відновленими ароматичними кільцями, які виявляють порівняно низьке поглинання при 280 нм. Алкільні глікозиди все більше використовуються як неіонні детергенти при виділенні мембранних білків. Причиною цього є, по-перше, їхня гомогенність за складом і структурою. По-друге, цілу низку похідних алкільних глікозидів, що містять різні вуглеводневі скелети (циклічний або нециклічний ланцюг) та полярну вуглеводну структуру, можна легко синтезувати з вихідних форм. По-третє, незначну різницю між фізико-хімічними властивостями алкільних глікозидів із численними алкільними ланцюгами, з'єднаними з глюкозою, мальтозою або цукрозою, покладено в основу селективної солюбілізації мембранних білків.

Цвітер-іонні детергенти є унікальними сполуками, оскільки вони мають властивості як іонних, так і неіонних детергентів. Подібно до неіонних детергентів цвітер-іонні детергенти, включаючи CHAPS та цвітергент серії 3-X, не несуть негативного заряду, їм не притаманна електропровідність та електрофоретична рухливість, і вони не зв'язуються з іонообмінними смолами. Проте, як і іонні детергенти, вони є ефективними для руйнування білок-білкових взаємодій. Такі цвітергенти, як CHAPS є менш денатуруючими, ніж цвітергент серії 3-X, можливо, завдяки жорсткій структурі свого стероїдного кільця.

Емпірично найефективнішими є неіонні детергенти (третон Х-100, октилглюкозид); солі жовчних кислот (холат, дезоксихолат); цвітер-іонні детергенти (CHAPS, цвітергент), але вибір детергенту, найбільш прийняттого для солюбілізації та очищення певного мембранного ферменту, як і раніше, здійснюється методом проб і помилок.

Крім детергентів, при дослідженні мембранних білків ефективно використовуються також недетергентні сульфобетайни (НДСБ), які не є детергентами та не можуть утворювати міцели. Ці сполуки мають гідрофільні групи, подібні до тих, що існують у складі цвітер-іонних детергентів, проте їхній гідрофобний ланцюг значно коротший. При комбінованому застосуванні їх із

традиційними детергентами можна отримати більший вихід мембранних білків. Крім того, вони перешкоджають агрегації під час ренатурації хімічно або термічно денатурованих білків.

Перший етап очищення того чи іншого мембранного білка зазвичай включає вибір придатного біологічного джерела та виділення мембранної фракції, збагаченої на даний білок. На наступному етапі проводять солюбілізацію детергентами. У фізико-хімічному аспекті солюбілізація – це "процес отримання термодинамічно стійкого ізотропного розчину речовини, зазвичай нерозчинної в даному розчиннику, шляхом уведення добавок амфільного компонента або компонентів". Таке визначення є застосовним відносно солюбілізації й реконструкції біологічних мембран, які складаються з ліпідів і білків, нерозчинних у воді. Зручними амфіфілами в даному разі є детергенти. При додаванні до біологічної мембрани детергент вбудовується в неї до досягнення точки насичення, після чого мембрана починає розпадатися на змішані міцели типу детергент-ліпід-білок.

Найчастіше про солюбілізацію судять за появою білка або відповідної біологічної активності в надосадовій рідині після високошвидкісного центрифугування, зазвичай за прискорення 105 000 *g* протягом 1 год. Більшість мембран у таких умовах осаджуються, і таким чином можна відокремити солюбілізований матеріал від несолюбілізованого.

При солюбілізації реконструкції мембранних білків для їхньої наступної фізико-хімічної та хімічної характеристики необхідно позбутися надлишку детергенту. Методи видалення детергентів базуються на їхніх властивостях: гідрофобності, ККМ, агрегаційному числі та заряді.

Метод *гідрофобної адсорбції* базується на здатності детергентів зв'язуватися з гідрофобними смолами. Розчин, який містить детергент, змішують з певною кількістю сорбенту, і суміш інкубують за кімнатної температури. Сорбент зі зв'язаним детергентом можна видалити центрифугуванням або гель-фільтрацією. Цей метод придатний для більшості детергентів.

Найчастіше детергент видаляють за допомогою діалізу (Генніс, 1990). Коли розчини детергентів розводять до концентрацій нижче ККМ, міцели диспергуються на мономері. Розмір моно-

мерів є меншим, ніж їхній розмір у міцелах, і тому їх легше відокремити діалізом. Оскільки великі розведення на практиці майже не використовують, міцели можна диспергувати за допомогою інших підходів, наприклад, при додаванні солей жовчних кислот. Найчастіше діаліз застосовують для видалення детергентів з високою ККМ.

Перевага цього методу полягає в його простоті: можна одночасно діалізувати кілька зразків (які містять, наприклад, різні ліпіди), при цьому не потрібно ні спеціального обладнання, ні особливого контролю за ходом діалізу. Недоліком методу є те, що видалення детергенту потребує багато часу. Крім того, що це створює певні незручності, тривалий контакт із детергентом може привести до ушкодження деяких мембранних білків. Очевидно, створення детергент-білкових міцел неминуче відбувається навіть за надлишку ліпиду. Якщо із якихось причин інгібітори протеолітичних ферментів не було додано при солюбілізації чи очищенні білка, то може стати корисним додавання їх на стадії видалення детергенту.

Швидкість видалення детергенту залежить від багатьох факторів, але в будь-якому разі слід прагнути до того, щоб залишковий вміст детергенту не перевищував 0,02% (в/о) чи був у 100 разів нижчим від первинного рівня.

4.2. ХРОМАТОГРАФІЧНЕ РОЗДІЛЕННЯ МЕМБРАННИХ БІЛКІВ

Білки, вивільнені із мембран шляхом солюбілізації, поведуться, як звичайні водорозчинні білки. Їх можна фракціонувати за допомогою стандартних хроматографічних методів, які ґрунтуються на відмінності білків за розміром, зарядом і специфічністю взаємодії з лігандами.

Якщо досліджуваний мембранний білок є стабільним, при його подальшому очищенні проводять фракціонування мембранної фракції за допомогою гель-фільтрації у водному буфері з детергентом. Важливо, щоб концентрація детергенту дорівню-

вала або перевищувала критичну концентрацію міцелоутворення (ККМ). Інтегральні білки, оточені мономолекулярною "шубою" детергенту, можуть мати уявну молекулярну масу, яка вдвічі перевищує ту, що відповідає їхній амінокислотній послідовності. Крім того, багато білкових комплексів не підлягає дисоціації в денатуруючих детергентах. Тому для колонкової хроматографії мембранних білків застосовують сорбенти з великим розміром пор – сефарозу, агарозу та поліакриламід тощо. У деяких випадках при очищенні білків можуть виникнути ускладнення у зв'язку з агрегацією білків або їхньою необоротною адсорбцією на хроматографічних носіях. Узагалі ефективність початкових етапів фракціонування залежить насамперед від правильного вибору детергенту. Якщо існує ймовірність того, що під час хроматографії може мати місце необоротна адсорбція білка, можна спробувати замінити носій. Наприклад, носії, приготовані на базі поліакриламіду, є більш інертними, і їх можна використовувати як з м'якими, так і з жорсткими (тобто денатуруючими) детергентами, але слід бути обережними при роботі з органічними розчинниками.

Для фракціонування інтегральних мембранних білків хороши наслідки дає застосування *високоєфективної рідинної хроматографії* (англ., high-performance liquid chromatography, HPLC), особливо тоді, коли процес очищення лімітується кількістю білка та часом його фракціонування. Тепер є багатий вибір носіїв для HPLC, переважно на основі силікагелю та синтетичних полімерних матеріалів (наприклад, гідроксильованих поліетерів), асортимент яких постійно розширюється. Розмір пор носія визначається діапазоном молекулярних мас (від 500 до $2 \cdot 10^7$ Да) білків, які розділяють (від 500 до $2 \cdot 10^7$ Да). У присутності денатуруючих детергентів ефективність розділення, як правило, знижується. Більшість таких носіїв можна використовувати в нейтральних органічних розчинниках, детергентах і в присутності денатуруючих агентів, таких як гуанідинхлорид і SDS.

Особливо обережним при проведенні хроматографії мембранних білків слід бути, якщо таке розділення здійснюється за екстремальних значень рН. За такого розділення дуже кислі умови в поєднанні з органічними розчинниками сприяють при-

скоренню руйнування носіїв, приготованих на базі силікагелю. Ще більш деструктивними є лужні умови за $\text{pH} > 8$. У результаті видалення з носія захисних груп посилюється необоротна адсорбція на ньому поліпептидів. Тому за екстремальних умов застосовуються носії типу сефадексу та поліакриламиду для фракціонування компонентів суміші за розміром. Оскільки подібні умови руйнівним чином діють як на носій, так і на пептид, хроматографію слід проводити за низьких температур і високих швидкостей елюювання.

Іонообмінна хроматографія. Для виділення мембранних білків можна використовувати класичні іонообмінні системи, які застосовуються при очищенні білків, за умови, що вихідний заряд поліпептиду не нейтралізується при додаванні заряджених детергентів або при його розчиненні в сильних кислотах і лугах. Найчастіше застосовуються слабкозаряджені *DEAE-* та *KM-іоніти* (на основі, наприклад, целюлози та декстрану), але, якщо їх використовувати у присутності детергенту, слід упевнитись, що останній не перешкоджає взаємодії білка з адсорбентом (Еванз, 1990). Ефективність очищення на цих носіях достатньо залежить від природи білка, який виділяють. Якщо білок є гідрофільним, можна підібрати умови, за яких він міцно зв'язуватиметься з іонітом. Навпаки, білки, які значною мірою занурені в бішар і тому є міцно обкутаними детергентною оболонкою, мають набагато менші можливості для взаємодії із зарядженим сорбентом.

З урахуванням цього *DEAE-*колонки врівноважують буфером з низькою іонною силою (наприклад, $< 0,1$ моль/л трис- HCl або фосфатним буфером), що містить детергент (порядку $0,1\%$) і, можливо, фосфоліпід ($0,1\%$), за pH $6,5\text{--}8,0$. Елюювання проводять сольовими розчинами зростаючої концентрації (наприклад, $0\text{--}1$ моль/л NaCl або KCl), які також містять детергент та/або фосфоліпід.

*KM-*сорбенти врівноважують за слабкокислих pH $5,5\text{--}7,0$, а для елюювання найчастіше використовують розчини з градієнтом pH , а не солі. Розділення мембранних білків на *DEAE-* та *KM-*целюлозі виконують за допомогою сумішей органічних розчинників (наприклад, хлороформ/метанол) з різним вмістом води.

Для *VERX* і *VRXB* отримано іонообмінні силікагелі та синтетичні смоли з різними розмірами пор. За своєю ємністю в перерахунку на загальний білок вони у $20\text{--}30$ разів ефективніші, ніж

звичайні носії для гель-фільтрації. Ще одним носієм, застосування якого виявилось успішним для дослідження мембранних систем, є гідроксилпатит.

Ізоелектричне фокусування. Для мембранних білків у нативному стані характерною є така сама різниця за ізоелектричними точками, як і для водорозчинних білків (Генніс, 1997). Ці відмінності можна використовувати для ефективного очищення білків методом ізоелектричного фокусування. Білки мігрують за дії електричного поля у градієнті рН, і коли даний білок досягає ділянки, яка відповідає його ізоелектричній точці, подальша міграція припиняється – він ніби "фокусується". Цим методом можна досягти дуже тонкого розділення компонентів, навіть до відокремлення фосфорильованого білка від його нефосфорильованої форми. Існують кілька способів формування градієнта рН за допомогою амфолітів при використанні деяких стабілізаторів – поліакриламідних та агарозних гелів або градієнта густини гліцеролу, сахарози й сорбітолу. Для розчинення мембранних білків необхідні детергенти, і підбирати їх слід таким чином, щоб вони не змінювали заряду білка, не спотворювали градієнт рН і самі не підлягали фокусуванню. Зазвичай використовуються неіонні детергенти, хоч у принципі можна також застосовувати й цвітер-іонні сполуки. Як правило, корисно починати фракціонування з досить широкого діапазону рН 3–10, постійно звужуючи його до 2 так, щоб приблизно всередині цього інтервалу фокусувався досліджуваний білок. При вивченні основних мембранних білків (рІ ~7) часто доцільно додатково проводити електрофорез у градієнті рН, що формується, коли зразок наносять у кислій зоні гелю. У цій системі градієнт рН не досягає повністю рівноважного стану, і тому положення білка не відповідає точному значенню його рІ. Розділення проводять за температури 0–4 °С і продовжують його щонайменше протягом чверті терміну (1–2 год), необхідного для досягнення постійної напруги. Цей метод можна використовувати як для аналітичного, так і для препаративного розділення. Його ефективність значною мірою залежить від наявності чутливого методу кількісного визначення досліджуваного білка, від солубілізуючої здатності детергенту щодо цього білка і, що є особливо важливим, від можливості запобігти його агрегації та/або осадженню.

Хроматофокусування. Одним із найперспективніших методів очищення інтегральних мембранних білків є хроматофокусування, яке більше відповідає препаративній, ніж аналітичній меті. Цей метод подібний до ізоелектричного фокусування і відрізняється тим, що градієнт рН формується не в буфері, а на нерухомому наповнювачі колонки. Ці наповнювачі стійкі в діапазоні рН 3–12, але краще працюють в інтервалі рН 5–9. Їх можна використовувати в поєднанні з нейтральними органічними розчинниками, з денатуруючими агентами (8 моль/л сечовина, 6 моль/л гуанідинхлорид), а також із детергентами – як незарядженими (наприклад, дигітонін, тритон X-100), так і цвітер-іонними (CHAPS). Метод є швидким, ефективним і недорогим.

Гідрофобна хроматографія. Сьогодні все більшої популярності набуває також гідрофобна хроматографія, за якої білки й пептиди зв'язуються з гідрофобними групами, ковалентно приєднаними до носія (Еванз, 1990). Адсорбція білків на носії, наприклад на октил-, фенілсефарозі або на суперозі, відбувається за рахунок гідрофобних взаємодій і посилюється за високих концентрацій солей (наприклад, у 50–80% сульфаті амонію), за низьких рН і за високих температур. Білок потім елюють сольовими розчинами з концентрацією, що зменшується. Для полегшення розділення й підвищення виходу білка із колонки, до елюючого буфера можна включити етиленгліколь, метанол або етанол. Такий самий результат дає підвищення рН і пониження температури. Проте застосування даного методу є обмеженим для більшої частини інтегральних мембранних білків. По-перше, ефективність модифікованого носія різко знижується у присутності детергенту (і ще сильніше – у присутності органічних розчинників). По-друге, розділення інтегральних мембранних білків швидше за все буде незадовільним. У деяких випадках цей метод може бути корисним для відокремлення інтегральних білків від периферичних.

Хроматографія з оберненою фазою. Це особливий вид хроматографії, яка є найбільш близькою до ВЕРХ та ВРХБ. До макропористого носія (з діаметром пор 250 Å і більше) хімічно пришивають ціанпропільні або (ди)фенільні залишки, а найчастіше *n*-алкільні ланцюги, що містять від 2 до 12 СН₂-груп. Як правило, чим більшим і гідрофобнішим є білок або пептид, тим коротшим

має бути вуглеводневий ланцюг на носії (ланцюг C_4 особливо ефективний для великих пептидів, а ланцюг C_{18} – для малих).

Щоб продовжити термін використання носія та зменшити ймовірність виникнення артефактів, слід вибирати такі носії, які підлягали захисній модифікації, тобто блокуванню силанольних залишків, що не містять ланцюгів C_4 – C_{18} , за допомогою низькомолекулярних розгалужених силанів.

Велике значення має вибір розчинника (рухомої фази), хоч слід зауважити, що сьогодні пропонується лише обмежена кількість систем. Через нестабільність силікагелевих носіїв розчинники з лужними рН не використовуються, а за нейтральних рН часто відбувається розширення піків і погіршується розділення. Це пояснюється взаємодією аміногруп пептиду із силанольними залишками носія. У кислих умовах силанольні групи є протонованими, і тому переважають гідروفобні взаємодії. При розділенні звичайної суміші пептидів елюювання починають з 0,01–0,1% трифтороцтової (ТФО) або пентафтормасляної кислоти. Замість них можна використовувати фосфорну чи хлорну кислоту в концентрації до 0,1%, щоб підвищити гідрофільність пептидів, однак при розділенні гідروفобних пептидів ці добавки застосовують рідко. Може виявитися корисним включення до водних систем органічних амінів, наприклад фосфату триетиламіну (0,1%), завдяки чому послаблюються іонні взаємодії між носієм і пептидом.

Зразки наносять на колонку в невеликому об'ємі (близько 100 мкл) водного розчинника. Для розчинення сильногідروفобних білків і пептидів може знадобитися 90% мурашина кислота. У міру розведення мурашиної кислоти пептиди адсорбуються на носії. Потім їх елюють системами із зростаючим градієнтом органічного розчинника, тобто системами з полярністю, що зменшується. Існує такий ряд полярності: вода > метанол > етанол > ацетонітрил > 1-пропанол > 2-пропанол > бутанол. Особливо широко використовують ацетонітрил, оскільки він має низьку в'язкість і високу розчинну здатність; крім цього, його можна придбати в очищеному вигляді (без домішок, які поглинають в УФ-ділянці). Як приклад типового градієнта можна навести перехід від 0,1% ТФО, що містить 10% ацетонітрилу, до 0,1% ТФО, який містить 70% ацетонітрилу. Для поліпшення розчин-

ності пептидів запропоновано вводити в невеликих кількостях такі добавки, як монометоксіетиленгліколь.

Оскільки багато великих гідрофобних пептидів, які утворюються при розщепленні інтегральних мембранних білків, не елюють узагалі або вимиваються з дуже низьким виходом за допомогою C_{18} -носіїв і розчинників, в окремих випадках хроматографічного очищення доводиться проводити в жорстких умовах. Так, на C_{18} -сорбенті було створено градієнтний перехід від 5% водного розчину мурашиної кислоти до 5% розчину цієї самої кислоти в етанолі або перехід від 50% мурашиної кислоти у воді до 50% мурашиної кислоти в ізопропанолі чи етанолі. Іншими системами розчинників, що успішно використовуються, є ацетат калію (0,24 моль/л, рН 6,5) у суміші хлороформу з метанолом з різним співвідношенням компонентів, градієнт 10–60% HCl (12 ммоль/л), етанол і бутанол (4 : 1, о/о) у HCl (12 ммоль/л) із додаванням ДМСО до 1% у кінці градієнта.

Беручи до уваги практичний досвід, можна спочатку проводити фракціонування білків і пептидів на сефадексі LH-60 і LH-20, а потім об'єднані фракції, що містять пептиди з близькою молекулярною масою, піддавати хроматографії з оберненою фазою. Висушування пептидів і білків слід проводити обережно на роторному випарнику до вологого стану зразка з подальшим видаленням залишків розчинника ліофілізацією.

Афінна хроматографія. Цей метод дозволяє проводити очищення, базуючись на біологічній спорідненості або активності, які мають лише певні компоненти в суміші білків і пептидів, що підлягає розділенню (Еванз, 1990). Мембранозв'язані ферменти, наприклад, можуть адсорбуватися на нерозчинних носіях, з якими ковалентно сполучені аналоги субстратів, простетичні групи або специфічні ефектори. Рецептори зв'язуються з іммобілізованими фармакологічними препаратами або гормонами. Отже, для успішної реалізації цього підходу необхідно солюбілізувати мембрани в таких умовах, щоб досліджуваний білок зберіг свою біологічну активність. Адсорбований білок зазвичай знімають з носія за допомогою агента, який ефективно конкурує з іммобілізованим лігандом за центр зв'язування. Цим методом можна як концентрувати, так і очищувати білок.

Як нерухомий носій можна використовувати цілу низку матеріалів – декстрини, целюлозу, силікагелі, скло й синтетичні смоли, проте найбільш ефективними виявились сефароза, агароза, поліакриламід і полістирол. При виборі гелю з необхідним розміром пор слід брати до уваги передусім розмір утвореного комплексу білок-ліганд. При цьому необхідно пам'ятати, що рецепторний білок може складатися із кількох субодиниць і що зв'язування детергенту приводить до значного збільшення розмірів солубілізованого білка. Носії активують таким чином, щоб вони набували здатності ковалентно зв'язувати специфічний ліганд. Численні активовані сорбенти виробництва фірм "Beckman", "Pharmacia", "BioRad" мають різні реакційноздатні групи, зв'язані з гелем або безпосередньо, або через подовжений місток (спейсер). Ці містки підвищують доступність іммобілізованого ліганду для білка і зменшують стеричні обмеження, що є особливо важливим для розчинів, які містять детергенти.

Майже в усіх випадках ліганд зв'язують з носієм через первинні аміно-, карбокси- та сульфгідрильні групи. Із табл. 6 видно, що придатні функціональні групи можна ковалентно пришити до носія. У деяких випадках необхідну активну групу можна спеціально ввести в ліганд або білок. Вибір носія визначається структурою та властивостями ліганду.

Існує ще багато аргументів, які слід мати на увазі, коли як ліганди використовують білки. По-перше, при ковалентному зв'язуванні білка з носієм необхідно подбати про збереження активності білка. Для цього на стадії зв'язування часто потрібна присутність субстрату, аналога, простетичної групи або яких-небудь іонів, необхідних для вияву функціональної активності. Можливо, ці компоненти доведеться додавати й під час підготовки афінного сорбенту для хроматографії.

По-друге, активні групи, що не прореагували, треба блокувати яким-небудь інертним модифікатором, наприклад етаноламіном, до використання афінного сорбенту. Амінокислоти як блокувальні агенти є менш придатними, оскільки вони надають носієві іонообмінних властивостей. По-третє, білки, крім центрів специфічного зв'язування, мають також більші ділянки, які можуть діяти як

центри гідрофобної взаємодій або (що є більш звичним) як іонообмінники. Присутність детергенту часто приводить до маскування чи заповнення гідрофобних порожнин у білковій молекулі, завдяки чому неспецифічні гідрофобні взаємодії послаблюються.

4.3. РЕКОНСТРУКЦІЯ МЕМБРАННИХ БІЛКІВ

Для дослідження мембранних білків ефективно застосовуються методи їхньої реконструкції у везикули (Генніс, 1996). Першим етапом при очищенні інтегрального мембранного білка є порушення його взаємодії з ліпідним бішаром мембрани. Цього можна досягти, додаючи детергент, який солюбілізує білок, тобто переводить його в розчинну форму. При цьому важливо використовувати сполуки, як не викликають денатурації білка, такими є, наприклад, тритон X-100 або октилглюкозид, на відміну від додецилсульфату натрію, який є "жорстким" детергентом. Молекули детергентів аміфпатичні, тому вони можуть вбудовуватись у ліпідний бішар за допомогою своєї гідрофобної частини. Очищені глобулярні білки зберігаються у буферних середовищах для запобігання агрегації. У подальшому їх вбудовують у штучно створені ліпідні везикули (ліпосоми) і вивчають структуру та функції. Такі везикули можуть утворюватися і спонтанно, коли до розчину, що містить білок і детергент, додають фосфоліпіди та відмивають детергент діалізом.

Після очищення мембранного ферменту для вивчення його каталітичної активності бажано, а часто й необхідно, реконструювати його з фосфоліпідами. Кінетичні характеристики багатьох ферментів *in situ* й після очищення та реконструкції є однаковими. Незважаючи на те, що властивості ферменту у штучних системах можуть змінюватися, вивчення очищених і реконструйованих ферментів надає великі переваги. Зокрема, у такій системі не виникають різні конкуруючі реакції, притаманні біомембранам.

В одному із перших експериментів було виявлено, що ліпід-білкові комплекси, які містили бактеріородопсин, спонтанно включалися до везикул з диміристоїлфосфатидилхоліну, які надавалися дії ультразвуку за температури 4 °C (Scotto, 1988).

На рис. 4.2 наведено схему реконструкції Ca^{2+} -АТФази в ліпідні везикули. Її функціонування контролюється за збільшенням концентрації АТФ поза межами везикул і збільшенням концентрації Ca^{2+} усередині при його додаванні.

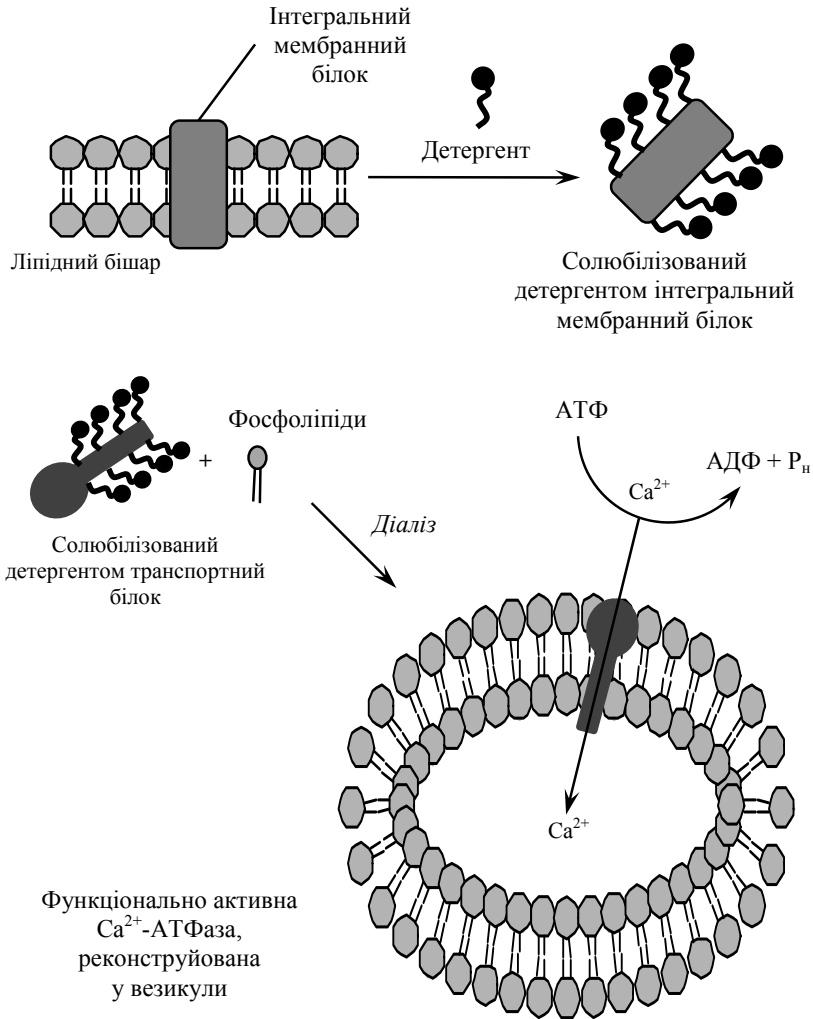


Рис. 4.2. Солюбілізація мембранного білка (Ca^{2+} -АТФази) за допомогою детергенту та реконструкція її у штучні ліпідні везикули

В ідеалі кінцевий продукт реконструкції має являти собою суспензію моноламельярних везикул одного розміру, з однаковим співвідношенням ліпід/білок. Везикулярний бішар повинен мати таку саму проникність, як і нативна мембрана: везикули повинні зберігати захоплені непроникні іони чи молекули й мати достатній внутрішній об'єм, щоб можна було виміряти вміст захоплених ними речовин.

Везикули не повинні містити залишкового детергенту. Мембранні білки мають бути орієнтованими й вбудованими в бішар у такий самий спосіб, як і в нативній мембрані. Треба, щоб бішар мав певний склад, необхідний для збереження функціональної активності, притаманної нативному білку. Хоч усі ці вимоги рідко вдається виконати цілком, усе ж таки за допомогою реконструйованих систем можна одержати багато корисної інформації про структуру та функції мембран і білків. Крім того, тут завжди є необмежений простір для подальших удосконалень.

Використання реконструйованої системи дозволяє не тільки охарактеризувати ізольовану систему, а й визначити мінімальну кількість компонентів, необхідних для виявлення тих або інших біохімічних активностей. За допомогою реконструкції у фосфоліпідні везикули, наприклад, було показано, що за поглинання лактози клітинами *E. coli* відповідає тільки один білок – лактозопермеаза. Аналогічно було визначено мінімальну кількість білкових компонентів, необхідних для реконструкції дихального ланцюга *E. coli* та системи аденілатциклазної гормональної відповіді.

Для вбудовування солюбілізованих у детергенті очищених мембранних компонентів у модельні мембранні системи розроблено кілька методів. Найкраще ферменти вбудовуються в одношарові фосфоліпідні везикули. Характеристики ж білків, які активно чи пасивно збільшують іонну провідність мембрани, часто визначають після вбудовування їх у плоский бішар. Плоскі мембрани зручні для електрохімічних вимірювань, які дозволяють визначити величину іонної провідності та інші характеристики, що походять від неї (наприклад, залежність частки від-

критих каналів від прикладеної електричної напруги). У таких випадках, однак, важко або навіть неможливо визначити біохімічні характеристики білка, зокрема його каталітичну активність, відмінні від іонної проникності.

Реконструкцію починають, узявши змішані міцели, що складаються із очищеного білка, детергенту й ліпиду (ендогенного або екзогенного) (Shen, 2013). Іноді до складу міцел входять тільки білок і детергент, а необхідність ліпиду для стабілізації досліджуваного білка можна встановити так, як описано вище. Якщо ліпід не було додано у процесі солюбілізації чи очищення білка (або якщо потрібно додати його додатково), то це, як правило, роблять на стадії приготування міцелярного розчину, щоб отримати кінцеве мольне відношення ліпід:білок (позначене як ϕ), що дорівнює 2000:10000. Такий надлишок ліпиду потрібен тоді, коли реконструйовані везикули використовують для досліджень транспортних процесів, хоч у деяких випадках більш прийнятним може бути співвідношення 100:200. Ліпід можна додати у вигляді детергент-ліпідних міцел або нашарувати його на дні колби у вигляді тонкої плівки, над якою потім перемішують детергент-білковий розчин, доки в нього не перейде весь ліпід. Бажано всі ліпідні суспензії зберігати в атмосфері інертного газу.

Для вбудовування мембранного білка в ліпідну везикулу перш за все необхідно позбавитися детергенту, що міститься у препараті білка, котрий, якщо він присутній у значній кількості, дестабілізує фосфоліпідний бішар. Зазвичай його видаляють уже із суміші білка з фосфоліпідом, але в деяких випадках білок очищують від детергенту до початку реконструкції. Видаляють детергент, застосовуючи гель-фільтрацію, діаліз або адсорбцію на поверхні кульок із полістиролу. Останнім методом користуються насамперед для видалення тритону X-100. Усі наведені методи досить ефективні, але слід мати на увазі, що навіть після дуже інтенсивних обробок у системі завжди залишається та чи інша кількість зв'язаного детергенту.

Реконструкцію мембранних білків проводять з використання детергентів або без них (рис. 4.3).

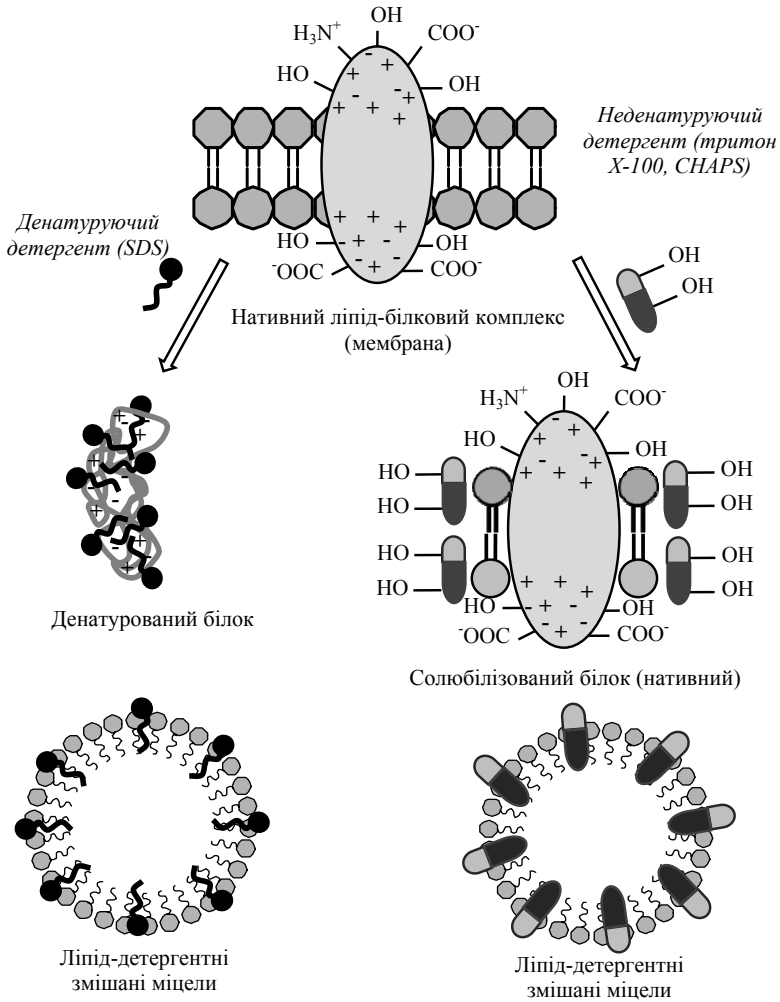


Рис. 4.3. Способи реконструкції мембранних білків:
1 – без детергентів, 2 – з використанням детергентів

Реконструкція без детергенту. Умови включення мембранних білків у попередньо сформовані везикули часто збігаються з умовами, які сприяють злиттю фосfolіпідних везикул. В основі обох процесів лежать певні порушення бішарової структу-

ри або утворення "дефектів", які могли б полегшити як вбудовування білка, так і злиття везикул. Механізми цих процесів вивчені недостатньо. Можливим ускладненням у використанні цих методів є агрегація білка.

Реконструкція шляхом включення білка в заздалегідь сформовані везикули. Цей метод можна використовувати далеко не завжди й переважно для реконструкції не пронизуючих бішар білків з обмеженою гідрофобною поверхнею, наприклад, цитохрому b_5 і β -гідроксибутиратдегідрогенази. Конформація вбудованого таким чином білка, проте, відрізняється від нативної.

Реконструкцію шляхом включення мембранних білків у заздалегідь сформовані везикули було успішно здійснено в кількох випадках. Цей спосіб (рис. 4.4, Б) забезпечує більш однорідну орієнтацію білка у везикулах. Білки з невеликими гідрофобними "хвостами" (коліцин Ia або цитохром b_5) включаються в ліпосоми спонтанно, при цьому часто необхідні ліпіди цілком певного типу. Таким методом було проведено, наприклад, реконструкцію асіалоглікопротеїнового рецептора печінки.

Мембранозв'язану форму гуанілатциклази, очищену й солюбілізовану в 0,1% лубролі РХ, інкубують з ліпосомами впродовж 1–5 год і потім виділяють.

Реконструйовані везикули виділяють центрифугуванням за прискорення 300 000 g протягом 30 хв.

Виміри ферментативної активності у фракції везикул показали, що, на відміну від деяких інших мембранних білків, гуанілатциклаза в ліпосомах має максимальну швидкість (V_{max}) у 10 разів нижчу, ніж у розчинній формі. При цьому ферментативна активність значною мірою залежить як від складу фосfolіпідів, так і від природи їхніх жирних кислот, хоча прямої залежності цих ефектів від довжини та ступеня ненасиченості жирнокислотних ланцюгів не виявлено.

Розроблено цілий ряд підходів до реконструкції білків у модельні мембранні системи, такі як ліпосоми і нанодиски (Shen, 2013). Властивості ліпосом і нанодисків та методи їх використання описано у підрозд. 5.2.

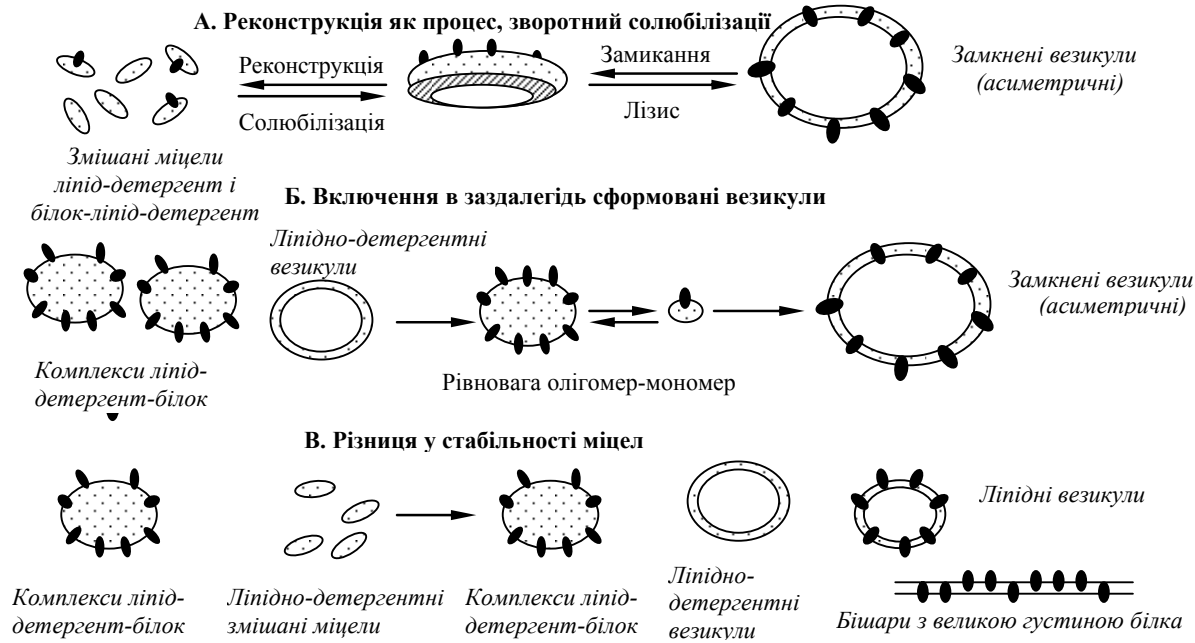


Рис. 4.4. Різні способи реконструкції мембран із солюбілізованих компонентів при видаленні детергенту (Генніс, 1997)

Реконструкція за участю амфифільних каталізаторів. У деяких роботах показано, що додавання до білково-фосфоліпідної суміші амфифільних речовин у низьких концентраціях полегшує вбудовування у везикули таких мембранних ферментів, як бактеріородопсин або цитохром с-оксидаза. Як амфифільні речовини використовували холестерол, коротколанцюгові фосфатидилхоліни та жирні кислоти. Перевагою способу є те, що в ньому відсутні жорсткі умови (процедури), у тому числі обробка надлишком детергентів, проте на сьогодні він мало поширений.

Реконструкція за допомогою заморожування-відтавання та обробки ультразвуком. У деяких випадках для реконструкції мембранних білків з успіхом використовують метод заморожування-відтавання з наступною обробкою ультразвуком.

Аліквоту білка, що не містить ліпідів і детергенту, змішують з водяною дисперсією ліпідів. Суміш обробляють ультразвуком або швидко заморожують у рідкому азоті, потім піддають відтаванню і знову використовують ультразвук (Еванз, 1990). Перевага цього методу полягає в тому, що він швидкий і не потребує використання детергентів. Однак його застосування є обмеженим, оскільки більшість мембранних білків при видаленні ліпідів і детергентів зазнають необоротної денатурації. Цей процес може також відбуватися під впливом ультразвуку протягом кількох секунд. Крім того, різниця в потужності й конструкції ультразвукових установок дуже ускладнює стандартизацію умов озвучування.

За допомогою такого комбінованого підходу було реконструйовано комплекс, що містить хлорофіл *a/b*. Мембрани хлоропластів солюбілізували в 1,5% тритоні X-100 за кінцевої концентрації хлорофілу 3 ммоль/л. Отриману суспензію додавали до рівного об'єму ліпідів (10 мг/мл), оброблених ультразвуком, перемішували й потім три рази проводили операцію заморожування-відтавання. Залишки тритону X-100 видаляли смолою Biobeads SM-2, зразок центрифугували для відділення смоли й потім тричі піддавали заморожуванню-відтаванню. У результаті були отримано переважно моноламельярні везикули з невеликими домішками більших мультиламельярних фрагментів.

Іноді для полегшення реконструкції використовують просту обробку ультразвуком (Генніс, 1997). Білок спочатку вбудовується в маленькі везикули з високою кривизною. Вважається, що замо-

рожування-відтавання потрібно для злиття дрібних протеоліпосом у більші й однорідні за розмірами.

Реконструкція з використанням детергентів. Тепер для реконструкції мембранних білків найчастіше застосовують методику, які складаються із солюбілізації суміші білка й фосфоліпиду з детергентом і наступним видаленням детергенту. Після видалення білок і фосфоліпід спонтанно формують одношарові везикули, які цілком придатні для ензимологічних досліджень. Вибирають детергенти з високою критичною концентрацією міцелоутворення і малими розмірами міцел для того, щоб їх можна було легко видалити діалізом або гель-фільтрацією. Найчастіше використовують холат натрію та октилглюкозид. Розподіл отриманих везикул за розмірами визначається співвідношенням детергент : фосфоліпід, а також здатністю і швидкістю видалення детергенту. Діаліз використовують як більш повільний метод. Як приклад можна навести вбудовування цитохром с-оксидази та Na^+ , K^+ -АТФази.

За допомогою цієї методики можна ввести у везикули, відмінні від фосфоліпідів речовини, наприклад холестерол або убіхінон. У ряді випадків виникає необхідність у достатньо швидкому видаленні детергенту, особливо, якщо білок нестабільний за його надлишку. Тоді застосовують гель-фільтраційну хроматографію, яка також дозволяє ефективно відокремити білково-ліпідні везикули від детергенту (наприклад, під час реконструкції гліцеро-3-фосфатидилінозитолтрансферази й фосфатидилінозитолсинтази).

Ще більш швидким є метод розведення, коли суміш білок:ліпід:детергент розводять до концентрації детергенту набагато меншої, ніж критична концентрація міцелоутворення. При цьому спонтанно утворюються білково-фосфоліпідні везикули, які можна відокремити від детергенту центрифугуванням.

Видалення детергенту під час реконструкції. Для формування везикул слід видалити детергент зі змішаних міцел, для того, щоб довільно міг утворитися фосфоліпідний бішар.

Найчастіше при реконструкції мембранних білків використовують метод діалізу, а детергентом є холат. Тритон X-100 важко видалити діалізом, оскільки він має низьку ККМ. Тому його рідко застосовували для реконструкції, поки не з'ясувалося, що гідрофобні смоли біобілдс SM-2 та амберліт XAD-2, які адсорбують детергенти, можуть прискорити видалення тритону X-100. Із

цією метою попередньо промиті смоли просто додають до діалізуючого буфера. Такий спосіб видалення детергенту був використаний для реконструкції натрієвого каналу.

При застосуванні іншого методу реконструкції змішаний міцелярний розчин розводять до концентрації нижче ККМ солюбілізуючого детергенту, у результаті ліпіди й білки асоціюють з утворенням везикул. Детергент, що залишився у везикулах, можна потім видалити фільтрацією або короткочасним діалізом. Цей підхід уперше застосували для реконструкції цитохромоксидази, солюбілізованої холатом, а нещодавно його було використано для реконструкції родопсину.

Детергент можна також видалити за допомогою гель-фільтрації ліпідно-білково-детергентного розчину. Гель-фільтрація виявилася дуже ефективною при реконструкції таких мембранних білків, як ацетилхоліновий рецептор, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза й білок, що бере участь у транспорті лактози.

Для очищення мембранних ферментів використовують переважно тритон Х-100, але він не зовсім зручний для реконструкції, оскільки його важко вилучити із системи. Для видалення тритону використовують кульки з полістиролу, і однією із проблем є втрата білка через його сорбцію на поверхні кульок. Як приклад білка, що реконструювали цим методом, можна навести натрієвий канал.

Для реконструкції застосовується ще один метод, який базується на диспергуванні суміші холестерол:фосfolіпід:білок у діетиловому ефірі з наступним випарюванням оберненої фази. Проте мало ймовірно, що багато білків витримають таку процедуру.

Морфологічна характеристика реконструйованих білково-фосfolіпідних везикул (протеоліпосом). Для повної характеристики реконструйованої системи необхідно знати морфологію отриманих частинок. В ідеалі реконструйовані везикули мають бути гомогенними за формою, розміром і характером розподілу в них білка. Насправді ж при реконструкції нерідко утворюється гетерогенна суміш як ліпідних, так і ліпідно-білкових везикул, що може серйозно ускладнити вивчення білків, які виконують транспортні функції. Для морфологічної характеристики везикул використовується ціла низка методів.

Електронна мікроскопія. Візуальний аналіз реконструйованих мембран за допомогою електронної мікроскопії – це найкращий спосіб характеристики частинок, присутніх у зразку, за розміром

і формою. Найчастіше використовують два методи – негативне контрастування та заморожування-сколювання. Прийоми, що використовуються для характеристики ліпідних везикул, як правило, придатні й для реконструйованих мембран, хоч реагенти для негативного контрастування можуть бути іншими.

При підготовленні препарату для проведення електронної мікроскопії методом негативного контрастування розведену суспензію реконструйованих мембран (зазвичай у концентрації 0,1 мг ліпиду в 1 мл) наносять на мідну сіточку, укриту полімерною плівкою типу парлодію чи формвару. На плівку як основу напилено вуглець. Зразок, розміщений на сіточці, обробляють розчином контрастувальної солі важкого металу (уранілацетат або фосфовольфрамат натрію) і потім надлишки розчину видаляють фільтрувальним папером. При контрастуванні реконструйованих везикул концентрацію та рН промивального та контрастувального розчинів підбирають таким чином, щоб морфологія везикул за можливості не підлягала змінам. Метод негативного контрастування дуже швидкий (потрібно всього близько 30 хв на один препарат від моменту його приготування до перегляду в електронному мікроскопі). Він дозволяє проаналізувати за кілька годин велику кількість зразків. Ще однією його перевагою є те, що можна проводити аналіз зображень з досить високою роздільною здатністю за умови, що дози опромінення електронами не є настільки значними, щоб викликати радіаційне руйнування зразка. Зокрема, за електронними мікрофотографіями, одержаними за допомогою методу негативного контрастування, проводять аналіз зображень з метою реконструкції тривимірної структури мембранних білків (Генніс, 1997).

При електронній мікроскопії методом заморожування-сколювання осаджений центрифугуванням препарат реконструйованих мембран швидко заморожують і потім сколюють, при цьому оголюється внутрішня частина бішару. На поверхню відколу під кутом 45° напиляють платину, а під прямим кутом – вуглець як основу. Отримана в такий спосіб платиново-вуглецева репліка відбиває рельєф мембранної поверхні, будучи її точною копією. Інтегральні мембранні білки мають вигляд опуклості або заглиблення на репліці, при цьому далеко не завжди кожна опуклість (або внутрішньомембранна частка, ВМЧ) від-

повідас одному білку: нерідко кілька білків асоціюють, утворюючи ВМЧ. Переваги цього методу полягають у тому, що з його допомогою можна точніше охарактеризувати розподіл білка в бішарі й установити, якою є везикула – моноламельярною чи багат шаровою, а також чи включені її білки всередину. Недолік же полягає в тому, що роздільна здатність методу обмежена розмірами платинових гранул, які вкривають поверхню білка, тому кількісна оцінка розміру внутрішньомембранних частинок є дуже складною, хоч і не абсолютно неможливою.

Великих успіхів було досягнуто останнім часом у розвитку кріоелектронної мікроскопії. Суть методу така. Водяну суспензію досліджуваного препарату наносять на непокриту полімером сіточку, надлишок рідини видаляють за допомогою фільтрувального паперу, а сіточку потім занурюють у рідкий етан. При швидкому заморожуванні утворюється склоподібний лід. За допомогою спеціального охолоджувального пристосування сіточку зі зразком постійно тримають за температури рідкого азоту, завдяки чому стає можливим пряме візуальне дослідження біологічного матеріалу під електронним мікроскопом. Цей метод виключає артефакти, викликані контрастуванням і дегідратацією зразка, а сам об'єкт досліджується у придатному для нього іонному оточенні.

Гель-фільтрація та інші методи. Розміри та ступінь гомогенності реконструйованих везикул часто можна визначити за допомогою гель-хроматографії, використовуючи великопористі носії. Хроматографічні колонки можна відкалібрувати за латексними частинками стандартних розмірів. Існують дані, що розміри ліпосом, визначені за допомогою електронної мікроскопії та гель-фільтрації на каліброваних колонках, добре узгоджуються між собою (Генніс, 1997). Метод каліброваних колонок дозволяє дуже просто визначити розподіл білка у везикулах різних розмірів. Основний же його недолік становить тривалість елюювання (до кількох діб). Крім того, існує небезпека, що внаслідок контакту з гелем може змінитися характер розподілу везикул за розмірами, а також відбутися адсорбція аналізованих речовин на колонці.

Реконструйовані везикули можна охарактеризувати й за допомогою центрифугування. Таким способом було проведено центрифугування реконструйованого АцХР у градієнті густини

сахарози, щоб установити наявність мембранних фракцій з різним вмістом білка.

Характеристика реконструйованих везикул. У результаті застосування всіх методів, розроблених для реконструкції мембранних білків, утворюються одношарові везикули. Характеристика деяких із них детально вивчено. Це, зокрема, протеоліпосоми, які містять цитохром с-оксидазу, Na^+ , K^+ -АТФазу, цитохром b_5 і глікофорин.

Особливу увагу викликають такі характеристики везикул: 1) середній розмір везикул і розподіл їх за розмірами; 2) розподіл білка в популяції везикул; 3) орієнтація білка відносно площини бішару; 4) проникність везикул. Ці характеристики є особливо важливими, якщо фермент каталізує трансмембранне перенесення речовин або іонів. Для кількісного аналізу кінетики таких ферментів необхідно знати внутрішній об'єм везикул, їхню проникність і розподіл білка. Молекули ферментів, що каталізують векторні реакції (наприклад, для цитохром с-оксидази, що переносить протони тільки в одному напрямку), мають протилежну орієнтацію і містяться в одній везикулі, працюватимуть "вхолосту", компенсуючи один одного у процесі утворення результативного іонного градієнта.

Розмір везикул і визначення внутрішнього об'єму везикул. Розмір везикул великою мірою залежить від процедури реконструкції. Для цього визначення найкраще використовувати методи електронної мікроскопії або гель-фільтрації. Після видалення детергенту методом діалізу утворюються протеоліпосоми діаметром від 500 до 2500 Å залежно від білка та застосовуваного методу. За різних способів реконструкції розміри одержаних везикул варіюють у надто широкому діапазоні. Протеоліпосоми потрібного діаметра треба потім відокремити за допомогою гель-фільтраційної хроматографії.

Для визначення об'єму водної фази, включеної в реконструйовані везикули чи ліпосоми, проводять реконструкцію у присутності хромату натрію або калію (0,1 моль/л). Хромат, який не увійшов у везикули, видаляють гель-фільтрацією, а хромат, захоплений везикулами, вивільняють солубілізацією аліквоти у тритоні X-100 (10 ммоль/л) і потім визначають його концентрацію за поглинанням світла при 380 нм. Щоб знайти питомий внутрішній об'єм, ви-

ражений у літрах на моль ліпиду, концентрацію хромату в аліквоті ділять на загальну концентрацію хромату й ліпиду у зразку.

Як інші індикатори при визначенні внутрішнього водного об'єму використовують 6-карбоксіфлуоресцеїн (0,1 ммоль/л), вміст якого визначають за його флуоресценцією, або радіоактивні цукри, такі як [^{14}C]-лактоза або [^3H]-декстран, вміст яких вимірюють за допомогою сцинтиляційного лічильника.

Визначення внутрішнього об'єму полегшується, якщо мембрана містить білки, котрі мають властивості іонних каналів, типу АцХР і натрієвого каналу. Везикули інкубують протягом 12 год з радіоактивними іонами, що проникають через канал; іони, які не увійшли, видаляють за допомогою іонообмінної хроматографії й вимірюють радіоактивність іонів, захоплених везикулами.

Розподіл білка. Коли під час реконструкції застосовано діаліз для видалення детергенту із суміші, яка містить надлишок ліпиду, розподіл білка між отриманими везикулами має підпорядковуватися розподілу Пуассона. При цьому він може залежати й від білка, який вбудовується, та від особливостей методу. Слід зауважити, що під час спонтанного вбудовування деяких білків у задалегідь отримані ліпосоми відбувається переважно у везикули малих розмірів. Цитохром b_5 , наприклад, у 200 разів ефективніше вбудовується у везикули діаметром 200 Å, ніж 1000 Å.

Орієнтація білка. Це питання важливе з погляду ензимології, оскільки білок, активний центр якого локалізований усередині везикули, може бути недосяжним для субстрату. Разом із тим, багато ферментів (наприклад, цитохром с-оксидаза, гліцерол-3-фосфатидилінозитолтрансфераза, бактеріородопсин) здатні вбудовуватися в мембрану таким чином, що їхній активний центр з імовірністю 75–95% орієнтується на зовнішній поверхні везикули. Везикули, що містять цитохром с-оксидазу, за допомогою ДЕАЕ-хроматографії вдається розділити на дві популяції: з активним центром, орієнтованим усередину, і з активним центром, орієнтованим назовні. Цей спосіб розділення придатний і для інших білків.

Причину такої асиметрії вбудовування не встановлено. У деяких (але не в усіх) випадках орієнтована назовні частина ферменту має більший розмір, а вбудовування білка більш масивною час-

тиною всередину везикули є неефективним. Оскільки асиметрична орієнтація спостерігається й під час вбудовування білків у великі ліпосоми, асиметрія вбудовування не пов'язана з кривизною везикули, як у випадку розподілу ліпідів у везикулах малих розмірів. Можливо, важливу роль відіграють якісь кінетичні фактори, проте їх важко оцінити, оскільки не з'ясовано природу перехідних станів.

Не можна не вказати на те, що деякі білки вбудовуються у везикули неправильним чином, тобто в конформації, відмінній від нативної. Найтиповішим прикладом є цитохром b_5 , який, залежно від методу реконструкції, може перебувати в одній із двох конформацій. Така поведінка є характерною також для компонента Н-2К головного комплексу гістосумісності в мишей і, можливо, для білка оболонки бактеріофага М13. Усі ці білки мають один трансмембранний гідрофобний домен, і за деяких умов він включається у бішар, перебуваючи в U-подібній конформації, коли N- та C-кінцеві аміногрупи експоновані назовні.

Найпоширеніший метод визначення орієнтації білка в мембрані полягає у вимірюванні його функціональної активності у присутності й за відсутності солюбілізуючого детергенту. Деякі мембранні білки мають специфічні ділянки, розташовані на зовнішній поверхні везикул, що зв'язують з високою спорідненістю радіоактивні ліганди або токсини. Везикули, які зв'язали ліганд або токсин, можна потім відокремити від вільного токсину за допомогою хроматографії на колонці чи фільтрації через іонообмінні фільтри. Якщо зв'язування є специфічним і не залежить від присутності детергенту, то, вимірюючи зв'язування до і після солюбілізації везикул, вдається визначити відсоток білків, експонованих на поверхні везикул.

Ферментативну активність можна вимірювати як у присутності детергенту, так і за його відсутності, але варто ретельно поставитися до його вибору. Наприклад, у випадку оксидази цитохрому с тільки твін-80 (3%, о/о) не впливає на її ферментативну активність.

У багатьох мембранних білків позаклітинний домен глікозилований. У цьому разі орієнтацію білка можна визначити у присутності сілової кислоти для нейрамінідази. Везикули, що містять білок, обробляють нейрамінідазою у присутності й відсутності тритону X-100 і порівнюють кількість вивільненої сілової кисло-

ти. Недоліком цього методу є його неспецифічність: якщо реконструйований білок недостатньо добре очищений, то присутність інших глікозилізованих білків може спотворити результати.

Для з'ясування трансмембранної орієнтації білка можна використовувати моноклональні антитіла, специфічні до його зовнішнього чи внутрішнього домену. Р. Анхольт із співавторами використовували моноклональні антитіла для імунопреципітації ацетилхолінових рецепторів, що були попередньо мічені радіоактивним токсином (Anholt, 1980). Орієнтацію визначали за ступенем зв'язування моноклональних антитіл з рецептором у присутності й за відсутності 0,3% (в/о) сапоніну, під дією якого мембрана стає проникною.

Недолік усіх указаних вище методів пов'язаний з тим, що вони можуть давати завищену оцінку частині молекул, які мають невпорядковану орієнтацію, якщо реконструйована мембрана є проникною для векторної мітки за відсутності детергенту (або якщо мембрана не утворює замкнених везикул). Аналогічно інтерпретація експериментів з установа орієнтації білка в мембрані може виявитися помилковою, якщо білок не включається в мембрану, а проникає всередину замкнених везикул. Ці проблеми можна розв'язати, якщо ретельно вимірювати внутрішній об'єм везикул та їхню проникність, а також проводити електронно-мікроскопічний контроль.

Існують щонайменше два методи визначення трансмембранної орієнтації білків за даними електронної мікроскопії, хоч вони, можливо, є менш надійними, ніж описані вище біохімічні підходи. Реконструйовані везикули дослідники фіксували за допомогою танінової кислоти й осмію з наступним zalиванням у смолу та одержанням тонких зрізів. У проведених ними експериментах інтенсивно профарбовувалися тільки ті білкові домени, які в нативних мембранах розміщувалися на зовнішній поверхні. Поява інтенсивно пофарбованого шару на внутрішній поверхні везикул, на думку авторів, свідчила про те, що білок не має векторної орієнтації. При використанні цього методу слід ретельно контролювати проникність мембрани в ході фарбування, щоб переконатися в асиметричному характері фарбування досліджуваного білка.

Інший метод установа орієнтації білка в реконструйованих мембранах за даними електронної мікроскопії базується на дослідженні препаратів, приготованих за методикою заморожування-

сколювання. Показано, що в нативній мембрані родопсин завжди розміщується на поверхні відколу, що відповідає зовнішньому боку бішару, тоді як при реконструкції у фосфатидилхолінових везикулах він виявляється однаковою мірою на обох поверхнях відколу. Ці дослідники припустили, що векторна орієнтація білка, що спостерігається *in vivo*, не відтворюється при реконструкції.

Слід зауважити, що при багатьох функціональних дослідженнях мембранних білків немає необхідності в тому, щоб усі молекули досліджуваного білка були експоновані на зовнішній поверхні мембрани. Наприклад, у випадку ацетилхолінового рецептора іонний канал відкривається при зв'язуванні агоніста із зовнішнім доменом білка, тому потік іонів спостерігається тільки через ті канали, які орієнтовані відповідним чином.

Проникність. Важливість цієї характеристики для ферментів, що каталізують перенесення речовин через бішар, безперечна. Багато транспортних систем, а також іонні насоси вивчали після вбудовування їх у протеоліпосоми, тому ті везикули, що придатні для таких досліджень, повинні мати достатньо низьку проникність. Присутність білка зазвичай приводить до збільшення проникності везикул, але це збільшення значною мірою залежить від вибору ліпиду та від кількості молекул білка на везикулу.

Висловлюється припущення, що молекули деяких ліпідів завдяки своїй формі краще упаковуються навколо вбудованих у бішар білків; і саме тому згладжуються дефекти структури на межі білок-ліпід і зменшується їхня проникність для розчинних речовин. Проте прямі докази із цього приводу відсутні.

Дані щодо проникності везикул особливо важливі, коли необхідно встановити трансмембранну орієнтацію білка в бішарі чи його транспортні характеристики. Було вивчено вплив глікофору на проникність діолеїлфосфатидилхолінових везикул, одночасно в них вимірювали вміст захопленого [^3H]-декстрану й калію. Алгоритм методу такий:

1. Готують везикули у присутності 0,2% (в/о) [^3H]-декстрану.
2. Видаляють непроникний у везикули декстран хроматографією на сефарозі CL-4В.
3. Везикули, які вийшли у вільному об'єму колонки, осаджують центрифугуванням протягом 1 год за 100 000 g, потім наносять їх на колонку із сефадексом G-50, урівноважену розчином холінхлориду, щоб видалити іони K^+ , які не ввійшли у везикули.

4. Вихід іонів K^+ із везикул реєструють за допомогою калієвого електрода, а внутрішній об'єм визначають за радіоактивністю декстрану.

Припускаючи, що вихід K^+ із везикул відповідає кінетиці першого порядку, за зміною вмісту іонів K^+ у зовнішньому розчині можна визначити характерний час транспорту калію.

Контрольні запитання

1. Якими методами проводять солюбілізацію мембранних білків?
2. Завдяки чому детергенти викликають солюбілізацію білків з мембран?
3. Порівняйте іонні та неіонні детергенти.
4. Які властивості мають цвітер-іонні детергенти?
5. Якими методами проводять очищення солюбілізованих мембранних білків?
6. Назвіть сорбенти, які використовуються при очищенні мембранних білків методом HPLC.
7. Порівняйте методи реконструкції мембранних білків.
8. Охарактеризуйте детергентні міцели та вкажіть їхні переваги для реконструкції мембранних білків.
9. На чому базується метод ізоелектричного фокусування?
10. Які розчинники використовують при розділенні мембранних білків шляхом хроматографії з оберненою фазою?

Список літератури

Fambrough D. M. Analysis of subunit assembly of the Na-K-ATPase / D. M. Fambrough, M. V. Lemas, M. Hamrick // *Am. J. Physiol.* – 1994. – Vol. 3, Pt. 1. – P. 579–589.

Neugebauer J. M. Detergents: an overview / J. M. Neugebauer // *Methods Enzymol.* – 1990. – Vol. 182. – P. 239–253.

Seddon A. M. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera / A. M. Seddon, P. Curnow, P. J. Booth // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – Vol. 1666, № 1–2. – P. 105–117.

Розділ 5

МОДЕЛЬНІ МЕМБРАННІ СИСТЕМИ

Для вивчення властивостей структури та функцій біологічних мембран, їхніх індивідуальних ліпідів, ліпідних сумішей і реконструйованих ліпідно-білкових систем було створено численні модельні мембранні системи. Такі системи дозволяють моделювати різноманітні процеси, які відбуваються в мембранах. Вони мають просту структуру, високу стійкість до дії різних чинників, що дозволяє вивчати функціонування модельних мембранних систем за різних умов експерименту. Модельні мембранні системи можна розділити на три типи: 1) моношари; 2) плоскі бішари; 3) ліпосоми й везикули. Кожна із цих систем і багато їхніх різновидів мають свої переваги й недоліки, проте одержана з їхньою допомогою інформація виявилася дуже цінною при розробленні концепцій, пов'язаних з вивченням біологічних мембран. Такі ліпідні мембранні структури мають бути аналогами природних біологічних мембран.

Для створення моделі біологічної мембрани потрібні такі умови: 1) білки й ліпіди мають розміщуватись у мембрані таким чином, щоб максимально можлива кількість полярних груп контактувала з водою та іншими полярними групами; 2) неполярні вуглеводневі ланцюги ліпідів та бічні радикали амінокислот і білків мають розміщуватися так, щоб максимально унеможливити їхній контакт з водою (Рыбальченко, 1988).

Найпростішою моделлю біологічної мембрани є межа поділу двох рідин, що не змішуються: вода – масло – вода. На цьому принципі базується будова рідинних мембран, які являють собою шар розчинника, що не змішується з водою й розділяє водні розчини. Використовуються також гептанові мембрани, у яких полярний розчинник розмішений між двома розчинами електроліту й відбиває основні властивості гідрофобного компонента біомембран. Проте такі гептанові мембрани не є селективними

щодо катіонів, на відміну від природних біологічних мембран. Тому для моделювання процесів іонного транспорту в гептановий шар вводять різні сполуки, які надають мембрані катіонної селективності. Завдяки цьому стає можливим вивчення електричних характеристик таких систем залежно від складу електроліту. Саме таким чином було вивчено трансмембранне перенесення іонів за допомогою мембраноактивних комплексонів – антибіотиків валіноміцину та нігерицину.

Серед ліпідних моделей біологічних мембран виділяють три типи: 1) моношари ліпідної природи на межі поділу фаз розчин електроліту – повітря; 2) плоскі бішарові ліпідні мембрани; 3) ліпосоми, замкнені везикулярні утворення, які складаються з одного або кількох концентричних бішарів.

5.1. МОНОШАРИ ТА ПЛОСКІ БІШАРОВІ МЕМБРАНИ

Багато молекул із чітко вираженими неполярними властивостями адсорбуються на межі поділу фаз повітря – вода, утворюючи шар товщиною всього в одну молекулу. Найлегше отримати моношар, для цього достатньо нанести на водну поверхню краплину органічного розчинника з ліпідом і дати час розчиннику випаритися. Такий шар можна досліджувати або безпосередньо на межі поділу, або після його перенесення на якусь основу. Фосфоліпіди та інші амфифільні молекули утворюють орієнтовані моношари, у яких полярні групи контактують з водною фазою, а вуглеводневі ланцюги спрямовані в повітря. Молекули фосфоліпідів вільно рухатимуться по поверхні води в тому разі, якщо їх недостатньо для заповнення всієї поверхні, унаслідок чого утворюється двовимірний газ.

Фосфоліпіди утворюють нерозчинні моношари, оскільки концентрація ліпиду у водній фазі є дуже малою. Такі моношари традиційно вивчали за допомогою плівкових ваг Легмюра (кювети Легмюра) (рис. 5.1).

Моношари, які утворилися на межі поділу повітря – вода, можна перенести на тверду основу – на алкілюване предметне скло, наприклад. За рахунок алкілювання поверхня скла стає гідрофобною. Полярні голівки ліпиду після перенесення моношару на таке скло, як і раніше, контактують з водою. У такий спосіб можна досліджувати моношари, перенесені на тверду основу за різних значень поверхневого тиску π .

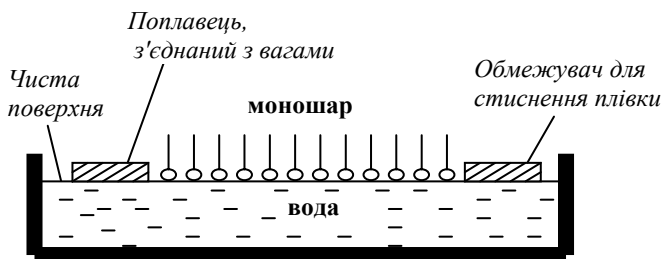


Рис. 5.1. Схематичне зображення моношару, що утворюється у ванні Легмюра (Gaines, 1966).

Полярні голівки занурені у воду, а неполярні звернені в повітря

Плоскі мембрани формували на отворі в гідрофобному матеріалі, який розділяв два розчини електроліту (рис. 5.2.). Концентрований розчин фосфоліпиду вносили в розчинник (наприклад, декан), на перетинку з гідрофобного матеріалу (наприклад, із полістиролу або тефлону) з невеликим отвором діаметром ~ 1 мм. Перетинка розділяла дві камери, які містили водні буферні розчини. Більша частина розчинника переходила у воду, а ліпиди за відповідних умов мимовільно (під дією власної ваги та поверхневих сил) утворювали бішарову плівку, яка затягувала невеликий отвір і сама стоншувалась до товщини бішару. Цей процес є багатостадійним, певним чином він модулює самозбирання мембрани; його можна спостерігати під світловим мікроскопом. Такі мембрани називають бімолекулярними ліпідними мембранами (БЛМ).

Описані мембрани, імовірно, являють собою найбільш адекватну модель біологічних мембран. Базуючись на їхній будові, можна провести реконструкцію різних функціональних мембранних комплексів, оскільки біологічні мембрани містять

у своєму складі ліпідний бішар, причому самозбирання мембран починається саме з його утворення, а потім вже відбувається вбудовування в ліпід білкових, полісахаридних та інших компонентів, що приводить до формування мембранної системи.

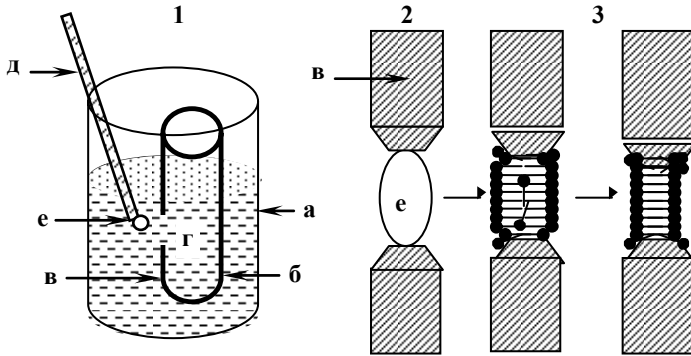


Рис. 5.2. Механізм утворення бімолекулярних ліпідних мембран: а – скляна посудина; б – розчин електроліту; в – тефлонова ємність; г – отвір; д – капіляр; е – краплина фосфоліпідів. Етапи досліді: 1 – на отвір у стінці тефлонової ємності наносять краплину розчину фосфоліпідів за допомогою капіляра; 2 – краплина заповнює провіт отвору; 3 – краплина стонщується з утворенням БЛМ

У перших дослідженнях зі створення штучних фосфоліпідних бішарових мембран застосовували загальну фракцію фосфоліпідів мозку бика. У подальшому використовували фракції ліпідів рослин, різних субклітинних структур – мітохондрій, хлоропластів, плазматичних мембран, а також мікроорганізмів та окремих груп клітин, наприклад "тіней" еритроцитів. Крім того, використовували гомогенні препарати фосфоліпідів: фосфатидилхолін, фосфатидилсерин, фосфатидилетаноламін, холестерин і синтетичні ліпіди (Рыбальченко, 1988). Розчинниками зазвичай виступають *n*-алкани, особливо гептан і декан.

Плоскі мембрани, отримані в такий спосіб, можна брати для вивчення мембранних білків (наприклад, іонних каналів). Проте у них є недолік, який полягає в тім, що вони містять слідові кількості розчинника і є дуже нестабільними, особливо у присутності невеликих кількостей детергентів та інших домішок.

Крім того, у модельних дослідженнях при видуванні розчину фосфоліпідів із трубки з гідрофільного матеріалу, зануреної в розчин електроліту, було сформовано сферичні бішари. Радіус кривизни цих мембран значний (1 см), кривизною їхньої поверхні можна знехтувати. Вони вважаються еквівалентними плоским. Тип використовуваної мембрани залежить від завдань дослідження. Сферичні бішари є найзручнішими для вивчення процесів перенесення речовин і злиття мембран.

5.2. ЛІПОСОМИ

Ліпосоми (лат. – ліпідне тіло) – це сферичні везикули, у яких водний вміст оточений одним або більше бішарами (у більшості випадків фосфатидилхоліну) природних або синтетичних фосфоліпідів. Ліпосоми утворюються, коли фосфоліпіди спонтанно самозбираються у везикули у присутності води, у результаті водне середовище стає оточеним ліпідною мембраною (Segota, 2006) (рис. 5.3).

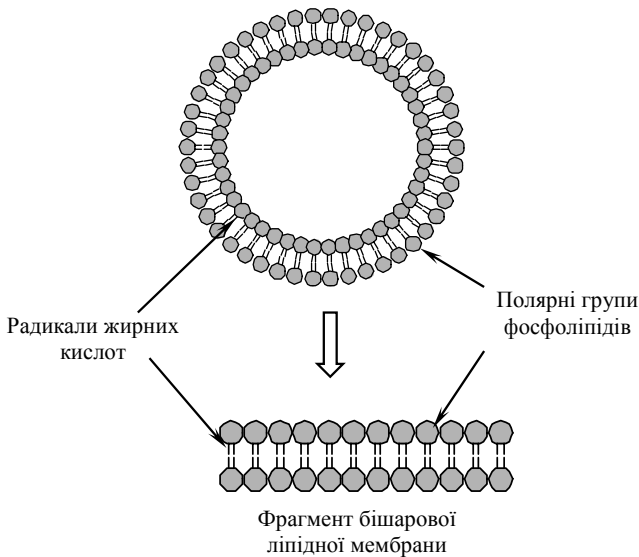


Рис. 5.3. Самодовільна організація фосфоліпідів у везикули у водному розчині

У водному розчині гідрофільні голівки фосfolіпідів експонуються назовні (у водний розчин), а гідрофобні хвости ховаються всередину, унаслідок чого й утворюються мембранні везикули. Уперше ліпосоми було виявлено в 1964 р. англійським ученим А. Бенгхемом з колегами (Bangham, 1964), які спостерігали утворення субмікроскопічних круглих частинок при додаванні води до сухих амфіпатичних речовин, наприклад до фосfolіпідів. Ліпідні оболонки ліпосом захоплюють у себе частину навколишнього водного розчину, а фосfolіпідна мембрана, що їх утворює, має властивості напівпроникного бар'єра, який легко пропускає воду, але перешкоджає дифузії розчинених у ній речовин (рис. 5.4). Структура ліпосом схожа до клітинних мембран, тому їх використовують для вивчення мембран живих клітин.

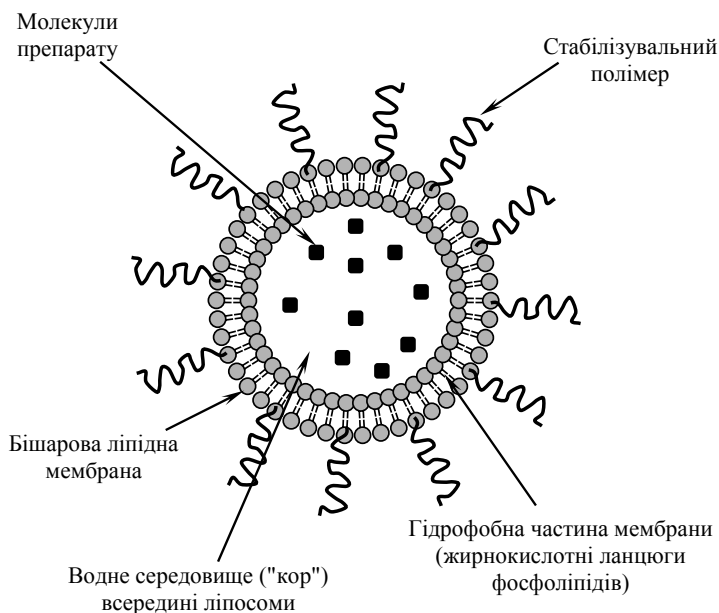


Рис. 5.4. Структура ліпосом

Залежно від методу отримання ліпосоми бувають мульти-, оліго-, уніламельярні й містять відповідно багато, декілька чи один ліпідний бішар. Діаметр ліпідних везикул варіює від 20 нм

до декількох сотень мікрометрів (рис. 5.5). Моноламельярні, великі та гігантські моноламельярні везикули – це везикули, сформовані одинарним бішаром. Малі моноламельярні везикули, (англ., small unilamellar vesicles, SUVs) мають діаметр 25–50 нм, а великі моноламельярні везикули (англ., large unilamellar vesicles, LUV) – 100–200 нм.

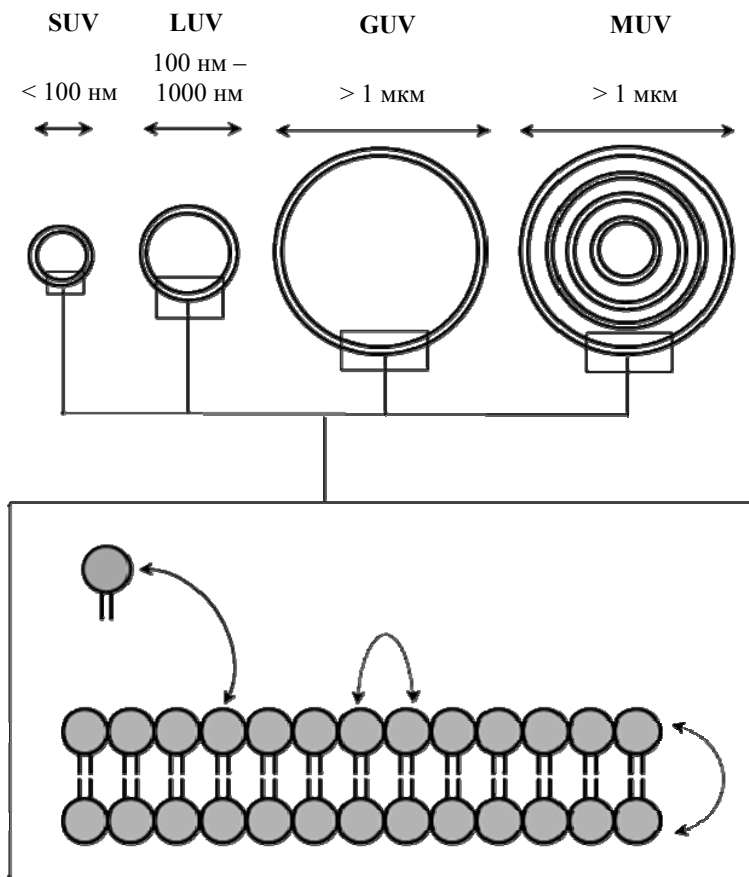


Рис. 5.5. Види ліпосом: SUV – малі моноламельярні везикули, LUV – великі моноламельярні везикули, GUV – гігантські моноламельярні везикули, MLV – мультиламельярні везикули

Гігантські моноламельарні везикули (англ., giant unilamellar vesicles (GUV) розміром з клітину і мають діаметр 1–2 мкм. Мультиламельарні везикули (англ., multilamellar vesicles, MLV), діаметр яких 1–2 мкм, можуть складатися із 10 шарів. Ліпосоми відрізняються за розміром, складом поверхні та кількістю бішарів (Walde, 2001).

Ліпосоми як штучні мембрани мають цілу низку фізико-хімічних характеристик. Властивості ліпосом та їхня поведінка визначаються насамперед наявністю в них замкнутої мембранної оболонки. Деякі властивості ліпосом, такі як рідинні властивості мембрани, розмір, поверхневий заряд, залежать від ліпідного складу та технології виготовлення.

Незважаючи на молекулярну товщину (близько 4 нм), ліпідний бішар відрізняється винятковою механічною міцністю та гнучкістю. Фосфоліпіди в бішарі залежно від температури зазнають фазових змін – від стану гелю за низьких температур до рідинно-кристалічного стану за високих. У рідинно-кристалічному стані бішару його компоненти характеризуються високою молекулярною рухливістю, тому загалом мембрана поводить себе як досить рідка, плинна фаза. Наприклад, у стані гелю ланцюги жирних кислот щільно упаковані, при підвищенні температури вони стають рухливішими, а бішар – тоншим. Завдяки такій структурі бішару ліпосоми зберігають цілісність за різних ушкоджувальних впливів, а їхня мембрана має здатність до самоліквідування структурних дефектів, які в ній виникають (Akbarzadeh, 2013). Разом із тим, гнучкість бішару та його плинність додають ліпосомам високої пластичності. Так, вони змінюють розміри та форму у відповідь на зміну осмотичної концентрації зовнішнього водного розчину. У разі сильного осмотичного стресу цілісність може порушитися і ліпосоми можуть роздібитися на частинки менших розмірів.

У ході утворення ліпосом гідрофільні речовини зазвичай потрапляють у внутрішній водний простір пухирців, а ліпофільні субстанції вбудовуються у фосфоліпідний шар. За відповідного добору ліпідних компонентів утворюються стабільні пухирці, які тривалий час за температури тіла не ушкоджуються в сироватці, зберігаючи свій фармакологічно активний вміст.

5.2.1. Методи отримання ліпосом

Існує багато методів промислового виробництва ліпосом. Основними вимогами до них є створення ліпосом з високою ефективністю, однаковими розмірами, стабільністю протягом тривалого часу та захисними властивостями. На жаль, сьогодні широкомасштабне використання ліпосом для терапії є досі обмеженим, тому що навіть найсучасніші ліпосомальні препарати мають низьку стабільність, високу вартість, велику розбіжність у розмірах, токсичність для організму і низьку ефективність утримання включених до них сполук. Зусилля фармацевтичних компаній спрямовані на розвинення й покращення технологій виробництва високоефективних ліпосом.

Серед методів промислового виробництва ліпосом найпоширенішими є метод Бенгхема (Bangham, 1964), детергентного спустошення (detergent depletion), ефірно-етанольної ін'єкції, обернено-фазового випарювання та метод емульсії (Meure, 2008). Усі ці методи базуються на утворенні ансамблів ліпідів у водному середовищі. Ліпідний розчин утворюють з використанням органічних розчинників, після чого ліпіди диспергують у водному середовищі. Леткі органічні розчинники можуть збільшувати стабільність ліпосом.

Метод Бенгхема, який називають також методом ручного струшування, або тонкошарової гідратації, є одним із найпопулярніших методів отримання ліпосом (Bangham, 1964). Ліпіди розчиняють в органічній фазі, потім видаляють органічний розчинник (здебільшого випарюванням) з утворенням ліпідної плівки (рис. 5.6). Процедура видалення розчинника проводиться у вакуумі й потребує декількох годин. На останньому етапі утворюють дисперсію, гідратуючи ліпідну плівку у водному середовищі. Під час цієї процедури зразок струшують для відокремлення набухаючих везикул від поверхні резервуару, унаслідок чого вони утворюють сферичні структури. Отримані ліпосоми мають діаметр близько декількох мікрон. Цей метод є одним із найпростіших, проте має недолік, пов'язаний з утрудненням видалення розчинника, гомогенізацією та отриманням ліпосом малого розміру.

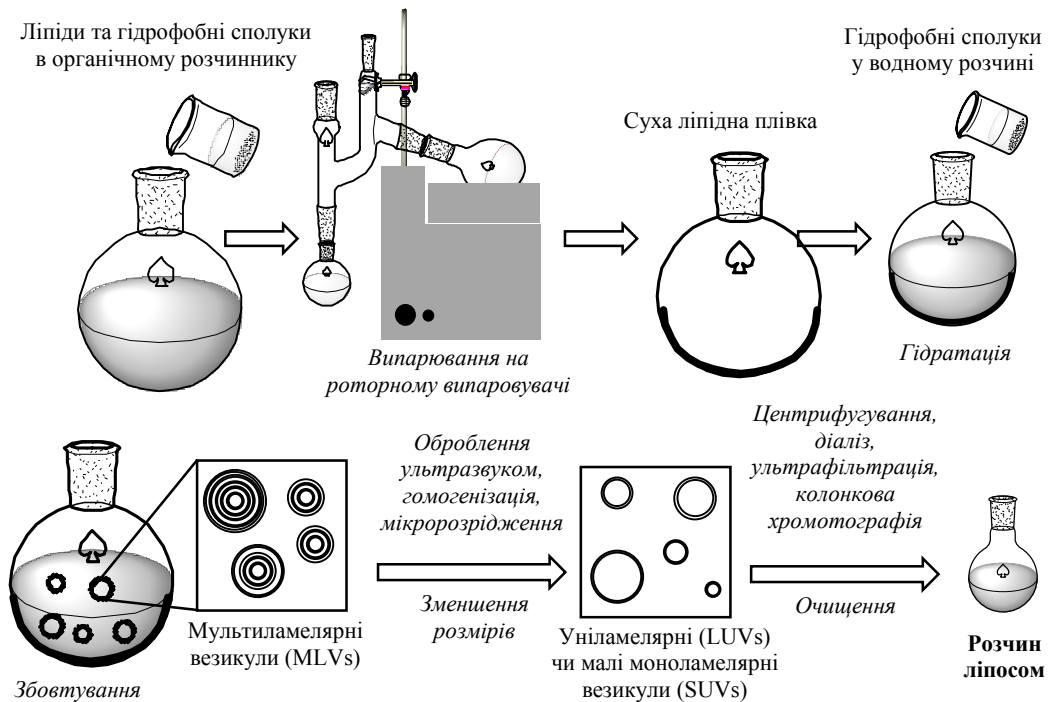


Рис. 5.6. Схема утворення ліпосом шляхом гідратації ліпідів з наступним вортексуванням та ручним струшуванням

Метод детергентного спустошення (англ., detergent depletion) є м'яким методом отримання везикул різної форми й розміру та високогомогенних ліпосом. Він базується на утворенні детергент-ліпідних міцел з наступним видаленням детергенту з ліпосом. Такі міцели можна отримати також при гідруванні ліпідів за допомогою розчинів детергентів або при висушуванні розчинів ліпідів і детергентів, до яких потім до додають водний розчин. Асоціати детергенту з ліпідами захищають гідрофобні частини останніх від взаємодії з водним середовищем, що дає можливість утворюватися міцелам. Для утворення везикул детергент видаляють із міцелярного розчину, розводячи його у 10–100 разів і проводячи діаліз, колонкову хроматографію. Недоліком цього методу є те, що концентрація ліпосом в отриманому розчині дуже низька.

Метод етанольних та ефірних ін'єкцій базується на переході ліпідів в органічну фазу, після чого проводять ін'єкцію ліпідного розчину у водне середовище, отримуючи ліпосоми. Уперше цей метод був описаний Батзрі та Корном (Batzri, Korn) у 1973 р. Етанол уводять у розчин ліпідів за допомогою тонкої голки, тому він рівномірно диспергується у водному середовищі, а отже, рівномірно диспергуються і ліпіди. Але деякі ліпіди погано розчиняються в етанолі, утворюючи гетерогенні ліпосоми. Метод ефірних ін'єкцій відрізняється тим, що ефіри не змішуються з водною фазою, яка при цьому нагрівається, унаслідок чого розчинник видаляється, випарюючись із ліпосомного продукту. Ліпідно-ефірний розчин повільно вводять шляхом ін'єкції у водне середовище, результатом чого є утворення уніламельярних везикул (LUVs). Перевагою цього методу перед методом етанольний ін'єкцій є те, що розчинник видаляється вже під час отримання ліпосом. Це дозволяє одержувати високонцентровані препарати ліпосом з високою ефективністю захоплення препаратів. Процедура ін'єкції в цьому випадку дуже повільна (0,2 мл/хв), при цьому розчинник може охолонути, що викликає утворення мультиламельярних везикул (MLVs). Сучасною модифікацією ін'єкційного методу є введення фосfolіпідного розчину у воду з утворенням уніламельярних везикул діаметром 50–200 нм, які здатні ефективно включати в себе лікарські препарати (Hauschild,

2005). Розроблено ін'єкційні принтери (inkjet printer) – прилади які створюють краплини об'ємом порядку піколітрів.

Сьогодні методи отримання ліпосом суттєво вдосконалено, що дозволяє одержувати ліпосоми бажаного розміру з певними властивостями. Методом заморожування й висушування (freeze drying) монофазного розчину синтезують сухі ліпосоми, які можна зберігати тривалий час. Фосфоліпіди розчиняють у бутиловому спирті й воді-сахарозі з утворенням ізотропного монофазного розчину, після чого цей розчин висушують. Зразок заморожують при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 8 год, висушують за цієї ж температури 48 год, а потім при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ – ще 10 год. Розмір отриманих ліпосом становить від 100 до 200 нм, що набагато менше, ніж у отриманих традиційними методами (Li, 2004).

Метод мікрорідинних каналів дозволяє контролювати утворення ліпосом бажаного розміру (рис. 5.7).

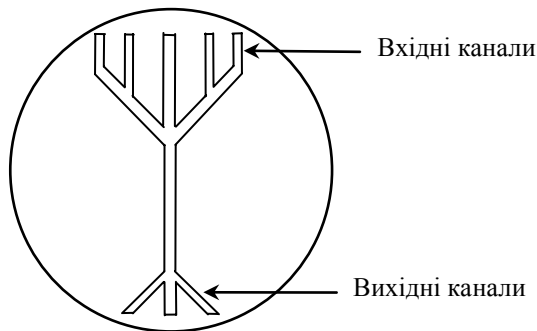


Рис. 5.7. Схематична будова мікрорідинного каналу, що використовується для отримання ліпосом методом Jahn (Jahn, 2007)

Прямокутні мікрорідинні канали глибиною 100 мкм і шириною 46–64 мкм утворюють із силіконових пластин. Нанопори зв'язують із заднім боком силіконової пластини із з'єднують із шприцом за допомогою капілярної трубки довжиною 254 нм. Ліпідний розчин вводять ін'єкцією у центральний канал мікрорідинної сітки, водні розчини – у бічні канали, які перетинаються із центральним. Ліпосоми утворюються, коли на поверхні розділення двох рідких фаз змінюється швидкість потоку і фор-

муються сили зсуву. Потік ліпідів проходить крізь потік спирту, який знаходиться між двома потоками води у мікрорідинному каналі. Струминний потік рідин у каналах дозволяє контролювати дифузне змішування і таким чином створювати ліпосоми певного розміру, змінюючи режими потоків. Регулюючи швидкість потоків фосфоліпідів і водних розчинів у мікроканалах, можна отримати монодисперсні ліпосоми (Jahn, 2007).

5.2.2. Використання ліпосом

Ліпосоми використовують насамперед як модельні системи, в які можна вбудовувати різні білки, а також для створення систем доставки включених у них лікарських препаратів. Вони дозволяють вивчати широкий спектр властивостей природних мембран, які пов'язані в першу чергу із складом і станом фосфоліпідного компонента.

Щоб ліпосоми ефективно знаходили свої клітини-мішені, їхню поверхню модифікують різними способами, утворюючи мічені ліпосоми. Найпоширенішими способами модифікації ліпосом є:

1. Приєднання певних гідрофільних полімерів з дуже гнучким ланцюгом, у результаті можна отримати довгоіснуючі ліпосоми (long-circulating liposomes).

2. Приєднання різних міток або мічених носіїв для моніторингу розповсюдження ліпосом в організмі та у клітині; таким чином отримують мічені ліпосоми, які використовують у діагностиці.

3. Включення як антитіл, так і антигенів до поверхні ліпосом з отриманням імуноаналітичних систем на базі ліпосом.

Ліпосоми є носіями білків і пептидів, що використовуються у багатьох напрямках:

1. Включення білкових і пептидних препаратів у ліпосоми підвищує їхню терапевтичну активність і зменшує їхні побічні ефекти.

2. Інкорпорація білків і пептидів у ліпосоми модулює імунну відповідь проти цих білків і пептидів або до інших антигенів (наприклад, білок- чи пептид-опосередкована активація певних компонентів імунної системи).

3. Приєднання певних білків і пептидів (зазвичай моноклоннальних антитіл та їхніх Fab-фрагментів) до ліпосомальної

поверхні для мічення ліпосом (agentloaded liposomes) забезпечує доставку їх до патологічних ділянок в організмі й навіть усередині клітини.

4. Ліпосомальна доставка ДНК у певні клітини ініціює продукцію терапевтично активного білка (найчастіше ферменту) з метою лікування локального чи системного захворювання.

5. Реконструкція багатьох мембранних білків у ліпосомі дозволяє досліджувати їхнє функціонування *in vivo*.

Ліпосоми популярні не тільки в наукових дослідженнях, насамперед їх широко використовують у медицині та косметології. Вони є ідеальними системами доставляння препаратів у клітини тіла, оскільки ці структури подібні за будовою до клітинних мембран. Ліпофільні препарати можна включати всередину ліпідних бішарів, а гідрофільні препарати можуть бути солюбілізовані у внутрішньому водному середовищі (Chang, 2012). При включенні до ліпосом лікарських препаратів їхній терапевтичний індекс значно зростає. Ліпосоми нетоксичні, вони здатні підлягати біодеградації, а тому ефективно використовуються для солюбілізації препаратів, що мають низьку розчинність у воді. Вони захищають від руйнування в організмі сполуки, які при введенні у кровотік у вільній формі швидко розщеплюються, а також суттєво зменшують їхню токсичність. Доставка лікарських препаратів за допомогою ліпосом зменшує накопичення їх у чутливих тканинах, змінює їхній розподіл в організмі та впливає на вивільнення, збільшує біодоступність і, найголовніше, спрямовує надходження їх саме в певну тканину-мішень. Сотні фармакологічних препаратів, включаючи протиракові та протимікробні ліки, хелатуючі агенти, пептидні гормони, білки і ферменти, вакцини, генетичний матеріал, можуть бути включені у водні та ліпідну фази ліпосом з різним складом та властивостями, що забезпечить їхню селективну доставку до тканини-мішені та уможливило застосування їх *in vivo*.

Вивільнення препаратів, їхня стабільність *in vivo* та розповсюдження в організмі залежать від розміру везикул, гідрофобності їхньої поверхні та плинності їхніх мембран. Проникність ліпосомальної мембрани можна регулювати, змінюючи склад її фосфоліпідів. Стабільність ліпосом і час їхньої циркуляції

у кровотоці можна збільшити додаванням холестеролу й гідрофільних полімерів із гнучким вуглеводневим ланцюгом, наприклад поліетиленгліколю. Холестерол зменшує дефекти упакування ліпідного бішару. Структуру ліпосом стабілізують, включаючи до них спеціальні стабілізувальні полімери, які перешкоджають взаємодії клітин крові з поверхнею цих частинок. Для того, щоб ліпосоми знайшли в організмі свої клітини-мішені, у них має бути довгий час циркуляції у кровотоці, це є особливо важливим для їхнього застосування у терапії раку.

Велику увагу приділяють можливості застосуванню ліпосомальної доставки препаратів у ветеринарній медицині. Крім терапевтичної мети, ліпосоми можуть бути використані для введення дієтичних добавок у тваринний організм. Дослідження, проведені на телицях, показали, що оральне введення їм ліпосомального α -токоферолу підвищує концентрацію цього важливого вітаміну у плазмі крові на тривалий час.

5.2.2.1. Довгоіснуючі ліпосоми – ліпосоми-невидимки (stealth liposomes)

При застосуванні ліпосом як носіїв фармакологічних препаратів перед дослідниками постала проблема, пов'язана з часом їхнього існування у кровотоці. Ліпосоми впізнаються мононуклеарними фагоцитами після контакту з білками плазми крові й тому видаляються із кровотоку. Для досягнення тривалої циркуляції ліпосом *in vivo* було застосовано цілий ряд підходів. Їхні мембрани мітили інертними, біологічно сумісними із тканинами організму полімерами, такими як поліетиленгліколь (PEG). Він формував захисний шар на ліпосомальній поверхні й тому пригнічував упізнавання ліпосом опсонінами та зменшував кліренс ліпосом. Опсоніни – це білки (антитіла IgA, IgG, C-реактивний білок (білок гострої фази), лектин і C3b, C4b, iC3b компоненти комплементу), які посилюють фагоцитоз бактерій і корпускулярних антигенів, сприяючи їхньому зв'язуванню з фагоцитами. Кліренс – показник швидкості очищення біологічних рідин і тканин організму. Захисні полімери, якими модифікують ліпосоми, мають гнучкий ланцюг, тому вони

утворюють на їхній поверхні непроникний шар. Довгоіснуючі ліпосоми мають дозозалежну, ненасичуючу й нелінійну кінетику та підвищену біодоступність.

Ліпосоми-невидимки (англ., *stealth liposomes*) складаються із природних фосфоліпідів та змішаних ліпідних сумішей, укритих полімерами PEG, і за природою є колоїдами. Вони дозволили здійснювати доставку й контрольоване вивільнення фармакологічних препаратів (Immordino, 2006). Прикладом таких ліпосом є препарат Doxil (Janssen Biotech, Inc., Horsham, USA) або Caelyx (Schering-Plough Corporation, Kenilworth, USA), які використовуються для лікування солідних пухлин (Akbarzadeh, 2013). Навантажені кортикостероїдами довгоіснуючі ліпосоми проявили ефективність на експериментальній моделі артриту. Довгоіснуючі ліпосоми можуть бути резервуарами терапевтичного агента, які подовжують його дію.

Крім системи мононуклеарних фагоцитів, довгоіснуючі ліпосоми можуть пасивно накопичуватися в інших органах і тканинах. Цей феномен називається пасивним міченням і має особливе значення для терапії пухлин, які підлягають ангиогенезу (див. підрозд. 5.2.2.2).

Поширеною проблемою при застосуванні довгоіснуючих ліпосом є підвищений кліренс у крові (англ., *accelerated blood clearance*, ABC), який супроводжується неочікуваною імуногенністю PEG-ліпосом і наночастинок. При повторному введенні їх в організм продукуються IgM проти PEG, що змінює фармакокінетику таких ліпосом, зменшує терапевтичну ефективність інкапсульованих у них ліків через порушення розповсюдження у тканинах. Нещодавно замість PEG-ліпосом було застосовано ліпосоми, модифіковані полігліцеролом (PG) і виявилось, що при повторних ін'єкціях вони не викликають явища ABC. Навантажені абіціномбіцином укриті PG ліпосоми виявили протипухлинну активність навіть більшою мірою, ніж PEG-ліпосоми.

Сьогодні довгоіснуючі ліпосоми всебічно досліджені й широко застосовуються як у наукових дослідженнях *in vitro* та *in vivo*, так і в клініці.

5.2.2.2. Використання ліпосом для лікування раку

Завдяки здатності здійснювати спрямовану доставку ліків та спроможності посилювати розчинність протиракових препаратів, що погано розчиняються у волі, ліпосоми використовують для поліпшення терапії пухлин. Виявилось, що навіть коли ліпосоми не мічені клітинно-специфічними лігандами, властивими даній пухлині, вони все одно надходять у неї й накопичуються там. Тому ліпосомальне мічення пухлин (liposomal tumor targeting) вважається пасивним процесом і залежить від того, скільки часу ліпосоми перебувають у судинній сітці пухлини (Torchilin, 2005). Тому, змінюючи фізико-хімічні властивості ліпосом, можна посилити їхню здатність до тривалої циркуляції у кровотоці. Класичні ліпосоми найчастіше елімуються із циркуляції за участю мононуклеарних фагоцитів крові, що зменшує ефективність доставки препаратів. Для уникнення цього в поверхню ліпосом включають вуглеводи, наприклад моносіалогангліозиди, або такі полімери, як поліетиленгліколь (PEG). Такі ліпосоми циркулюють довше, ніж класичні.

Як уже йшлося вище, довгоіснуючі ліпосоми меншою мірою підлягають утилізації макрофагами ретикулоендотеліальної системи, що сприяє пасивному спрямуванню цих везикул до пухлини (пасивне мічення). Дискретна ендотеліальна вистілка кровоносних судин пухлини під час ангіогенезу забезпечує трансудацію (вихід із судин у тканини) ліпосом у тканину пухлини й можуть селективно накопичуватися в її інтерстиції. Оскільки в пухлині лімфатичний дренаж недостатній, там вони накопичуються і функціонують як системи пролонгованого вивільнення препаратів.

Зв'язуючи специфічні ліганди рецепторів мембран пухлинних клітин, отримують ліпосоми, які спрямовано мічені саме до пухлини (Tan, 2009). Таким чином ліпосоми дозволяють уникнути деградації та інактивації препаратів при введенні їх в організм, збільшуючи їхню біодоступність та посилюючи вивільнення саме в патологічній ділянці-мішені. Це посилює ефективність препаратів і зменшує їхню токсичність.

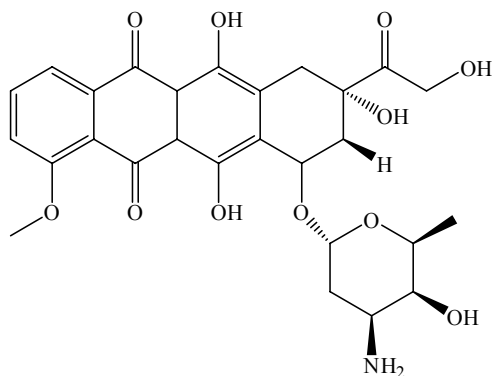
Для мічення ліпосом найчастіше використовують саме поліетиленгліколь, а не моносіалогангліозид, через легкість отри-

мання, низьку вартість, контрольовану молекулярну масу та здатність зв'язуватися з ліпідами чи білками, включаючи антитіла. Довгоіснуючі ліпосоми, що містять PEG2000, мають діаметр 100~200 нм і здатні ефективно акумулюватися у таких пухлинах, як рак товстого кишечника. За фізіологічних умов малі ліпосоми розміром 100~200 нм з довгим часом півіснування в кровотоці здатні виходити із дискретних капілярів при пухлинному ангіогенезі. Препарат Doxil®, що являє собою доксорубіцин, інкапсульований у PEG-ліпосоми, запропонований для клінічного використання у США та Європі при лікуванні саркоми Капоші, раку яєчників та молочної залози (Fang, 2006).

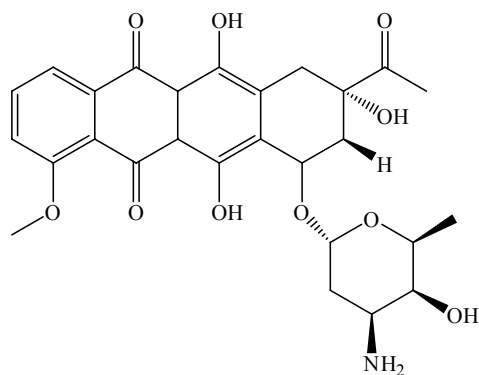
Ліпосоми застосовуються як носії сполук платини цисплатину (cisplatin) та оксаплатину (oxaplatin), антрациклінів доксорубіцину (doxorubicin) і даунорубіцину (daunorubicin), похідних паклітакселу (paclitaxel) і камптотецину (camptothecin), антиметаболітів метотрексату (methotrexate) і цитарабіну (cytarabine), алкалоїдів вінкристину (vincristine) і вінбластину (vinblastine), що є цитостатиками і застосовуються для хемотерапії раку (рис. 5.8). Як було вказано вище, ліпосоми змінюють тканинне розповсюдження інкапсульованого препарату, яке визначається саме властивостями ліпосом. При цьому ліпосоми зменшують токсичні побічні ефекти цих препаратів, не зменшуючи їхньої ефективності.

Застосування ліпосом, модифікованих фолатом, є популярним підходом у терапії пухлин, оскільки фолатні рецептори часто експресуються у низці пухлинних клітин. Інкапсульовані в ліпосоми даунорубіцин та доксорубіцин доставляються у пухлинні клітини через фолатні рецептори і проявляють високу цитотоксичність. Для лікування гострої мієлогенної лейкемії був застосований комбінований підхід: модифіковані фолатом і навантажені доксорубіцином ліпосоми вводили в організм, паралельно викликали індукцію фолатних рецепторів трансретиноевою кислотою. Нещодавно було встановлено, що такі модифіковані ліпосоми при систематичному введенні посилюють вивільнення доксорубіцину *in vivo* – у мишей, які мали карциному людини, причому це відбувається саме в пухлині.

Імуноліпосоми. Для посилення накопичення препаратів у певних органах і тканинах використовують мічені ліпосоми (targeted liposomes), до поверхні яких приєднують ліганди, здатні впізнавати і зв'язуватися з обраними клітинами-мішенями (рис. 5.9). Імуноглобуліни класу G (IgG) та їхні фрагменти найчастіше використовуються для мічення ліпосом. Їх можна приєднувати до ліпосом без зміни чистоти останніх та без порушення властивостей антитіл.



Доксорубіцин



Даунорубіцин

Рис. 5.8. Структура антрациклінів, що використовуються як протипухлинні препарати

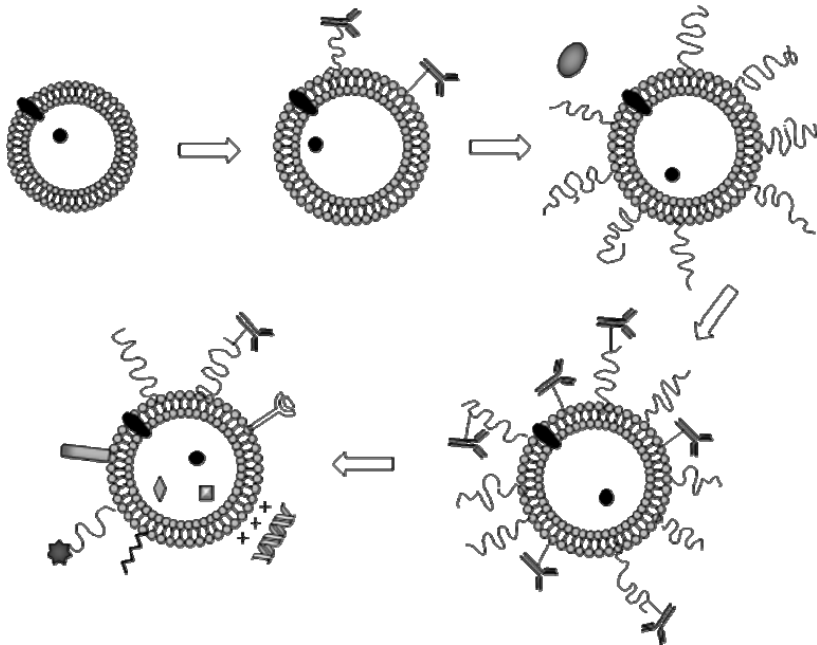


Рис. 5.9. Еволюція ліпосом (Torchilin, 2005)

Включення різних молекул-міток у поверхню ліпосом відновлює мультивалентне зв'язування фрагментів моновалентних антитіл і тому збільшує авідність зв'язування антигенів-мішеней. Такі ліпосоми називаються "імуноліпосомами".

Антитіла зв'язують ковалентно з ліпосомальною поверхнею або впроваджують у бішар ліпосомальної мембрани після модифікації неполярних амінокислотних залишків, де вони закріплюються за рахунок гідрофобних взаємодій. Проте велика кількість імуноліпосом накопичуються у печінці, оскільки часу на взаємодію міченої ліпосоми з її мішенню буває недостатньо. Цю проблему вдається подолати, використовуючи довгоіснуючі ліпосоми.

Для оптимізації властивостей імуноліпосом тепер застосовують моноклональні антитіла, що дозволяє здійснювати більш ефективну спрямовану доставку ліків до клітин-мішеней. Імуноліпосоми мітять моноклональними антитілами, які мають уніка-

льні сигнальні властивості: інгібування репарації ДНК, індукції припинення клітинного циклу, індукції апоптозу тощо. Це викликає протипухлинний ефект, причому може виникати синергізм з цитотоксичним ефектом ліпосомальних протиракових препаратів (Fang, 2006). Сьогодні отримано велику кількість моноклональних антитіл, що важливо для терапії пухлин. Новим здобутком у цій галузі є антитіла, які інтерналізуються (internalizing antibodies). Вони підвищують ефективність ліпосомальних препаратів, що було показано на клітинах В-лімфоми. Антитіла CC52, спрямовані проти клітин лінії CC531 аденокарциноми товстого кишечника щурів, було приєднано до PEG-ліпосом, після чого останні специфічно накопичувалися в метастазах CC531 на моделі щурів. Імуноліпосоми, які містили протипухлинний агент фенретинід (fenretinide), мічені гангліозидом GD2, викликали апоптоз у клітинних лініях нейробластоми й меланоми і продемонстрували потужну антинейробластомну активність як *in vitro*, так і *in vivo* у мишей.

5.2.2.3. Застосування ліпосом для доставки генів

Ця галузь застосування ліпосом є надзвичайно широкою. Хоча найпоширенішими системами доставки генів є віруси, сьогодні розробляється цілий ряд інших підходів, серед яких важливе місце посіли ліпосоми. Сучасні дослідження спрямовані на вивчення детальних механізмів доставки генів, збирання комплексів ліпосома-ДНК та збільшення ефективності трансфекції. Для підвищення терміну існування ліпосомальних препаратів, здатних ефективно доставляти ДНК у клітини мішені, пре-конденсовану ДНК було інкапсульовано в катіонні PEG-ліпосоми. Було запропоновано полікатіонні ліпосоми, модифіковані цетилополіетиленіміном, який заякорюється у мембрані за допомогою цетилових залишків і завдяки своєму позитивному зарядові зв'язується з цукрово-фосфатним остовом ДНК. Такі ліпосоми добре навантажувались ДНК і проявляли високу ефективність трансфекції. Ліпосоми використовують також для доставки антисмислових нуклеотидів до специфічних тканин, наприклад

при лікуванні нейробластоми. Такі ліпосоми в центральній частині містили катіонні фосфоліпіди, зв'язані з олігонуклеотидами, і зовнішню оболонку з нейтральних ліпідів. Також ці ліпосоми було мічено моноклональними антитілами проти нейробластомних антигенів, їхніми мішенями були антигенпозитивні клітини як *in vitro*, так і *in vivo*.

Сучасні дослідження спрямовані на розробку ліпосомальних систем доставки малих інтерферуючих РНК (siRNA). siRNA мають високий потенціал для використання їх як терапевтичні молекули проти генетичних захворювань, пов'язаних із раком. Проте ефективних систем доставки досі не запропоновано. Оскільки катіонні ліпосоми можуть селективно зв'язуватися з ангіогенними судинами пухлин, увага дослідників зосереджена на створенні систем доставки siRNA саме з використанням таких ліпосом, що дозволить удосконалити ангіогенну терапію раку. Було синтезовано siRNA-lipoplexes – укриті поліетиленгліколем катіонні ліпосоми, які містили siRNA проти гена Argonaute2, здатні викликати апоптоз. На мишиній моделі було вивчено їхню авідність до ангіогенних кровоносних судин карциноми легень Льюїса. Було показано, що такі ліпосоми проявляють значний антиангіогенний ефект без серйозних побічних ефектів, що приводить до пригнічення росту пухлини (Tagami, 2012).

5.2.3. Ліпосоми нового покоління

5.2.3.1. Віросоми

Нині інтенсивно проводиться створення віросом з метою поліпшення мічення тканин, для чого поверхню ліпосоми модифікують фузогенними вірусними оболонковими білками. Віросоми являють собою штучну оболонку (envelope) вірусу, який, однак, нездатний продукувати його нові покоління (рис. 5.10). Вони здатні вводити інкапсульовані препарати в цитоплазму клітини, використовуючи здатність вірусної оболонки зливатися з клітинною мембраною. Крім того, фактори, що вивільнюються

із них (virus-derived factors), виступають як адьюванти і викликають імунну стимуляцію.

Спочатку віросоми були спрямовані на внутрішньоклітинну доставку препаратів і ДНК (Sarkar, 2002), пізніше вони стали основою для створення нових вакцин. Виявилось, що доставка білків до імунної системи за допомогою фузогенних (fusion-acting) ліпосом є дуже ефективною. Виходячи з цього, було розроблено цілий ряд вакцин для тварин і людини на базі віросом (Torchilin, 2005). Наприклад, віросоми, які містять білки "шипів" вірусу грипу, забезпечують доставку вакцини проти цього вірусу і зумовлюють появу високих титрів специфічних антитіл у крові. Подібно було створено віросомальну вакцину проти вірусу гепатиту А, яка також викликала високі титри антитіл при вакцинації немовлят і дітей раннього віку, а також здорових дорослих людей і літніх осіб. Включення інших антигенів у віросоми, що містять антигени вірусу грипу, є основою для отримання інших вакцин.

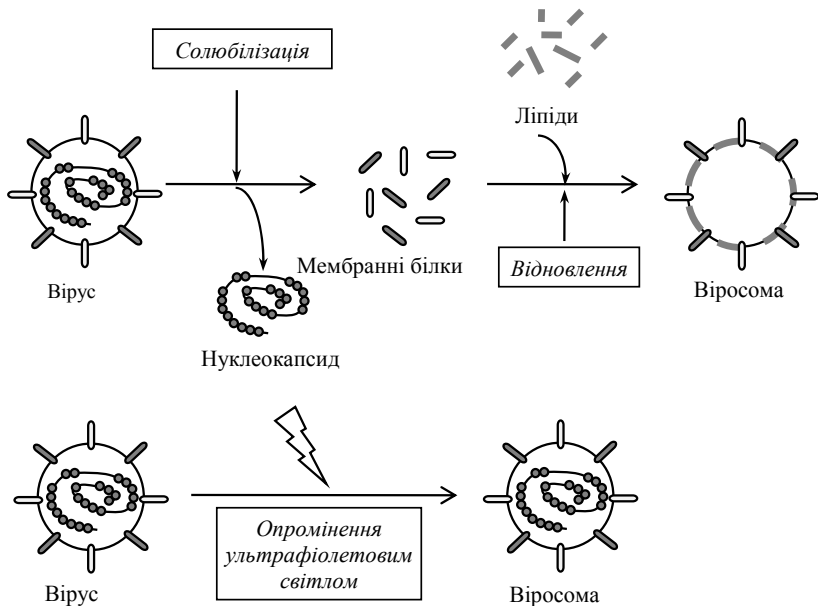


Рис. 5.10. Механізм утворення віросом (Saga, 2013)

Велика кількість віросом застосовується як системи доставки ліків та як адьюванти при терапії раку. Як приклад можна навести віросоми на базі вірусів грипу і Сендай (Saga, 2013). За допомогою їх у пухлинні клітини можна внести гени, які відповідають за синтез імунних активаторів (цитокінів) та індукторів апоптозу.

Отже, віросоми надають унікальну можливість здійснювати ефективну доставку і вірусних антигенів, і різних фармакологічних препаратів, включаючи нуклеїнові кислоти та цитотоксичні препарати, хоча мають недоліки, пов'язані з низькою стабільністю, негерметичністю та імуногенністю.

5.2.3.2. Ліпідні наночастинки

При використанні ліпосом для спрямованої доставки ліків може виникати цілий ряд проблем. Наприклад, вони можуть утворювати агрегати, включені в них препарати зазнають деградації при зберіганні. Це обмежує використання ліпосом як внутрішньовенозних носіїв ліків. Як альтернативний метод спрямованої доставки було запропоновано *тверді ліпідні наночастинки* (англ., *solid lipid nanoparticles, SLN*). Вони складаються із твердих ліпідів, стабілізованих в емульгуючий шар у водній дисперсії, що надає їм подібності до наноемульсії, у якій внутрішній рідкий ліпідний шар заміщено на твердий ліпід (Martins, 2007). Використання твердих ліпідів замість рідких (олій) надає утвореним везикулам ряд переваг. Зокрема, це спрощує контроль вивільнення препаратів, оскільки мобільність останніх у рідких ліпідах значно нижча. SLN складаються із твердих ліпідів і мають субмікронний колоїдний розмір у межах 50–1000. Вони складаються з фізіологічних компонентів, їх можна легко і швидко отримувати, варіюючи їхній розмір, при отриманні не потрібно застосовувати органічні розчинники, а також є можливим утворення концентрованих ліпідних суспензій. Недоліками SLN є низька концентрація препарату, яку можливо навантажити: вона є обмеженою, тому що такі частинки утворені ліпідним кристалічним матриксом. Ефективність SLN зменшує також присутність альтернативних колоїдних структур (міцел, ліпосом, змішаних міцел, нанокристалів препаратів) у водній диспе-

рсії, зміни фізичного стану ліпідів. Це зменшує стабільність наночастинок і створює проблеми при зберіганні їх та введенні в кровотік (гелеутворення, зміна розміру частинок, вивільнення препаратів). Розведення зразка у воді або, навпаки, видалення води, значно змінює рівновагу між різними видами колоїдів і фізичним станом ліпиду. Твердий кор містить препарат, розчинений або диспергований у ліпідному твердому матриксі, що легко плавиться. Залежно від типу і концентрації ліпиду, для фізичної стабілізації системи додають від 0,5 до 5% емульгатора (сурфактанту). Такими агентами є полісорбат 80, лецитин, полігліцерол метилглюкодістеарат, ефіри сахарози і жирних кислот.

Другим поколінням ліпідних наночастинок є *наноструктурні ліпідні носії* (англ., *nanostuctured lipid carriers, NLC*). Їх отримують не із твердих ліпідів, а із суміші рідких (олій) і твердих у пропорції, за якої суміш є твердою при 40 °С. Перевагами таких систем доставки є утримання високих концентрацій препаратів, оскільки структура наночастинок не є жорсткою. Ліпідний матрикс надає частинкам більшої гнучкості, що важливо для завантаження препаратів, їхнього вивільнення та запобігання їхнього витоку.

Подібно до твердих наночастинок, твердоматриксні SLN і NLC захищають інкорпоровані препарати від хімічної деградації, що дозволяє задавати бажаний режим їхнього вивільнення. Ліпідні наночастинки тестують, уводячи їх в організм різними способами: орально, перорально, пульмонально, окулярно, дермально. Актуальними напрямками є застосування їх для генної терапії та як адьюванти для вакцин (Martins, 2007). Ліпідні наночастинки показали високу ефективність при застосуванні як *in vitro*, так і при ін'єкціях їх мишам і щурам. Наночастинки можуть накопичуватися у тканинах-мішенях відповідно до тропізму до клітин організму та своїх біосинтетичних властивостей (пасивне мічення). Поліпшення селективності наночастинок може бути досягнуто введенням у ліпідну поверхню гідрофільних полімерів або зшивку з лігандами-мітками. Ліпідні наночастинки можна вкривати поліетиленгліколем чи хітозаном.

Розробляються системи доставки білків з терапевтичною метою у складі ліпосом і наночастинок. Доставка пептидів і білків

утруднена, оскільки потребує інших підходів до мікроінкапсулювання. Більшість білків гідрофільні й можуть адсорбуватися на поверхні, тому це зменшує кількість молекул, які можуть бути доставлені у складі наночастинок. Вміст інкорпорованого пептиду або білка залежить від його фізико-хімічних властивостей і методу інкапсулювання. Для орального й парентерального введення білків використовуються колоїдні носії, що складаються з ліпідів. Наноінкапсулювання у колоїдні частинки захищає їх від оточення у шлунково-кишковому тракті й полегшує транспорт крізь слизову кишечнику.

5.2.4. Ліпосомальні білки й пептиди

У клінічному аспекті важливою є здатність ліпосом включати різні білки. Серед білків, які було включено до ліпосом, слід указати бичачий сироватковий альбумін, кальцитонін, основний фактор росту фібробластів, антиовальбумінові антитіла, енкефалін, рецептор епідермального ростового фактора, гемоглобін, інсулін, фактор росту нервів, супероксиддисмутаза тощо (Martins, 2007).

Ферменти, інкапсульовані в ліпосомах, потенційно здатні входити в цитоплазму чи лізосоми живих клітин. Це надає можливість створити нові методи лікування спадкових хвороб, пов'язаних із порушенням функціонування внутрішньоклітинних ферментів, а також раку. Так, використання ліпосомально інкапсульованої аспарагінази збільшує виживання тварин з аспарагінзалежними пухлинами P1534. До того ж, інкапсулювання ферменту в ліпосоми запобігає утворенню антиаспарагіназних антитіл.

Цікавий підхід було застосовано для терапії пухлин за допомогою ліпосомальних ферментів. Він називається антитіло-спрямована ферментна терапія пропрепаратами (англ., antibody-directed enzyme prodrug therapy, ADEPT). Її метою є місцева активація хімічно модифікованих похідних фосфоліпідів різними протираковими та противірусними агентами. Фосфоліпідні проліки (prodrugs) інкорпують у ліпосомальну мембрану, після чого вони нездатні виходити із ліпосом у водну фазу й не підлягають деградації. Поблизу пухлинних клітин із неактивних проліків утворюються активні цитотоксичні мо-

лекули. Для цього в ліпосоми мітять кон'югатом пухлиноспецифічних антитіл з ферментом, який перетворює неактивний препарат на активний (Fonseca, 2003). Для підвищення ефективності роботи ферменту саме в пухлині такі імуноліпосоми додатково навантажують цим ферментом; ці структури називаються імуноензимоліпосоми.

Включення інсуліну в ліпосоми полегшує його доставку в печінку, подовжує його дію в організмі, а також збільшує його адсорбцію при оральному введенні. Для збільшення біодоступності орального ліпосомального інсуліну ліпосоми були вкриті поліетиленгліколем або муцином. У доклінічних дослідженнях на мишах було з'ясовано, що введення такого препарату викликає тривале зниження рівня глюкози у крові.

Часто в ліпосоми включають цитокіни. Інкорпорація в ліпосоми рекомбінантного інтерлейкіну-2 посилює час його циркуляції у крові у 8 разів. PEG-ліпосоми було використано для орального введення рекомбінантного епідермального фактора росту людини. Ліпосомальні системи є зручними засобами доставки цитокінів, що дозволяє використовувати їх для імунотерапії. Уведення цитокінів у складі ліпосом дає можливість уникнути токсичних побічних ефектів, що виникають при системному введенні цитокінів в організм. Навантажені цитокінами ліпосоми доставляють їх до фагоцитів, посилюючи протимікробну та протипухлинну відповідь. Такі інкапсульовані цитокіни є адьювантами, що посилюють гуморальну імунну відповідь при вакцинації проти вірусних і бактеріальних патогенів. Особливо актуальним є використання ліпосом для імунотерапії раку, метою якої є індукція адаптивної імунної відповіді для елімінації пухлини та пригнічення росту метастазів. Ліпосоми, що містили інтерлейкін-2 були безпосередньо вводилися ін'єкцією в метастазуючу неімуногенну меланому B16, що збільшило виживання тварин, пригнічувало пухлинний ріст і посилювало рекрутування Т-лімфоцитів і гранулоцитів до пухлини. Інкапсульовані в ліпосоми цитокіни вводять у складі протипухлинних вакцин, наприклад, ліпосомальний інтерферон- γ індукував системну імунну відповідь у клітинах меланому B16.

5.3. НАНОДИСКИ

Будова нанодисків. Нанодиски є модельними мембраноподібними структурами, які застосовують для утримання мембранних білків у розчинній формі з метою подальшого використання. Вони отримали свою назву, оскільки характеризуються дискодібною формою і нанорозмірами. Нанодиски – це бішари фосфоліпідів, обмежені двома молекулами амфіпатичних α -спіральных білків, що оточують такий бішаровий диск на зразок поясу й обмежують тим самим його розмір (рис. 5.11).

До складу нанодисків входять такі фосфоліпіди, як пальмітоолеїлфосфатидилгліцерол/1-пальмітоолеїл-2-олеїл-sn-гліцеро-3-фосфохолін (POPC/POPG). Вони є природними компонентами еукаріотичних клітинних мембран і використовуються для біофізичних експериментів, зокрема для вивчення структури ліпідних рафтів.

До нанодисків було вбудовано велику кількість мембранних білків: цілий ряд рецепторів, спряжених з G-білками (родопсин, β -адренорецептор, метаботропний рецептор глутамату, бактеріородопсин, цитохром P450, бактеріальні хеморецептори, холерний токсин, нейрамінідаза вірусу грипу та ін. (Mitra, 2013), (Zocher, 2012).

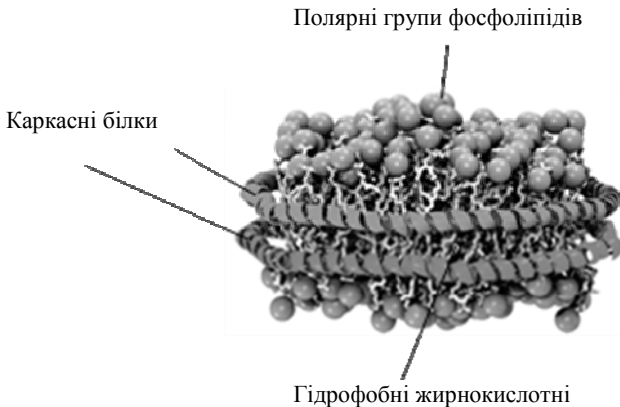


Рис. 5.11. Схематичне зображення нанодиска. Дві молекули α -спіральных каркасних білків (scaffold proteins) оточують нанодиск (Shih, 2007)

Наночастинки, подібні до нанодисків, зустрічаються *in vivo*, циркулюючи у крові, і являють собою ліпопротеїни високої щільності (ЛПВЩ). Вони синтезуються у печінці й транспортують холестерол у кровотоці до печінки для подальшої деградації. Коли ЛПВЩ утворюються, вони мають дископодібну форму, а при включенні до них ефірів холестеролу стають сферичними. Ліпідний бішар ЛПВЩ складається із багатьох фосфоліпідів та холестеролу, він оточений каркасним білком аполіпопротеїном А-1. Перші штучно синтезовані нанодиски було отримано із суміші двох фосфоліпідів, які утворювали бішар. Такий бішар оточували аполіпопротеїном А-1. Змінюючи довжину цього білка, який назвали мембранним каркасним білком (англ., Membrane Scaffold Protein, MSP), згодом отримали нанодиски різного розміру. Крім того, дослідники змінювали склад фосфоліпідного бішару, використовуючи суміш цвітер-іонних і негативно заряджених ліпідів.

Переваги нанодисків. Включення інтегральних мембранних білків у нанодиски має цілий ряд переваг перед традиційними методами, такими як солюбілізація у детергентні міцели і ліпосоми (Mitra, 2013). На відміну від останніх, нанодиски створюють оточення для мембранних білків, що більш схоже на нативне. Нанодиски стабільніші, ніж ліпосоми. Вони більш гомогенні за розміром, оскільки для створення їх використовують каркасні білки фіксованої довжини. Крім цього, у нанодисках відсоток ліпідів, зв'язаних із білками, близький до такого у біологічних мембранах. Отже, нанодиски краще відображають структуру цих мембран, ніж ліпосоми.

Білки, включені в нанодиски, мають більшу стабільність і активність (Mitra, 2013). Вони можуть підлягати контрольованій олігомеризації, тому завдяки нанодискам стає можливим вивчення впливу мономеризації/димеризації на функціонування мембранних білків. Кількість молекул мембранних білків у кожному нанодиску може бути контрольована зміною співвідношення ліпід/білок. Склад ліпідів навколо білка в нанодиску можна точно задавати. Нанодиски забезпечують доступ до поза- та

внутрішньоклітинних ділянок білкової молекули, що дозволяє вивчати взаємодію з ними лігандів.

Синтез нанодисків. Нанодиски створюють, змішуючи фосфоліпідно-детергентні міцели і мембранні каркасні білки, після чого відокремлюють детергент. Розмір нанодисків залежить від довжини каркасного білка, який "накручується" на диск. Співвідношення фосфоліпідів і мембранних каркасних білків є критичним фактором для збирання нанодисків. Його слід визначати для кожної нової комбінації досліджуваного білка, фосфоліпідів і мембранного каркасного білка. Для того, щоб у нанодиск включити білок, його солюбілізують у детергентні міцели, їх додають до суміші нанодисків до видалення детергенту (рис. 5.12). Також слід урахувувати співвідношення фосфоліпідів і мембранних каркасних білків, його визначають для кожної нової комбінації інтегрального мембранного білка, фосфоліпідів і мембранного каркасного білка.

Як мембранний каркасний білок використовують модифікований рекомбінантний аполіпропротеїн А-1 із крові людини, який клонують у бактеріальних клітинах (*E. coli*). Фосфоліпідами нанодисків є цвітер-іонні фосфатидилхоліни (1-пальмітоїл-2-олеїл-sn-гліцеро-3-фосфохолін (POPC), 1,2-диміристоїл-sn-гліцеро-3-фосфохолін (DMPC), 1,2-диміристоїл-sn-гліцеро-3-фосфохолін (DMPC), дипальмітоїлфосфатидилхолін (DPPC)) або суміші цвітер-іонних і негативно заряджених ліпідів (1-пальмітоїл-2-олеїл-sn-гліцеро-3-фосфохолін (POPS), 1-пальмітоїл-2-олеїл-sn-гліцеро-3-фосфогліцерол (POPG), 1,2-діолеїл-sn-гліцеро-3-фосфогліцерол (DOPG)). Суміші цвітер-іонних і негативно заряджених ліпідів утворюють бішари, найбільш схожі за структурою до природної мембрани.

Як детергенти застосовують холат, дезоксихолат, CHAPS, октилглюкозид, n-додецил- β -D-мальтозид, дигітонін, тритон X-100, Nonidet P-40, твін-80. Видалення детергенту провокує спонтанне збирання нанодисків. Таке видалення здійснюють діалізом або за допомогою гранул, таких як Bio-BeadsTM.

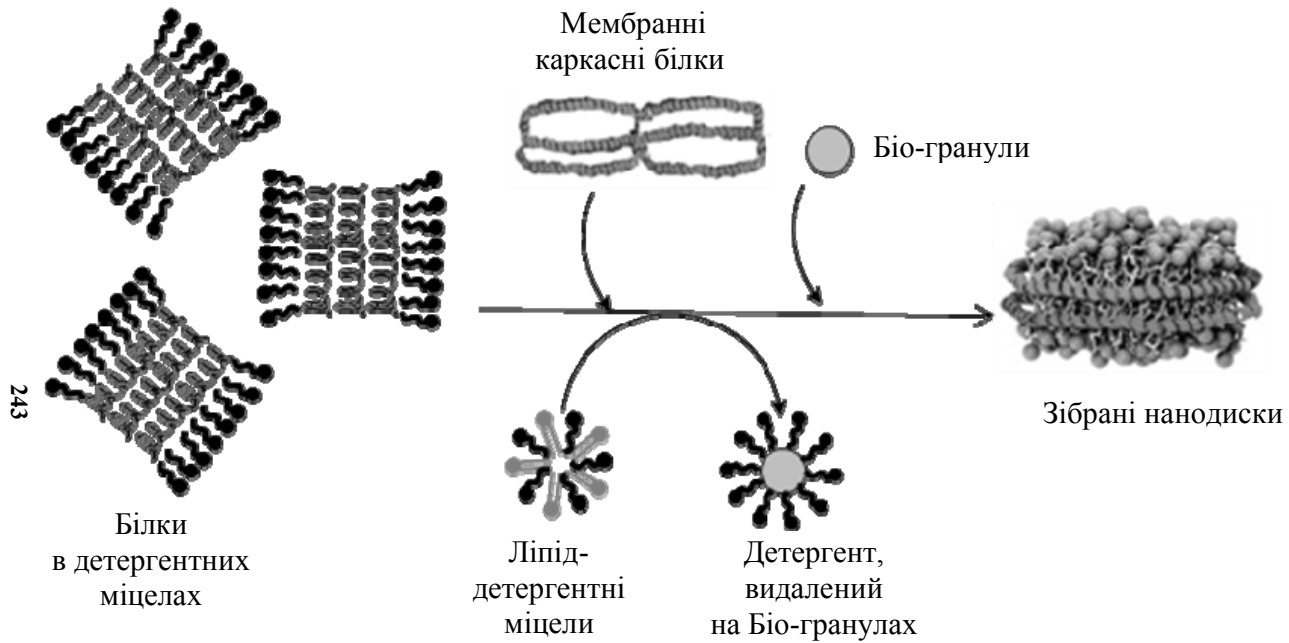


Рис. 5.12. Збирання нанодисків. Процес починається із включення білка у детергентні міцели, до яких додають мембранний каркасний білок і ліпіди. Після видалення детергенту з розчину утворюються бішарові нанодиски

Застосування нанодисків для вивчення й очищення мембранних білків. Мембранні білки включають у нанодиски для подальшого вивчення їх за допомогою різних методів. Так, із застосуванням нанодисків було вивчено рецептори, спряжені з G-білками (англ., G protein-coupled receptors, GPCRs) – зв'язування їх із лігандами, взаємодію з арестином та ефект олігомеризації на їхню активність. Олігомери GPCRs включають у нанодиски, причому кількість мономерів у них можна контролювати. Дослідження таких GPCRs, як родопсин, $\beta 2$ -адренорецептор, нейротензин, опіоїдні та метаботропні рецептори глутамату, показали, що перебування їх у мономерній формі достатньо для активації.

Багато досліджень було присвячено функціонуванню білка родопсину та його взаємозв'язку з арестином. Білок арестин блокує сигналізацію за участю GPCRs, викликаючи їхнє мічення для подальшої інтерналізації. Він зв'язується із цитоплазматичним кінцем рецептора, це блокує зв'язувальні сайти гетеротримерного G-білка і перешкоджає тим самим його активації (десенситизацію). Крім цього, арестин обумовлює взаємодію рецептора з білками системи інтерналізації – клатрином і клатриновим адаптером AP2, що викликає інтерналізацію рецептора в ендосоми. Із застосуванням нанодисків було показано, що мономерний родопсин може підлягати фосфорилуванню і зв'язувати арестин.

Крім вивчення клітини і клітинних мембран, нанодиски дозволяють здійснювати більш точний контроль умов експерименту: концентрацію буфера, солей та білків, що взаємодіють. Так, системи нанодисків дозволили виявити нові ефекти Ca^{2+} на зв'язування лігандів та активацію G-білків рецептором (GPCRs) паратиреоїдного гормону 1 (Mitra, 2013).

Детергенти, за допомогою яких виділяють білки із мембрани, найчастіше порушують їхню структуру. Для мінімізації згубного ефекту детергентів на мембранні білки слід зменшити час їхнього впливу. Нанодиски застосовують при очищенні рецептора паратиреоїдного гормону 1. Клітини солубілізували в детергенті й негайно включали мембранний білок у нанодиск. У результаті отримано більшу кількість цього білка. Такий підхід має великі перспективи з метою застосування для очищення інших мембранних білків.

Технології, які застосовуються для вивчення мембранних білків у нанодисках. Нанодиски використовують для вивчення мембранних білків методом *рідинного ЯМР*. Так було досліджено CD4-рецептор людини, потенціалзалежні іонні канали VDAC-1 і VDAC-2, α -спіральний димерний білок YgaP *E. coli* (Tzitzilonis, 2013). При вивченні 8-ланцюгового антипаралельного β -складчастого білка OmpX методом ЯМР із застосуванням дейтерієвих міток вдалося отримати з високою роздільною здатністю дані щодо його структури.

Іншим популярним підходом вивчення мембранних білків у складі нанодисків є *поверхневий плазмонний резонанс*. З його допомогою охарактеризовано кінетику зв'язування лігандів. Метод поверхневого плазмонного резонансу найчастіше використовується для дослідження взаємодії білків з лігандами в розчинах. Заміна ліпосом нанодисками дає ряд переваг при застосуванні вказаного методу. Найпершою його перевагою є спрямованість орієнтації білків у бідарі. У ліпосомах не всі білкові молекули орієнтуються належним чином, тому ліганди не "впізнають" свої центри зв'язування. У нанодиски можна вбудувати білки таким чином, щоб ці центри були звернені в бік ліганду (Glück, 2011).

Застосування нанодисків для вивчення окремих молекул. Нанодиски є ідеальними системами для вивчення окремих молекул. Для цього застосовують технологію флуоресцентної мікроскопії повного внутрішнього відбиття (англ., Total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM), яка дозволяє спостерігати за флуоресценцією окремих молекул. Наприклад, у нанодиски було вбудовано ізоформу цитохрому P450 3A4 (CYP3A4) і з'ясовано, що ефектор α -нафтофлавіон посилює перетворення субстрату цього ферменту, подовжуючи час перебування субстрату (Nath, 2008).

Інший метод, який дозволяє вивчати окремі молекули – силова спектроскопія окремих молекул (англ., single molecule force spectroscopy, SMFS), застосували для дослідження бактеріородопсину в нанодисках (Zocher, 2012). Між бактеріородопсином нативних мембран і бактеріородопсином у складі нанодисків не виявили суттєвої різниці у структурі, особливостях фолінгу та між- і внутрішньомолекулярних взаємодіях.

Контрольні запитання

1. З якою метою при аналізі активності ферментів у клітинних лізатах проводять імунопреципітацію?
2. Які сорбенти використовують для імунопреципітації?
3. Укажіть основні етапи імуноферментного аналізу.
4. Які антитіла використовують у "сендвіч"-ІФА?
5. Чим відрізняється прямий ІФА від непрямого?
6. Які флуоресцентні мітки використовуються в ІФА?
7. На якій хімічній реакції базується хемілюмінесцентний ІФА?
8. Назвіть методи детекції, які використовують у методі імуноблотингу.
9. Перерахуйте методи визначення вмісту цАМФ.
10. Які переваги й недоліки мають радіоактивні методи визначення вторинних посередників і ферментів сигнальних систем?
11. З якою метою в одному із методів визначення вмісту цАМФ використовується люцифераза?
12. Які компоненти клітинних сигнальних каскадів визначають методом LANCE?
13. За якими критеріями певний метод віднесено до категорії HTS?
14. Укажіть принцип визначення активності внутрішньоклітинних ферментів методом SPA.
15. Назвіть нерадіоактивні методи, що використовуються для визначення активності протеїнкіназ.
16. Яким чином визначають активність протеїнкіназ методом ELISA?
17. Які особливості використання методу AlphaScreen при визначенні активності протеїнкіназ?
18. Наведіть переваги радіоактивного методу FlashPlate, які дозволяють віднести його до методів високопродуктивного скринінгу.
19. Порівняйте колориметричні методи визначення концентрації кальцію.
20. Які існують колориметричні методи визначення активності протеїнфосфатаз?

Список літератури

Abu Lila A. S. Use of polyglycerol (PG), instead of polyethylene glycol (PEG), prevents induction of the accelerated blood clearance phenomenon against long-circulating liposomes upon repeated administration / A. S. Abu Lila, K. Nawata, T. Shimizu // *Int. J. Pharm.* – 2013. – Vol. 456, № 1. – P. 235–242.

Allen T. M. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose / T. M. Allen, C. Hansen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1991. – Vol. 1068, № 2. – P. 133–141.

Batzri S. Single bilayer liposomes prepared without sonication / S. Batzri, E. D. Korn // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1973. – Vol. 298, № 4. – P. 1015–1019.

Blume G. Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity *in vivo* / G. Blume, G. Cevc // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1993. – Vol. 1146, № 2. – P. 157–168.

Hagn F. Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins / F. Hagn, M. Etzkorn, T. Raschle // *J. Am. Chem. Soc.* – 2013. – Vol. 135, № 5. – P. 1919–1925.

Hofheinz R.D. Liposomal encapsulated anti-cancer drugs / R. D. Hofheinz, S. U. Gnad-Vogt, U. Beyer // *Anti-Cancer Drugs.* – 2005. – Vol. 16, № 7. – P. 691–707.

Lasch J. Preparation of liposomes / J. Lasch, V. Weissig, M. Brandl // *Liposomes: A practical approach* ; ed. V. Torchilin, V. Weissig. – New York : Oxford Univ. Press, 2003.

Maruyama K. Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes / K. Maruyama, O. Ishida, T. Takizawa // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 1999. – Vol. 40. – P. 89–102.

Mozafari M. R. Liposomes: an overview of manufacturing techniques / M. R. Mozafari // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2005. – Vol. 10, № 4. – P. 711–719.

Sadozai H. Recent developments in liposome-based veterinary therapeutics [*Електронний ресурс*] / H. Sadozai, D. Saeidi // *ISRN Vet. Sci.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 1–8. – Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/167521>

Розділ 6

МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ КЛЮЧОВИХ КОМПОНЕНТІВ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМ

6.1. ОСНОВНІ БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ СИСТЕМ ТРАНСДУКЦІЇ СИГНАЛУ

6.1.1. Імунопреципітація білків із клітинних екстрактів

При вивченні компонентів клітинних систем трансдукції сигналу в першу чергу використовуються методи преципітації білків із клітинних екстрактів. Імунопреципітація і споріднені методи очищення білків за їхньою афінністю є рутинними процедурами, які дозволяють зробити білок доступним для зв'язування з компонентами тест-систем і подальшого аналізу його вмісту або ферментативної активності. Оскільки досліджувані білки мають різні розміри, вміст у клітині, інтенсивність синтезу та швидкість перетворення, існує велика кількість протоколів імунопреципітації.

Преципітація (осадження) білків супроводжується утворенням білкових агрегатів, які випадають в осад із розчину і можуть бути зруйновані центрифугуванням. Осадити білки можна за допомогою неспецифічних методів (наприклад, дією трихлороцтової кислоти), а також специфічних методів, спрямованих про-

ти певних білків (дії антитіл та інших афінних матриксів). Коли для осадження білків із екстрактів використовуються антитіла, метод називається *імунопреципітацією* (рис. 6.1). Цю технологію найчастіше застосовують для вивчення фізичних взаємодій між двома білками (тоді метод називається коімунопреципітація). Перевагами імунопреципітації як методу афінного очищення є простота і швидкість виконання. Він придатний для осадження як малих, так і великих білків. Також він дозволяє проводити подальше визначення як сильних, так і слабких фізичних взаємодій між білками.

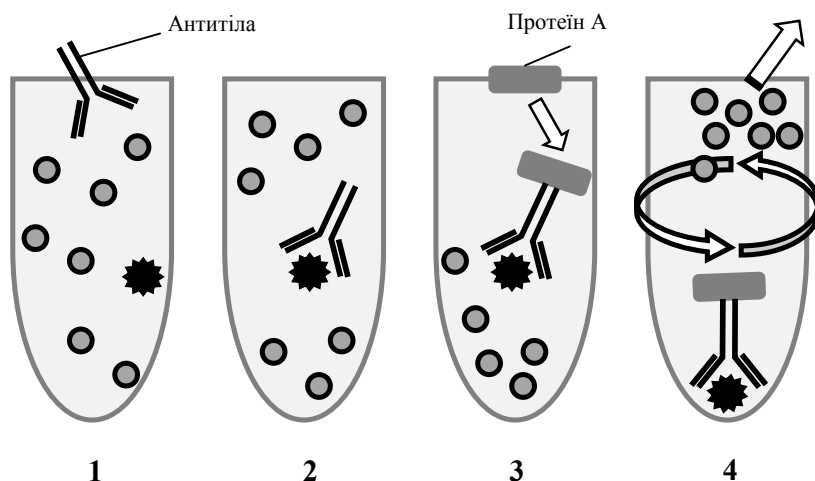


Рис. 6.1. Схема процесу імунопреципітації:

- 1 – додають антитіла, специфічні до шуканого білка,
- 2 – антитіла зв'язуються з білком, 3 – додають протеїн А чи G для переведення комплексу антитіло-білок у нерозчинний стан,
- 4 – центрифугують пробірки, що містять комплекс антитіло-білок, видаляють супернатант і відливають

Розроблено велику кількість протоколів імуно- та коімунопреципітації. Усі вони включають наступні етапи: 1) лізис клітин і приготування клітинних екстрактів; 2) упізнання і зв'язування антитіл з білком; 3) преципітація комплексів антиген-антитіло; 4) відмивання імунопреципітату для видалення не-

специфічних білків. Імунопреципітацію проводять за нативних умов зі збереженням активності ферменту і його асоціаціатів з іншими білками. Вона може бути здійснена також за заданих умов для зменшення неспецифічних взаємодій аналізованого білка з іншими білками, проте в цьому випадку може зникати ферментативна активність.

Ізольовані імунопреципітати можуть бути використані для визначення активності ферменту після того, як білок буде відокремлено від антитіл за допомогою методу solution-based або гель-електофорезу. Після цього білки виявляють різними методами: за радіоактивністю (мітять їх радіоактивними мітками до того, як проводять лізис клітин), імуноблотингом або ІФА.

Прикладом імунопреципітації білків у нативних умовах є їхнє зв'язування з антитілами з наступним видаленням за допомогою сорбентів. Антитіла додають до клітинних екстрактів на льоду, потім комплекси антиген-антитіло преципітують із розчину за допомогою протеїну А чи протеїну G, зв'язаного із сефарозою. Протеїн А і протеїн G – білки клітинної стінки бактерій, які міцно зв'язуються з Fc-доменом антитіл. Ця взаємодія чутлива до рНі, вона порушується за його низьких значень. Указані білки з різною афінністю зв'язуються із субтипами антитіл різних тварин. Протеїн А і протеїн G Sepharose використовуються окремо або в суміші.

Вміст антитіл та клітинних екстрактів варіює в широкому діапазоні, він залежить від рівня експресії білка й афінності антитіл і визначається емпірично. Визначення починають з додавання 0,25–1 мкл поліклональної антисироватки, приблизно 50 мкл супернатанту культури клітин (гібридоми) або 0,5 мл асцитної рідини, що містить моноклональні антитіла. Після цього проводять інкубацію для зв'язування білків з антитілами, центрифугують для руйнування неспецифічних агрегатів і додають до суміші протеїн А або протеїн G Sepharose. Комплекси антиген-антитіло зв'язуються з гранулами сорбенту, після чого їх центрифугують, відмивають у буфері й використовують для визначення вмісту білка чи його ферментативної активності. Також їх можна аналізувати електрофоретично.

Методом коімунопреципітації вивчають взаємодії між двома або більше білками. За м'яких умов є можливим зв'язати з антитілами й осадити декілька білків, при цьому використовуються антитіла до кожного білка. Потім методом імуноблотингу визначають присутність цих білків, зв'язаних із відповідними антитілами.

6.1.2. Імуноферментний аналіз

Метод імуноферментного аналізу (ІФА,) базується на реакції між антигеном і антитілом. Існує цілий ряд варіантів ІФА, спільним для них є використання як реагентів антитіл або антигенів, з'єднаних із ферментами-маркерами. Цей метод має високу чутливість і специфічність та може бути автоматизованим, тому він широко застосовується як у наукових дослідженнях, так і в діагностиці.

Виділяють гомогенний і гетерогенний ІФА. Найбільш розповсюдженим варіантом гетерогенного ІФА є *твердофазовий ІФА* (англ., *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) (Lequin, 2005). Він базується на взаємодії імунних комплексів (антигенів і антитіл), які ковалентно зв'язані з ферментними мітками. Такі комплекси називаються кон'югатами. Антигени або антитіла іммобілізують на твердій фазі (кульках сорбенту чи скла, або лунках полістиролового мікропланшета). Також використовують вузькі смуги нітроцелюлозних мембран. Принцип твердофазового ІФА полягає в наступному. Антигени чи антитіла, зв'язані з ферментною міткою, сорбуються на твердій фазі. До них додають досліджуваний зразок (джерело антигену чи антитіл) і відмивають від компонентів, що неспецифічно зв'язалися. При додаванні субстрату для ферменту, що входить до складу кон'югату, він розщеплюється. За інтенсивністю ферментативної реакції судять про вміст досліджуваної сполуки у зразку.

Як ферменти-мітки, що кон'югують з антитілами, найчастіше використовують пероксидазу хрому та лужну фосфатазу. Результати дії ферменту реєструють різними способами: спектрофотометрично – за забарвленням, за флуоресценцією або хемілюмінесценцією. Найчастіше ферментативну активність оцінюють спектрофотометрично, використовуючи хромогенний суб-

страт (найчастіше ортофенілєндіамін), які за дії ферменту-мітки утворюють забарвлений продукт. Кольорову реакцію зупиняють додаванням розчину 0,5 М H_2SO_4 . Інтєнсивністю забарвлення вимірюють на мікропланшетному фотометрі (мікрорідєрі) і за нею оцінюють кількість кон'югату, який присєднався до твердої фази. Ферменти відіграють роль індикаторів імунологічних реакцій, оскільки концентрація рєчєвин, що реагують, пропорційна інтєнсивності забарвлення, флуоресценції чи хємілюмінесценції.

Існує прямиий і непрямиий варіанти ІФА. Мєтодом *прямого ІФА* визначають антигєни в дослїджуванєму зразку (рис. 6.2). Реагентом є кон'югат антитїл з ферментом, який утворює імуний комплекс із дослїджуваним антигєном. Після цього додають субстрат, який за дії ферменту перєтворюєтьсє на забарвлений продукт. При здїйсненні *непрямого ІФА* у лунках мікропланшєта іммєбілізують антигєн та додають до нього зразок, що є джерєлом антитїл, які визначають (рис. 6.3). Непрямиий твердофазовий ІФА базуєтьсє на використанні антивидєвих (їх ще називають вторинними) антитїл, мїчених ферментом (антиглобулінових кон'югатів). Вторинні антитїла взаємодіють з комплексом антигєн-первинне антитїло, при додаванні субстрату утворюєтьсє продукт, вміст якого визначають.

Залежно від типу зв'язування між ними виділяють два типи ІФА: неконкурєнтний і конкурєнтний. *Неконкурєнтним ІФА* називаєтьсє тоді, коли тест-систєма мїстить тїльки спєлуку, яку визначають, та відповідні центри зв'язування – антигєн або спєцифічні антитїла. ІФА є *конкурєнтним*, якщо в тест-систємі мїстятьсє відразу аналізована спєлука та її аналог (аналїзована спєлука, мїчена ферментом або іммєбілізована на твердїй фазї), і останній конкурєє за центри зв'язування.

"*Сєндвіч*"-ІФА є неконкурєнтним мєтодом (рис. 6.4). Високоспєцифічні полі- або моноклональні антитїла іммєбілізують на твердїй фазї (наприклад, лунках полістиролового мікропланшєта), до них додають зразок – розчин антигєну, який аналізують. Під час інкубації дослїджуваний антигєн зв'язуєтьсє з антитїлами на носїї. Для уникнення неспєцифічного зв'язування іших бїлків носїй відмивають, після чєго додають антитїла до того самого антигєну, мїчені ферментною мїткою (кон'югат).

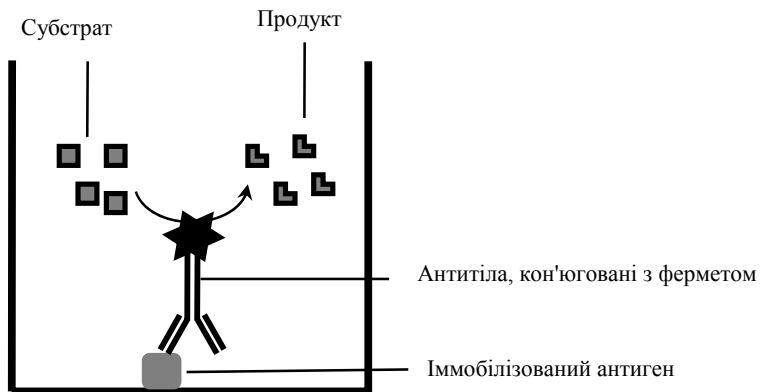


Рис. 6.2. Схема прямого ІФА для виявлення антигенів

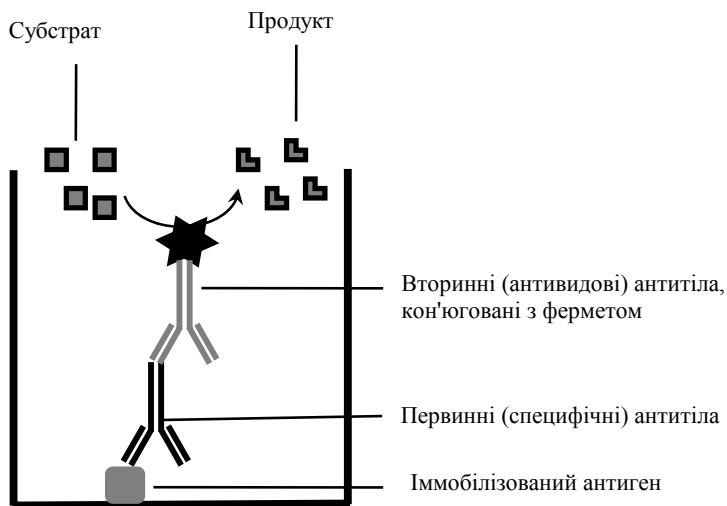


Рис. 6.3. Схема непрямого ІФА для виявлення антигенів

Повторно інкубують, щоб видалити надлишок вторинних антитіл, вносять субстрат для ферменту, кон'югованого з антитілом, та знову інкубують. Після цього визначають ферментативну активність, яка буде пропорційна до концентрації досліджуваного антигену, яку внесли в систему. Ефективність утворення специфічного комплексу (антиген-антитіло) залежить від конс-

танти зв'язування антигену з антитілом. Метод називається "сендвіч"-ІФА тому, що під час виявлення імунного комплексу антиген розташований між молекулами іммобілізованих антитіл тест-системи і мічених антитіл, які додають. Антитіла, що визначають методом "сендвіч"-ІФА, повинні мати декілька епітопів, здатних зв'язувати антитіла, або мати епітопи однакової специфічності, які просторово розділені й повторюються.

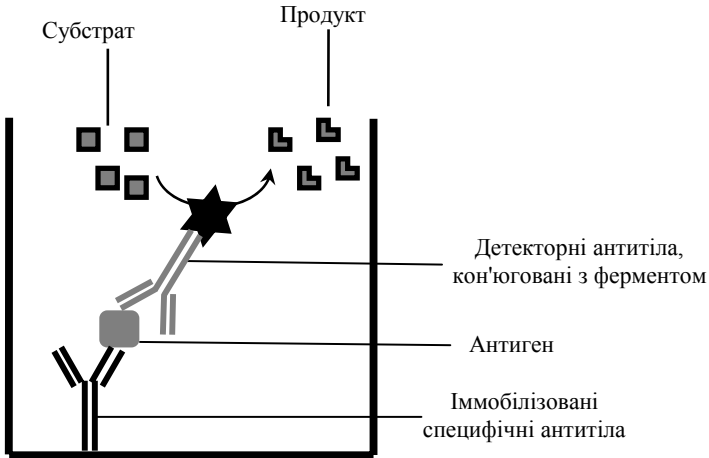


Рис. 6.4. Схема "сендвіч"-ІФА

Конкурентний твердофазовий ІФА базується на конкуренції мічених антитіл (кон'югат) і немічених (досліджуваних) за зв'язування з антигеном, адсорбованим на твердій фазі. Кількість ферменту, що приєднується до твердої фази, зменшується пропорційно до вмісту вільних незв'язаних) антитіл. Для *прямого конкурентного ІФА* використовують антитіла, іммобілізовані на твердій фазі, при цьому мічений ферментом і немічений антигени конкурують за зв'язування з іммобілізованими антитілами. До останніх додають розчин досліджуваної сполуки (антигену) та міченого антигену з фіксованою концентрацією, інкубують і відмивають від білків, що не зв'язалися. Після цього визначають ферментативну активність утворених на носії імунних комплексів. Чим більша така активність, тим менша концентрація досліджуваного антигену.

Для здійснення *непрямого конкурентного ІФА* застосовують мічені ферментом первинні (специфічні) або вторинні (антивидові) антитіла та кон'югат антиген-білок-носії, іммобілізований на твердій фазі. Цей підхід є одним із найпоширеніших методів ІФА. У ньому імунна відповідь посилюється за рахунок використання антитіл двох порядків. Антиген іммобілізують на основі (лунках полістиролового мікропланшета), до нього додають розчин досліджуваного антигену і фіксовану концентрацію немічених специфічних антитіл (так звані антитіла 1-го порядку, їх ще називають первинними), які безпосередньо зв'язуються з антигеном. Після цього інкубують та відмивають для видалення компонентів, що не зв'язалися. Потім додають фіксовану концентрацію мічених антивидових антитіл (так звані антитіла 2-го порядку, або вторинні), які зв'язуються з антитілами 1-го порядку. Після інкубації та відмивання носія визначають ферментативну активність імунних комплексів, що утворилися на носії. Як і у випадку прямого конкурентного ІФА, величина активності обернено пропорційна концентрації досліджуваного антигену.

За методом детекції сигналу виділяють колориметричний, хемілюмінесцентний і флуоресцентний ІФА.

У *колориметричному ІФА* фермент, кон'югований з антитілом, розщеплює хромогенний субстрат з утворенням продукту, який поглинає світло у видимому діапазоні довжин хвиль (кольорова реакція). Після цього реакцію зупиняють додаванням стоп-реагенту і вимірюють поглинання на планшетному спектрофотометрі. Оптична густина пропорційна вмісту сполуки, яку аналізують.

Як ферменти-мітки використовують пероксидазу хрону, лужну фосфатазу з тимусу теляти і β -D-галактозидазу *E. coli*. Як субстрати для пероксидази, котрі утворюють нерозчинний продукт, використовують 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (англ., 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB), 3,3',4,4'-діамінобензидин (англ., 3,3',4,4'-diaminobenzidine, DAB) і 4-хлоронафтол (англ., 4-chloro-1-naphthol, 4CN). Субстратами, що утворюють розчинний продукт, є TMB (має подвійну функцію), 2,2'-азино-ди[3-етилбензтіазолін] сульфонат (англ., 2,2'-azino-di[3-ethylbenzthiazoline] sulfonate, ABTS) та о-фенілендіамін (англ., o-phenylenediamine, OPD). Найчутливішим серед них є TMB, він утво-

рює блакитне забарвлення, інтенсивність якого вимірюють за довжини хвилі 650 нм. При його окисненні утворюється жовте забарвлення, вимірювання при цьому проводять за довжини хвилі 450 нм. Реакцію зупиняють 1 М фосфорною кислотою. ABTS менш специфічний, ніж TMB і OPD, його використовують як субстрат і для пероксидази, і для лужної фосфатази. Поглинання синьо-зеленого продукту вимірюють за довжин хвиль від 405 до 410 нм, реакцію зупиняють 1% SDS. OPD є найбільш популярним субстратом для пероксидази, його розчинний продукт має жовтий колір, поглинання вимірюють за довжини хвилі 490 нм. Субстратом лужної фосфатази є р-нітрофенілфосфат (англ., p-nitrophenylphosphate, p-NPP), який дає жовте забарвлення (вимірюють за довжини хвилі 405 до 410 нм. Поглинання утвореного продукту вимірюють на мікрорідері. На сьогодні виробляються мікропланшетні фотометри – мікрорідери, придатні для всіх типів колориметричних вимірювань.

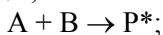
Високочутливим варіантом методу ІФА (ELISA) є *флуоресцентний ІФА* (англ., fluorescent immunoassays, ELFIA). У ньому використовуються флуорогенні субстрати, які під дією ферменту утворюють продукти, що флуоресціюють при збудженні світлом певної довжини хвилі. Після цього вимірюють інтенсивність флуоресценції, виражаючи її у відносних одиницях флуоресценції (фотони світла, яке випромінюється), що є пропорційним вмісту аналізованої сполуки. Такий метод є набагато чутливішим порівняно з колориметричним варіантом ІФА. Механізм флуоресценції описано у підрозд. 1.6.1. Для кожного із трьох основних ферментів-міток використовують власні флуорогенні субстрати. Для лужної фосфатази субстратом є 4-метилумбеліферилфосфат (англ., 4-MUP, 4-methylumbelliferylphosphate), який перетворюється на 4-метилумбеліферон (англ., 4-methylumbelliferone), він має довжину хвилі збудження 360 нм і довжину хвилі випромінювання 440 нм. Флуорогенними субстратами для пероксидази є гідроксифенілоцтова кислота (hydroxyphenylacetic acid, HPA) і 3-р-гідроксифенілпропіонова кислота (3-p-hydroxyphenylpropionic acid, HPPA). Для утворення флуоресцентного продукту необхідно додавання пероксиду водню. Найуживанішим у ІФА субстратом є HPPA, його флуоресцент-

ний продукт має довжину хвилі збудження 320 нм і довжину хвилі випромінювання 404 нм.

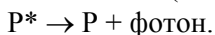
Інтенсивність флуоресценції вимірюють на флуориметрі. Розроблено прилади – системи зчитування для 96-лункових планшетів, які поєднують у собі можливості люмінометра і фотометра й мають або вбудований комп'ютер, або можуть бути з'єднані із зовнішнім комп'ютером.

Хемілюмінесцентний ІФА є модифікацією колориметричного ІФА. Фермент-мітка перетворює субстрат на продукт, який випромінює фотони замість того, щоб забезпечувати розвиток забарвлення. Люмінесценція – це випромінювання світла сполукою, яка повертається при цьому із електронозбудженого стану в основний. Хемілюмінесценція – це випромінювання (емісія) світла, що супроводжує хімічну реакцію. Процес хемілюмінесценції відбувається у дві стадії:

1) утворення продукту в електронному збудженому стані (хемілюмінесцентна реакція):



2) випромінювання кванта світла (люмінесценція):



Наприклад, коли люмінол і пероксид водню реагують між собою, утворюється збуджений інтермедіат амінофталат, який випромінює світло.

Явище хемілюмінесценції використовують в ІФА для детекції активності ферменту, кон'югованого з антитілом. Наприклад, пероксидаза хрому з'єднана з антитілом, специфічним щодо досліджуваної молекули, каталізує перетворення хемілюмінесцентного субстрату в активований реагент у безпосередній близькості до молекули. Він окиснюється пероксидом водню з утворенням триплетного (збудженого) карбонілу, який випромінює світло і перетворюється на синглетний карбоніл. Метод хемілюмінесценції дозволяє визначати дуже малі кількості біомолекул, зокрема фентомолярні концентрації білків, що є набагато нижчим за поріг чутливості інших методів. Інтенсивність люмінесценції вимірюють у відносних світлових одиницях (англ. relative light units, RLU), вона пропорційна вмісту аналізованої сполуки у зразку.

При цьому використовують прилад люмінометр, результати візуалізуються на фотоплівці або записуються в пам'ять комп'ютера.

Як фермент-мітка у хемілюмінесцентному ІФА використовують пероксидаза, тому що її вона здатна бути активною протягом тривалого часу і тим самим забезпечує пролонговану детекцію інтенсивності світла (рис. 6.5). Як субстрати для пероксидази використовують люмінол, поліфеноли, акридиніві ефіри та люциферин. Окиснення люциферину під дією кисню, утвореного з пероксиду водню під дією пероксидази, приводить до випромінювання світла і є одним із прикладів біоломінесценції. Найуживанішим субстратом для люмінесцентного ІФА є люмінол. При його додаванні вже через 2 хв спостерігається випромінювання світла і є стійким протягом 20 хв і більше.

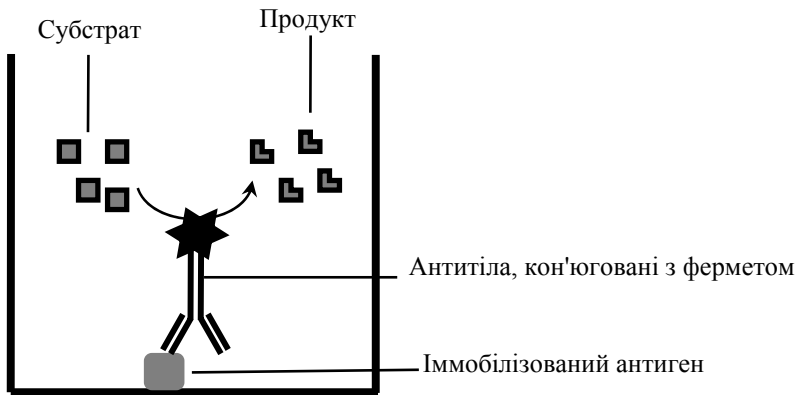


Рис. 6.5. Схема хемілюмінесцентного ІФА

Інтенсивність світла, що випромінюється, вимірюють на люмінометрі. Сьогодні найбільшої популярності набули мікроплашкетні багатофункціональні детектори, здатні вимірювати флуоресценцію, люмінесценцію і працювати як фотометри.

Замість антитіл другого порядку в ІФА використовують також систему, яка базується на спорідненості низькомолекулярного розчинного вітаміну біотину до бактеріального білка стрептавідину. Стрептавідин – це білок з молекулярною масою 60 kDa, який продукується бактеріями *Streptomyces avidinii* та має високу спорідне-

ність до біотину. Завдяки цій властивості мічений флуоресцентною або ферментною міткою стрептавідин використовують у методі нерадіоактивної гібридизації (для виявлення біотинільованої) ДНК чи у методі ІФА (для виявлення антигену). Кожна молекула стрептавідину містить чотири сайти зв'язування біотину.

При проведенні ІФА біотин зв'язують з первинними антитілами, а стрептавідин мітять, наприклад, ферментною міткою і використовують аналогічно до антитіл другого порядку (рис. 6.6, А). Інакше можна використовувати систему, коли до кон'югованого з антитілами біотину додають стрептавідин, а до нього – мічений біотин (рис. 6.6, Б). Утворена сітка з молекул стрептавідину, зв'язаного з міченим біотином, приводить до багаторазового посилення сигналу.

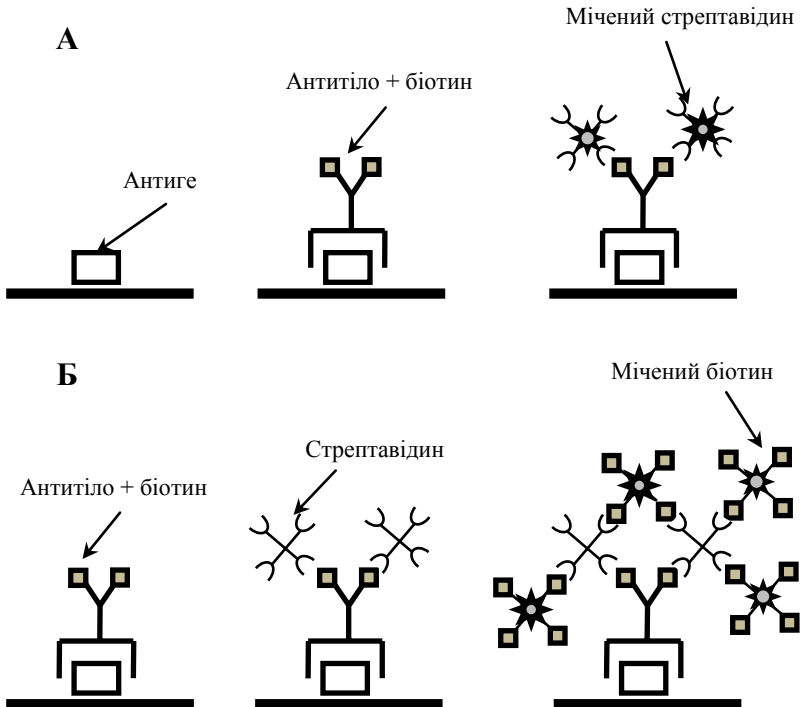


Рис. 6.6. Схема ІФА з використанням системи біотин-стрептавідин

6.1.3. Радіоімунний аналіз

Радіоімунний аналіз (англ., *Radioimmunoassay, RIA*) – високочутливий метод визначення концентрації антигенів *in vitro*, що базується на їхньому конкурентному зв'язуванні з антитілами (Grange, 2014, Mamikunian, 2011). При цьому використовують радіоактивно мічені антитіла або антигени. Детекцію сигналу проводять за радіоактивністю на лічильниках – радіоспектрометрах. Інтенсивність випромінювання прямо пропорційна кількості молекул антигену, що зв'язалися з антитілами.

Метод RIA є історично давнішим, ніж ELISA. Його було запропоновано в 1960 р. R. Yalow і A. Berson з діагностичною метою, а саме для визначення гормонів у крові. До застосування методу ELISA єдиним варіантом імуноаналізу був радіоімунний аналіз. Поява радіоактивності у пробі свідчить про присутність специфічних антигенів чи антитіл у пробі. Згодом метод RIA замінює більш безпечний метод – нерадіоактивний ELISA, у якому детекцію сигналу здійснюють за допомогою ферментативної реакції розщеплення хромогенного субстрату, результатом чого є поява забарвлення.

Метод RIA є оберненим до методу радіозв'язування, у якому визначають антитіла за допомогою відповідних антигенів. Цей метод дуже чутливий (визначає нанограми сполук) і специфічний, він потребує спеціального обладнання і радіоактивних сполук, а тому є достатньо дорогим. Сучасною альтернативою методу RIA є імуноферментний аналіз (ELISA), у якому реакцію антигену з антитілом визначають колориметрично (за величиною поглинання) або флуориметрично (за інтенсивністю флуоресценції). RIA є простішим у виконанні, ніж ELISA, хоча потребує декілька днів для постановки, тоді як процедуру ELISA можна провести за один день.

Зазвичай для мічення антитіл чи антигенів у методі RIA використовують гамма-радіоактивний ізотоп I^{125} , який має високу питому радіоактивність, період його напіврозпаду становить 60 днів. Ізотоп приєднують до залишку тирозину. Мічений у такий спосіб антиген змішують з фіксованою кількістю антитіл до даного антигену, після чого вони зв'язуються один з одним. Після цього дода-

ють біологічний зразок з невідомою кількістю досліджуваного антигену. Цей немічений антиген зразка конкурує з міченим антигеном тест-систем за зв'язування з антитілами. Оскільки концентрація неміченого антигену висока, його надлишок зв'язується з антитілами і заміщує радіоактивно мічений аналог. При цьому співвідношення міченого антигену, зв'язаного з антитілами, до вільного міченого антигену зменшується. Зв'язані антигени після цього відокремлюються від незв'язаних, радіоактивність вільного антигену залишається у супернатанті й вимірюється за допомогою сцинтиляційного гамма-лічильника. З використанням антигенів-стандартів отримують стандартну (калібрувальну) криву, за якою можна вирахувати вміст антигену у зразку.

Найчастіше в наукових дослідженнях і клініці використовують *твердофазовий RIA*, у якому антитіла чи антигени іммобілізують на сорбенті (полістиролі, поліетилені, поліпропілені, акриламіді, целюлозі, сефадексі) (рис. 6.7). Завдяки цьому спрощується розділення вільного і зв'язаного антигенів. Для його здійснення у пластикових пробірках інкубують розчин антитіл, які адсорбуються на пластику, а після цього промивають для видалення надлишку антитіл. У пробірки з адсорбованими антитілами вносять зразок і проводять інкубацію, потім зразок видаляють та вносять відому кількість міченого антигену. Знову інкубують і відмивають, після цього визначають кількість міченого антигену, що зв'язався, за допомогою сцинтиляційного гамма-лічильника.

У конкурентних модифікаціях твердофазового RIA антигени чи антитіла відомої специфічності іммобілізують на сорбентах, додають мічені антитіла, інкубують і вимірюють радіоактивність, визначаючи тим самим кількість антитіл, що зв'язалися. "Сендвіч"-метод (метод подвійних антитіл) є конкурентним методом, у якому антигени, зв'язані з іммобілізованими антитілами, здатні зв'язуватися з іншими (антивидовими) антитілами (рис. 6.8). Він є аналогічним до методу "сендвіч"-ІФА.

У багатьох модифікаціях радіоімунного аналізу додають преципітуючий (осаджувальний) реагент, який дозволяє відокремити комплекс ліганд-антитіло від незв'язаних антитіл (рис. 6.9). Звичай він містить поліетиленгліколь (PEG 6000) і азид натрію.

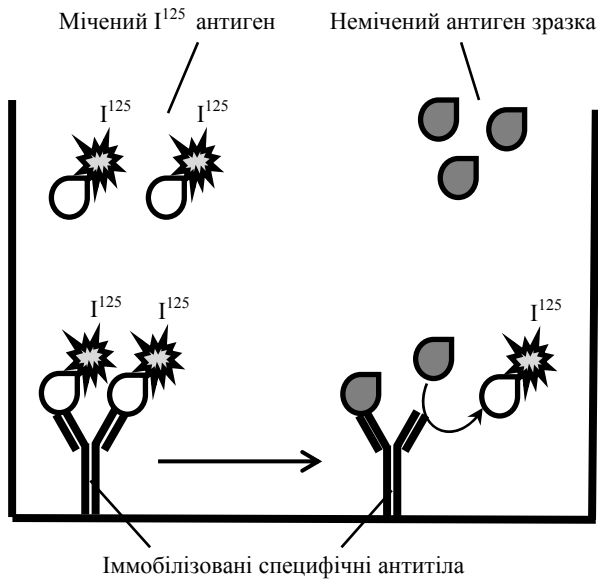


Рис. 6.7. Схема твердофазового радіоімунного аналізу

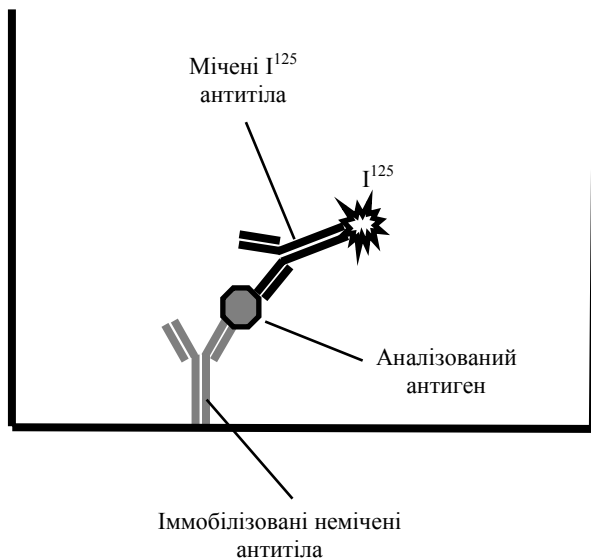


Рис. 6.8. Схема твердофазового "сендвіч"-радіоімунного аналізу

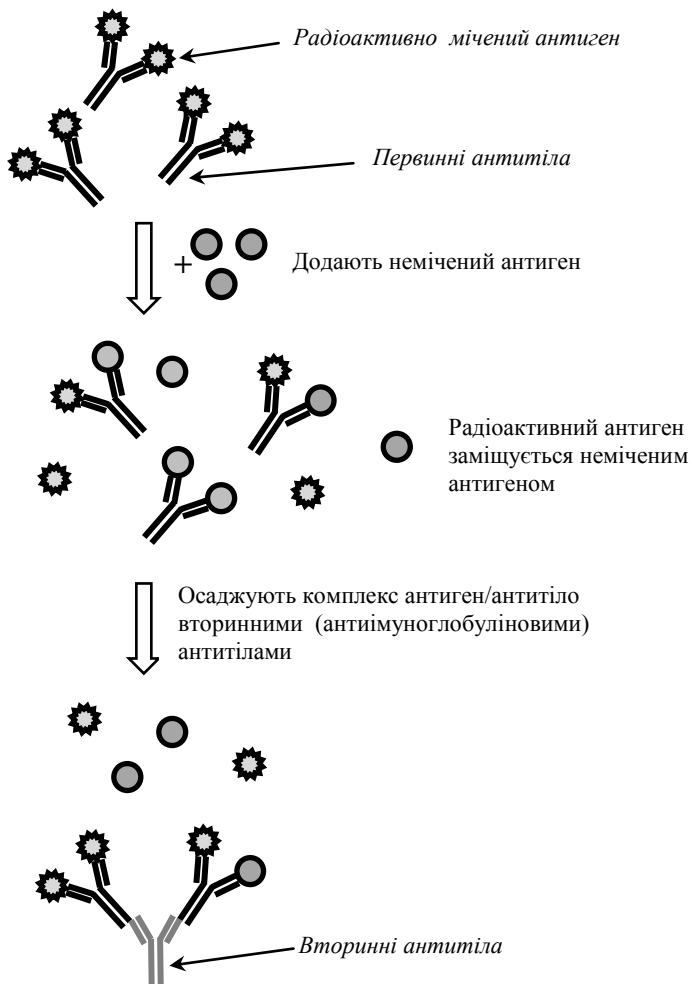


Рис. 6.9. Схема радіоімуного аналізу з використанням преципітуючих реагентів

В інших випадках використовують антиізотипічні специфічні вторинні антитіла (наприклад, антикролячу сироватку для осадження кролячих антилігандів) або вкриті вторинними антитілами магнітні часточки чи кульки, які застосовуються у методі SPA (Scintillation Proximity Assay).

До антитіл додають радіоактивний антиген-мітку, після чого вносять немічений антиген (у зразку або стандарті). Утворені комплекси антиген-антитіло осаджують з використанням преципітуючих реагентів (у цьому випадку – вторинних антитіл) для відокремлення їх від вільної чи зв'язаної мітки.

6.1.4. Western-блотинг

Western-блотинг – метод, що використовується для визначення білків у зразку за допомогою специфічних антитіл. Він базується на поєднанні гель-електрофорезу та імунохімічної реакції специфічних "антиген-антитіло" (Mahmood, 2012). Спочатку проводять електрофорез у поліакриламідному гелі. При цьому відбувається розділення білків зразка в електричному полі відповідно до їх молекулярної маси. На наступному етапі білки переносять на нітроцелюлозну або полівініліденфторидну (англ. PVDF) мембрану і за допомогою антитіл, специфічних до заданого білка, виявляють білки у зразку. При цьому використовується метод "сендвіча". Спочатку білки зв'язуються з первинними антитілами, які, у свою чергу, зв'язуються із вторинними антитілами, кон'югованими з ферментом (лужною фосфатазою чи пероксидазою хрому). Досліджуваний білок на блотограмі візуалізують за утворенням продукту колориметричним, хемілюмінесцентним або флуоресцентним методами. Також кількість білка можна визначити шляхом денситометрії.

Основними етапами Western-блотингу є:

- ✓ перенесення білка з гелю на мембрану;
- ✓ блокування неспецифічної сорбції;
- ✓ адсорбція первинних антитіл і відмивання;
- ✓ адсорбція вторинних антитіл і відмивання;
- ✓ прояв блотограми.

Для перенесення білків на мембрану її накладають поверх гелю, а на неї – купку фільтрувального паперу і поміщають у буфер для перенесення. За допомогою капілярних сил він пересувається по паперу. Білки також переміщуються з гелю на мембрану зі збереженням свого розташування. Білки також можна перенести на мембрану за допомогою електроблотингу, для чого

використовують електричний струм. У результаті білки переходять у тонкий поверхневий шар мембрани (англ. blotting – промокання), де вони можуть зв'язуватися з антитілами. Нітроцелюлозна або PVDF-мембрани здатні неспецифічно зв'язувати білки шляхом гідрофобних та електростатичних взаємодій. У результаті перенесення білків на мембрані утворюється відбиток гелю з білками, розташованими так, як при електрофорезі. Для контролю перенесення білків мембрану забарвлюють барвниками, зокрема Coomassie синім і Ponceau S, після чого їх відмивають.

Наступною процедурою є блокування неспецифічних взаємодій між мембраною та антитілами, які використовують для визначення досліджуваного білка. Для цього мембрану поміщають у розведений розчин білка, зазвичай бичачого сироваткового альбуміну (БСА) або знежирене сухе молоко, до яких додають невелику кількість детергенту твіну-20 або тритону X-100. Білок, що міститься у такому розчині, зв'язується з мембраною в ділянках, вільних від досліджуваного білка. Коли до мембрани додають антитіла проти досліджуваного білка, вони можуть взаємодіяти тільки з цим білком. Це запобігає виникненню псевдо-позитивних результатів імуноблотингу унаслідок зв'язування антитіл з мембраною.

Для детекції білків на мембрані її мітять антитілами проти цих білків, кон'югованими з ферментами (найчастіше лужною фосфатазою або пероксидазою хрому) (Liu, 2014). У результаті ферментативної реакції утворюється забарвлений продукт.

Після блокування розведений розчин первинних антитіл (0,5–5 мкг/мл) інкубують з мембраною. Цей розчин також може містити невеликі кількості детергенту і БСА або сухе молоко. Первинні антитіла отримують, імунізуючи тварин цільовим білком чи обробляючи ним культуру лімфоцитів. Мембрану відмивають від антитіл, що не зв'язалися, та інкубують у розчині вторинних (антивидових, наприклад "антикролячих", "антимишиних") антитіл, які зв'язуються із клас-специфічними ділянками первинних. Вторинні антитіла отримують із тваринних джерел за допомогою гібридом, що являють собою гібридні клітинні лінії – продукти злиття В-клітин, які виробляють антитіла, та пухлинних клітин мієломи. Гібридами вводять у черевну порожнину мишей,

де ці клітини розмножуються і секретують моноклональні антитіла з утворенням асциту. Вторинні антитіла зв'язуються з первинними антитілами, отриманими із тварини цього ж виду. Вторинні антитіла кон'югують з ферментами-репортерами (лужною фосфатазою чи пероксидазою хрому), які розщеплюють субстрат, що дозволяє детектувати білки на блотограмі (рис. 6.10).

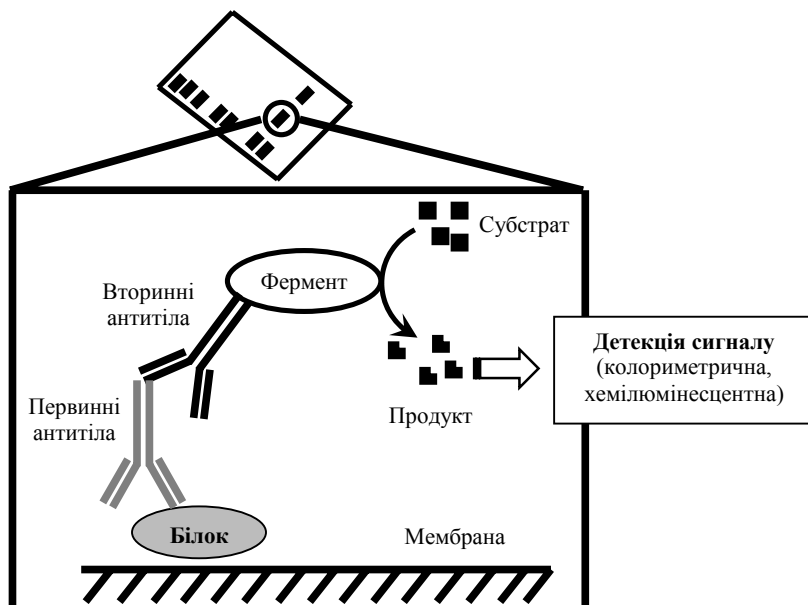


Рис. 6.10. Принцип Western-блотингу

Для детекції білків застосовують різні методи, які схожі з такими, що використовуються для ІФА (Taylor, 2014). У випадку *колориметричної детекції* блот інкубують із хромогенним субстратом, який розщеплюється репортерним ферментом, кон'югованим із вторинним антитілом. У результаті утворюється нерозчинний забарвлений продукт, котрий осаджується і забарвлює мембрану. Вміст білка визначають спектрофотометрично або денситометрично за інтенсивністю забарвлення. Подібним методом проводять детекцію білків під час ІФА.

У методі *хемілюмінесцентної детекції* до вторинних антитіла, кон'югованих ферменту-репортером, додають хемілюмінесцентний субстрат. Під впливом цього ферменту (пероксидази хрому) субстрат розщеплюється, а утворений продукт випромінює світло (люмінесціює). Інтенсивність випромінювання пропорційна кількості білка в досліджуваному зразку. Світло реєструють за допомогою світлочутливої фотографічної плівки, яку поміщають напроти мембрани, або за допомогою цифрової камери.

За дії випромінювання на зображенні з'являються смуги, що відповідають антитілам на блоті. Блотограму аналізують методом денситометрії, визначаючи відносну кількість забарвленого білка, результат отримують в одиницях оптичної щільності. За допомогою комп'ютерної програми можна визначити молекулярну вагу білка, порівнюючи із стандартом.

Хемілюмінесцентні системи використовуються як універсальний метод аналізу білків при проведенні Western-блотингу. Вони дозволяють позбутися домішок, пов'язаних із радіоактивними сполуками і токсичними хромогенними субстратами. Швидкість і чутливість цих методів незрівнянно вища порівняно з традиційними. Оскільки результати фіксуються на плівці або записуються у пам'ять комп'ютера, їх можна постійно зберігати.

Для *флуоресцентної детекції* використовують вторинні антитіла, пов'язані з флуоресцентною міткою (флуорофором), яка збуджується світлом і випромінює у ближньому інфрачервоному діапазоні спектра. Світло реєструється фотосенсорами цифрової камери, яка має відповідні фільтри емісії. За отриманим цифровим знімком блоту визначають молекулярну вагу білка і проводять кількісний аналіз блоту.

Набагато рідше використовується метод *радіоактивної детекції*, коли замість ферменту, кон'югованого із вторинним антитілом, використовують радіоактивну мітку, наприклад, мічений антитілозв'язувальний білок *A Staphylococcus* з радіоактивним ізотопом йоду. Радіографічну плівку поміщають навпроти блоту, радіоактивні мітки взаємодіють з нею з утворенням темних ділянок. Вони відповідають смугам досліджуваного білка на блотограмі.

6.2. ВИВЧЕННЯ цАМФ-ЗАЛЕЖНОЇ СИГНАЛЬНОЇ СИСТЕМИ

6.2.1. Визначення вмісту цАМФ

Циклічні нуклеотиди (цАМФ і цГМФ) є вторинними посередниками, залученими до регуляції величезної кількості метаболічних шляхів у клітині. цАМФ опосередковує фізіологічну відповідь клітина на дію нейротрансмітерів, гормонів, фармакологічних препаратів тощо. Тому для визначення цАМФ і цГМФ у біологічних зразках розроблено велику кількість методів, серед яких найбільш перспективними є ті, що дозволяють спостерігати за динамікою змін цих вторинних посередників у живих клітинах.

Найпершими були радіоактивні методи, які базувалися на конкурентному зв'язуванні міченого і неміченого цАМФ, методи радіоімунного аналізу (Post, 2000). Тепер широко використовуються нерадіоактивні методи, наприклад ІФА або AlphaScreen, у яких вміст цАМФ визначають за допомогою специфічних антитіл, а детекцію сигналу здійснюють колориметрично чи флуориметрично. Також уміст цАМФ визначають біолюмінесцентними методами з використанням ферменту люциферази. Нові високочутливі методи, котрі базуються на флуоресцентному перенесенні енергії (FRET) і LANCE, дозволяють відстежувати зміни внутрішньоклітинного рівня цАМФ у відповідь на зміну активності рецепторів, пов'язаних із G-білками.

6.2.1.1. Метод радіорецепторного зв'язування (Radioreceptor Binding Assay)

Метод базується на конкуренції між цАМФ зразка чи стандарту з радіоактивно міченим [^3H]цАМФ за зв'язування з цАМФ-зв'язувальним білком (зазвичай регуляторною субодиницею протеїнкінази А) (Gilman, 1970). Вільний цАМФ відокремлюють від зв'язаного різними методами (фільтрацією або преципітацією) і за значеннями радіоактивності розраховують вміст цАМФ у зразку. Такий підхід дає можливість визначити концентрації цАМФ від 3 нМ.

Визначення проводять за наступною схемою. До лунок мікропланшета вносять цАМФ-стандарт чи цАМФ-зразок, додають мічений $[^3\text{H}]$ цАМФ і зв'язувальний білок. Проводять інкубацію за температури $+4\text{ }^\circ\text{C}$, зупиняють реакцію фільтруванням крізь фільтри зі скловолкна. Після цього фільтри відмивають у холодному буфері, висушують, поміщають у флакони зі сцинтиляційною рідиною і вираховують радіоактивність на лічильнику. Вміст цАМФ у клітинному екстракті визначають, порівнюючи радіоактивність зразка зі стандартною кривою залежності радіоактивності від різних концентрацій цАМФ.

6.2.1.2. Радіоімунний аналіз

Радіоімунні методи (RIA) дозволяють виміряти тотальний вміст цАМФ чи цГМФ у багатьох клітинах і тканинах (Brooker, 1979). Принцип методу RIA було викладено в підрозд. 6.1.3. Метод дає можливість визначити фентомольарні концентрацію цАМФ у клітинних екстрактах і базується на використанні специфічних анти-цАМФ антитіл і міченого I^{125} -цАМФ. Останній зв'язується зі специфічними антитілами, після чого визначають радіоактивність. Аналогічно можна визначити вміст цГМФ, використовуючи відповідні анти-цГМФ антитіла. За присутності у зразку цАМФ/цГМФ радіоактивний сигнал зменшується, що обернено пропорційно їхній концентрації у зразку. З використанням калібрувальної кривої визначають вміст вільного цАМФ/цГМФ у зразку.

Принцип визначення цАМФ методом RIA схожий із таким для методу радіорецепторного зв'язування (Brooker, 1979). Відмінністю є те, що радіоактивно мічений або кон'югований цАМФ конкурує із цАМФ зразка (клітинного екстракту) за зв'язування з антитілами (імунопреципітація). Метод є більш чутливим, оскільки включає стадію перетворення цАМФ на ацетильовану похідну, яка зв'язується з антитілами з більшою афінністю.

До лунок мікропланшета вносять ацетильований цАМФ-стандарт або цАМФ-зразок і мічений $[^{125}\text{I}]$ цАМФ у γ -глобуліновому буфері, після чого додають цАМФ-антисироватку. Для контролю неспецифічного зв'язування створюють проби, до

яких додають тільки [^{125}I]цАМФ. Проводять інкубацію за температури $+4\text{ }^\circ\text{C}$, вносять антикролячі антитіла, кон'юговані з твердою фазою (магнітними кульками чи агарозою), тобто утворюють імунопреципітати. Вортексують та інкубують при $+4\text{ }^\circ\text{C}$. Після додавання холодного поліетиленгілколю вміст кожної лунки фільтрують за допомогою спеціальних вакуумних фільтрів, фільтри відмивають у поліетиленгілколі. Поміщають фільтри у скляні пробірки і вимірюють радіоактивність на гамма-лічильнику. Аналогічно до методу радіорецепторного зв'язування, вміст цАМФ у клітинному екстракті визначають, порівнюючи радіоактивність зразка зі стандартною кривою, яку отримують, використовуючи різні концентрації цАМФ.

6.2.1.3. Метод колориметричного ELISA

Методи визначення вмісту цАМФ у біологічному матеріалі в більшості випадків мають невелику точність, оскільки вміст цієї сполуки у клітині дуже низький. Використання агоністів GPCRs (G-protein coupled receptors) – рецепторів, зв'язаних із G_i -білками, пов'язано з цілою низкою проблем. Для підвищення чутливості визначення розроблена методика – модифікація ELISA з використанням моноклональних антитіл до цАМФ, іммобілізованих на мікропланшеті (фірма "Cell Signalling Technology®"). Перевагами такого методу є простота і швидкість виконання (результат отримують через 10 хв після внесення хромогенного субстрату), необхідність проведення лише однієї процедури відмивання, а також відсутність радіоактивно мічених компонентів, зокрема цАМФ, на відміну від раніше розроблених методів. За допомогою зазначеного методу можна визначити не тільки вміст цАМФ у біологічному матеріалі, але й активність цАМФ-залежної протеїнкінази.

Даний метод є конкурентним ELISA і базується на конкуренції цАМФ, що знаходиться у зразку, із цАМФ, кон'югованим з пероксидазою хрому, за зв'язування з анти-цАМФ моноклональними антитілами, іммобілізованими у лунках полістиролового мікропланшета (6.11).

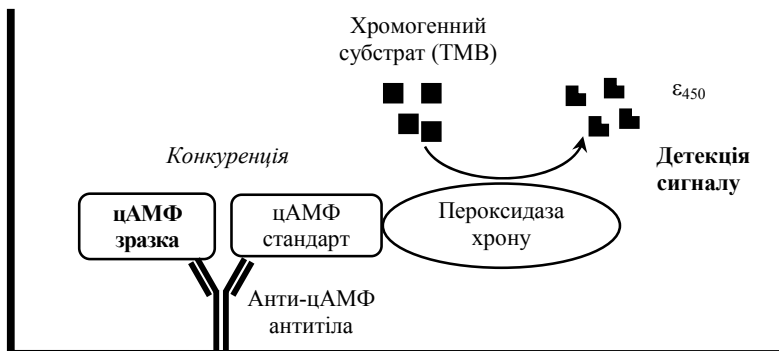


Рис. 6.11. Схема визначення вмісту цАМФ методом колориметричного ELISA

Подальше відмивання дозволяє позбутися надлишкової кількості вільного цАМФ та цАМФ, зв'язаного з пероксидазою хрому. Після цього до інкубаційної суміші додають хромогенний субстрат ТМВ, який розщеплюється ферментом з утворенням забарвленої сполуки, вміст якої визначають колориметрично на мікрорідері за довжини хвилі 450 нм. Після досягнення інтенсивності забарвлення розчину у блакитний колір зупиняють реакцію додаванням стоп-розчину, що змінює колір розчину на жовтий. Хоча результат є стабільним протягом 1 год після зупинки реакції, слід негайно вимірювати оптичну густина.

Оскільки описаний метод є конкурентним, величина оптичної густини зворотно пропорційна кількості цАМФ у досліджуваному зразку. Вимірювання оптичної густини з використанням стандарту цАМФ дозволяє вирахувати абсолютний вміст цАМФ у зразку. Метод дозволяє визначити значення вмісту цАМФ, які відрізняються між собою на 2,1 нмоль. Мінімальний вміст цАМФ, який можна визначити, становить 0,2 нмоль, максимальний – 120 нмоль. Для визначення абсолютної кількості цАМФ у зразку будують стандартну криву – залежність оптичної густини від концентрації цАМФ стандарту, який розводять з утворенням розчинів різної концентрації та проводять визначення описаним методом. Метод ELISA є більш ніж у 10 разів чутливіший для визначення цАМФ, ніж цГМФ і цІМФ, для яких спостерігається незначна імунореактивність.

6.2.1.4. Метод люмінесцентного ELISA

Принцип визначення цАМФ методом люмінесцентного ELISA подібний до такого для колориметричного методу ІФА й базується на конкуренції цАМФ зразка із цАМФ стандартом, кон'югованим з пероксидазою хрому, за зв'язування з іммобілізованими анти-цАМФ моноклональними антитілами. Після інкубації з цАМФ та відмивання додають хемілюмінесцентний субстрат (люміноген) та пероксид водню. Під утвореного утвореного в результаті ферментативної реакції кисню субстрат окиснюється і випромінює світло, інтенсивність якого вимірюють на планшетному люмінометрі.

Інтенсивність світла, що випромінюється, виражають у відносних світлових одиницях (англ., relative light units, RLU), вона зворотно пропорційна кількості цАМФ у зразку. Для абсолютного визначення кількості цАМФ у даному зразку необхідно будувати стандартну криву залежності інтенсивності світла від різних концентрацій цАМФ стандарту, отриману описаним вище методом.

6.2.1.5. Метод AlphaScreen™

Метод AlphaScreen™ (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) є високочутливою технологією, що дозволяє визначати концентрацію цАМФ у широкому динамічному діапазоні. Він базується на явищі хемілюмінесценції, яка виникає при зв'язуванні цАМФ, міченого біотином, з анти-цАМФ антитілами. На відміну від раніше описаного методу визначення цАМФ хемілюмінесцентним сендвіч-ELISA, у методі AlphaScreen™ використовуються донорні й акцепторні гранули, укриті шаром гідрогелю, що дозволяє зв'язуватися з ними різними біомолекулам (рис. 6.12). При збудженні світлом за довжини хвилі 680 нм фотосенсибілізатор у складі донорної гранули перетворює зовнішній кисень на реактивну синглетну форму. За високої концентрації фотосенсибілізатора, який входить до складу донорної гранули, утворюється 60 000 молекул синглетного кисню за секунду, результатом чого є ампліфікація сигналу. Синглетний кисень реагує з тіоксеном (thioxene) – компонентом акцепторної гранули, що приводить до генерації хемілюмінесцентного сигналу з емісією світла за довжини хвилі

370 нм. Енергія негайно передається на флуорофор, який також знаходиться в акцепторній гранулі, що зсуває довжину хвилі емісії світла до 520–620 нм. Оскільки синглетний кисень нестабільний (середня тривалість життя становить 4 мкс), він може дифундувати тільки на відстань 200 нм до того, як розкладеться. Таке обмеження у відстані забезпечує нездатність специфічної біологічної взаємодії двох гранул: синглетний кисень, що продукується донорними гранулами, не детектується, а акцепторні гранули перебувають поза межами досяжності, якщо не відбувається їхнє збудження світлом. До складу рідера входить вольфрамково-галогенна лампа, призначена для збудження хемілюмінесцентного сигналу.

Метод AlphaScreen™ базується на конкуренції між ендogenous цАМФ, уміст якого визначають у біологічному матеріалі, та екзогенним біотинільованим цАМФ за зв'язування з анти-цАМФ антитілами, кон'югованими з акцепторною гранулою. Тільки біотинільований цАМФ одночасно зв'язується як з донорними гранулами, кон'югованими із стрептавідином, так і з анти-цАМФ специфічними антитілами на акцепторних гранулах, що приводить до генерації сигналу. Ендogenous цАМФ зразка, який розпізнається антитілами, конкурує з біотинільованим цАМФ і витісняє його із сайтів зв'язування антитіл, проте він не взаємодіє із стрептавідином, кон'югованим з донорною гранулою. Оскільки метод є конкурентним, збільшення вмісту ендogenous цАМФ приводить до зменшення інтенсивності сигналу.

Реакцію проводять у мікропланшеті на 384 лунки. Вносять детекторну суміш, змішуючи донорні гранули й розчин біотинільованого цАМФ, інкубують у темній кімнаті та вимірюють інтенсивність світла (AlphaScreen signal), що випромінюється, за довжини хвилі 520–620 нм на мікрорідері.

Аналіз розчинів цАМФ методом AlphaScreen™ показав, що стандартна крива залежності інтенсивності емісії світла від концентрації цієї сполуки має сигмоїдну форму. За цією кривою можна знайти невідомі концентрації цАМФ, визначені в біологічному матеріалі. Перевагою методу є можливість визначення широкого діапазону концентрації цАМФ, які відрізняються на 4–5 порядків, причому низькі концентрації цієї сполуки у зразку можна обчислити з високою точністю.

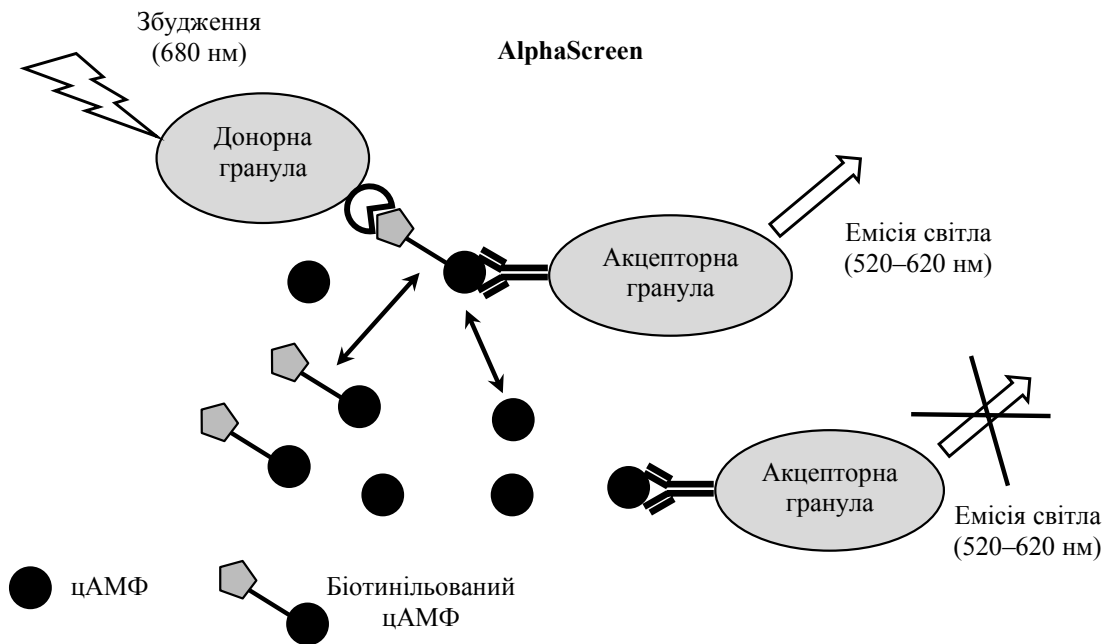


Рис. 6.12. Схема визначення цАМФ методом AlphaScreen™

При застосуванні цього методу слід ураховувати, що гранули чутливі до дії світла. Тому аналіз проводять при відбитому освітленні (нижче 100 люкс або при застосуванні зеленого світлофільтра). Важливо, щоб інкубація проводилась у темній кімнаті або накривати планшет алюмінієвою фольгою.

6.2.1.6. Метод cAMP-Glo™

Уміст цАМФ у клітинах визначають також біолоюмінесцентним методом, який має високу чутливість і продуктивність. У етоді використовується фермент люцифераза, яка бере участь у явищі біолоюмінесценції. Цей фермент є у світляків (наприклад, *Photinus pyralis*) і каталізує реакцію окиснення люциферину, що супроводжується біолоюмінесценцією (випромінюванням світла). Реакція відбувається у два етапи (рис. 6.13):



Світло випромінюється при переході оксилюциферину зі збудженого стану в основний. Реакція має високу енергетичну ефективність, оскільки майже вся енергія реакції трансформується у світло без виділення тепла.

Метод cAMP-Glo™ дає можливість контролювати продукцію цАМФ, який утворюється в результаті активації рецепторів, зв'язаних із G-білками (англ., G protein-coupled receptors, GPCR). Ці рецептори, активуючи чи інгібуючи аденілатциклазу, можуть відповідно збільшувати або зменшувати внутрішньоклітинний рівень цАМФ. Принципом методу є те, що цАМФ стимулює активність холоферменту протейнінази А, яка синтезує цАМФ з АТФ (рис. 6.14). Після цього рівень вільного АТФ у пробі зменшується, що приводить до зменшення випромінювання світла у зчепленій люциферазній реакції (оскільки в цій реакції також використовується АТФ). Реакції проводять у мікропланшетах, тому інтенсивність світла вимірюють на люмінометрі для планшетів.

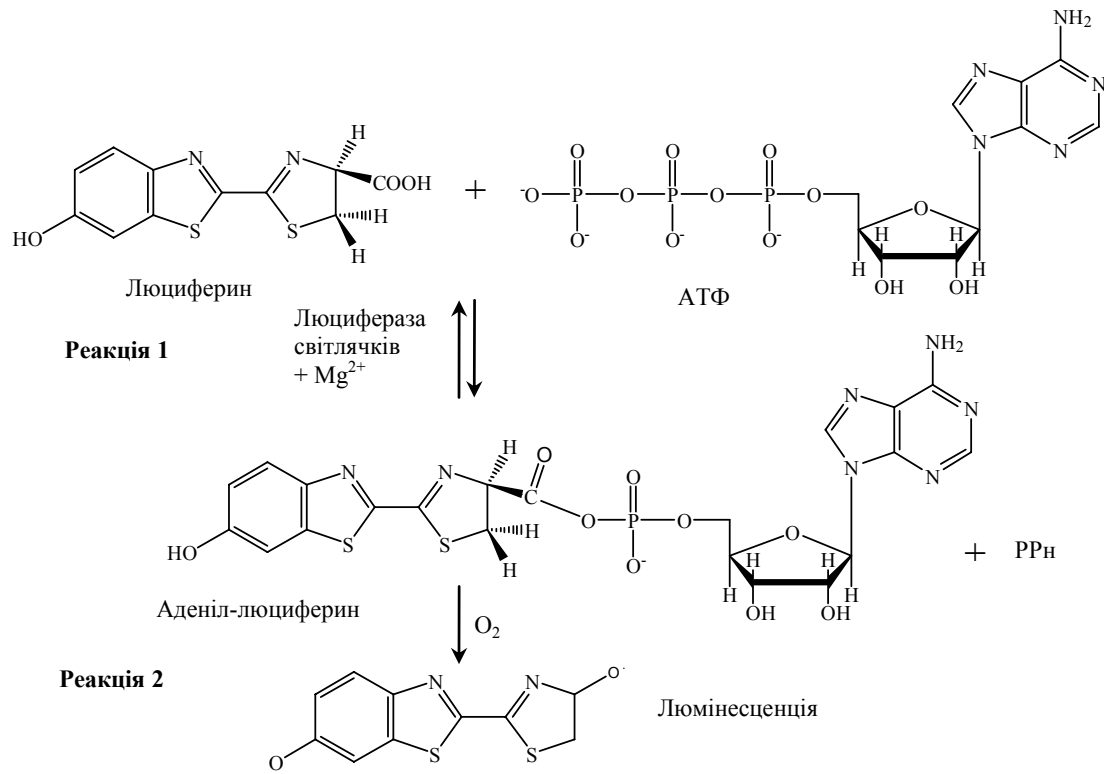


Рис. 6.13. Люциферазна реакція

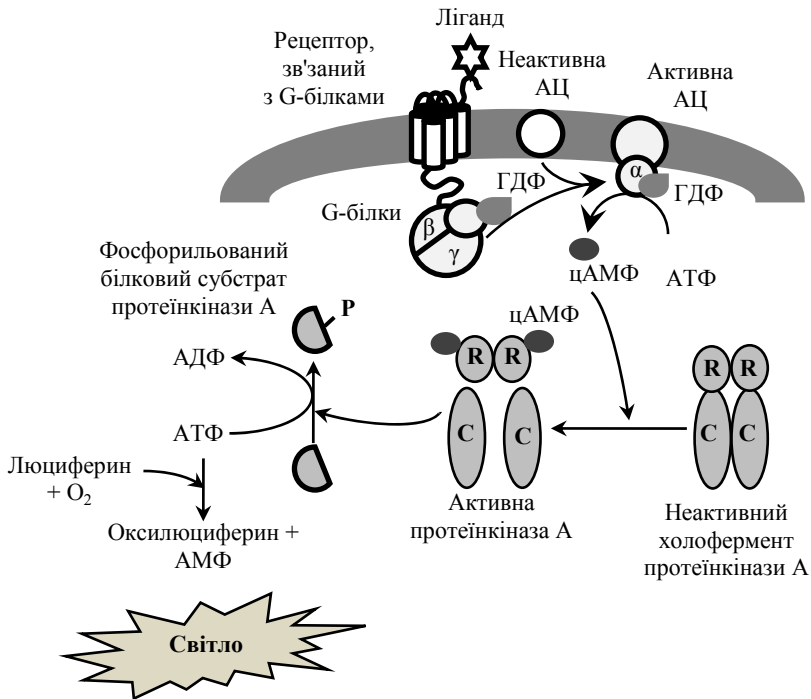


Рис. 6.14. Схема визначення вмісту цАМФ біоломінесцентним методом cAMP-Glo™

6.2.1.7. Метод HTRF (TR-FRET)

Широкого розповсюдження набув метод визначення цАМФ за допомогою технології Time-Resolved FRET (принцип описано у підрозд. 1.6.4), яка базується на флуоресцентному перенесенні енергії. Цим методом визначають вміст цАМФ, який змінюється при модуляції активності аденілатциклази рецепторами, зв'язаних із G-білками (GPCRs). Він уможливує вимірювання цАМФ як у живих клітинах, так і в мембранних препаратах, стимульованих агоністами GPCRs. У його основу покладено конкурентний імунологічний метод, у якому цАМФ зразка конкурує із цАМФ тест-системи, міченим HTRF-акцептором XL665, за зв'язування з анти-цАМФ моноклональними антиті-

лами, міченими криптаном Eu^{3+} (HTRF-донор). Максимальний сигнал FRET спостерігається, коли у зразку немає цАМФ, оскільки у цьому випадку донор і акцептор перебувають у безпосередній близькості. Тому величина сигналу обернено пропорційна концентрації цАМФ у зразку. Збільшення часового проміжку вимірювання і визначення співвідношення інтенсивності флуоресценції за довжин хвиль 665 нм і 620 нм дозволяє позбутися фонові флуоресценції.

В іншій модифікації визначення цАМФ конкурентним методом TR-FRET як донор використовують криптан Eu^{3+} , зв'язаний з анти-цАМФ антитілами, а як акцептор – d2, кон'югований безпосередньо з цАМФ тест-системи. Систему збуджують світлом за довжини хвилі 320 нм. Сигнал FRET генерується, коли мічений цАМФ взаємодіє з цими антитілами, при цьому випромінюється світло за довжини хвилі 665 нм, що відповідає випромінюванню збудженого Eu^{3+} . цАМФ зразка конкурує з міченим d2 цАМФ тест-системи за зв'язування з антитілами, що приводить до зменшення інтенсивності сигналу FRET (рис. 6.15). Тому при збільшенні концентрації цАМФ у зразку інтенсивності сигналу зменшується.

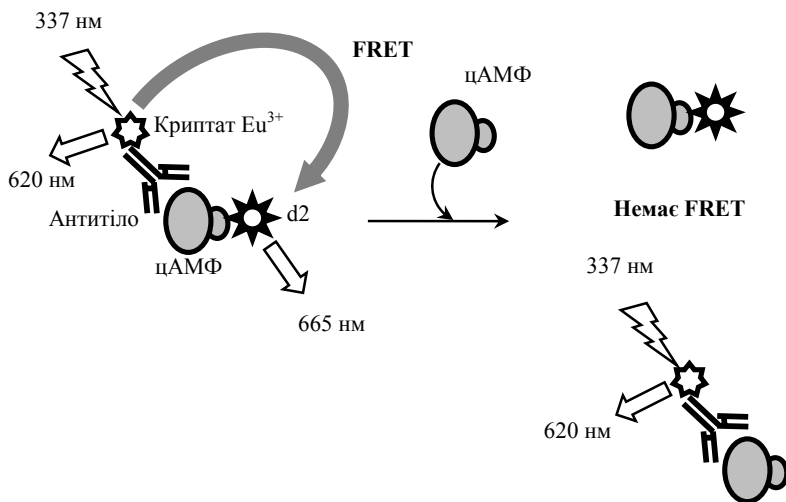


Рис. 6.15. Схематичне зображення визначення вмісту цАМФ конкурентним методом TR-FRET

6.2.1.8. Метод LANCE

Метод LANCE простий у виконанні й водночас високоефективний і гнучкий. З його допомогою вимірюють вміст цАМФ у цілих клітинах або мембранних препаратах, стимульованих агоністами чи антагоністами GPCRs. Він поєднує в собі технологію гомогенного TR-FRET із хімією флуоресцентного барвника червоного зміщення Alexa® Fluor для того, щоб максимально розділити процеси збудження і поглинання. Це зменшує рівень фонового сигналу ("шуму"). Метод LANCE базується на конкуренції між цАМФ зразка та комплексом біотинільованого цАМФ зі стрептавідином, міченим хелатом Європію (комплекс біотин-цАМФ і Eu-стрептавідин), за зв'язування з цАМФ-специфічними антитілами, міченими барвником Alexa Fluor® 647. Коли антитіла зв'язані з комплексом біотин-цАМФ і Eu-стрептавідин, то світловий імпульс за довжини хвилі 340 нм збуджує молекули хелату Eu. Енергія передається на молекулу Alexa Fluor® 647, кон'юговану з антитілами. У результаті випромінюється світло за довжини хвилі 665 нм (рис. 6.16). Інтенсивність флуоресценції, яку вимірюють за довжини хвилі 665 нм, зменшується у присутності цАМФ у зразку, тому величина сигналу обернено пропорційна концентрації цАМФ у зразку.

Цей метод спрямований на визначення рівня цАМФ, що продукується у живих клітинах, або в мембранних препаратах, стимульованих агоністами рецепторів, зв'язаних з G-білками.

Імпульс світла за довжини хвилі 340 нм збуджує хелат Європію у складі комплексу біотин-цАМФ з Eu-стрептавідином. Енергія передається від хелату на барвник Alexa Fluor® 647, зв'язаний з анти-цАМФ антитілами, у результаті генерується сигнал TR-FRET, і хелат Eu випромінює світло за довжини хвилі 615 нм. цАМФ зразка конкурує з біотинільованим цАМФ за зв'язування з антитілами, і інтенсивність сигналу зменшується.

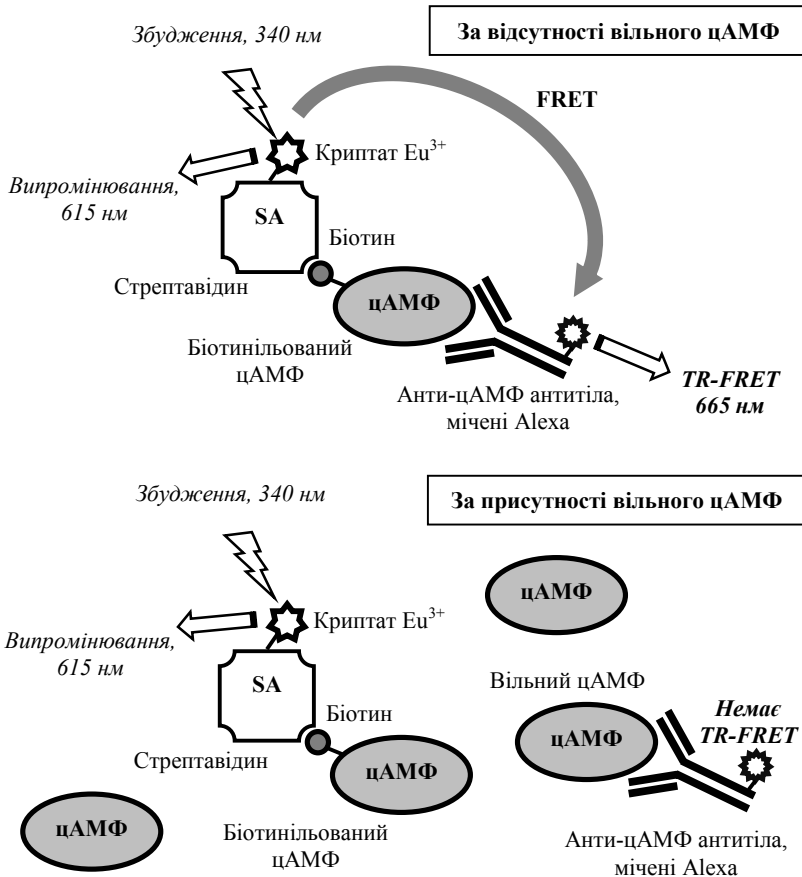


Рис. 6.16. Принцип визначення цАМФ методом LANCE

6.2.2. Визначення активності аденілатциклази

Аденілатциклази є родиною мембранозв'язаних ферментів, які каталізують перетворення АТФ на цАМФ – загальнопоширений вторинний посередник, який активує цАМФ-залежну протеїнкіназу (протеїнкіназу А). Методи визначення активності аденілатциклази базуються на вимірюванні вмісту цАМФ і дозволяють оцінювати швидкість перетворення АТФ на цАМФ

(Post, 2000). Поряд із радіоізотопними методами широко використовують імуноферментні, флуоресцентні та люмінесцентні методи. Люмінесцентна технологія AlphaScreen та HTRF-технологія LANCE (ґрунтується на явищі флуоресцентного резонансного перенесення енергії) дозволяють визначити зміни рівня цАМФ, утвореного за дії аденілатциклази. Їх було докладно описано в підрозд. 6.2.1, тому тут їх не наведено.

6.2.2.1. Радіоізотопні методи

Найпершими методами визначення активності аденілатциклази (пмоль цАМФ/хв·мг білка) були радіоактивні методи. Активність ферменту може бути визначена у клітинних мембранах чи гомогенатах з використанням радіоактивно міченого субстрату – $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ (Salomon, 1974). Мічений цАМФ, що утворюється внаслідок ферментативної реакції, відокремлюють хроматографічно, наприклад, на Dowex AG 50, і визначають радіоактивність в отриманих фракціях. За значеннями радіоактивності вираховують вміст міченого цАМФ, що дозволяє судити про активність аденілатциклази.

Наводимо алгоритм визначення активності аденілатциклази з використанням міченого $[\text{}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$. Реакційну суміш створюють, додаючи у пробірки агоніст або антагоніст рецепторів, зв'язаних з G-білками, і гомогенат тканини або мембранну фракцію. Проводять інкубацію за температури 30–37 °С, зупиняють реакцію додаванням стоп-розчину, що містить SDS, АТФ і цАМФ. Мічений і немічений цАМФ розділяють за допомогою хроматографії на колонці з Dowex. Для перевірки відновлення зразка після хроматографії до проб попередньо додають $[\text{}^3\text{H}]\text{цАМФ}$, який використовують як внутрішній стандарт. Елюат наносять на колонку з оксидом алюмінію і знову проводять елюцію. Елюат вносять у флакони зі сцинтиляційною рідиною і вимірюють радіоактивність у двоканальному режимі: контролюють відновлення внутрішнього стандарту й визначають вміст $[\text{}^{32}\text{P}]\text{цАМФ}$. Ці методи зазнавали вдосконалень, зокрема, для підвищення чутливості визначення застосовували одноразові поліпропіленові колонки (Alvarez, 1990).

У другому методі визначення активності аденілатциклази реєструють накопичення [^3H]цАМФ у клітинах. Клітини інкубують з міченим [^3H]аденіном для мічення внутрішньоклітинного пулу аденілових нуклеотидів, зокрема АТФ. За вмістом [^3H]цАМФ у клітинних екстрактах судять про активність аденілатциклази.

Процедура визначення включає такі етапи. Клітини інкубують у поживному середовищі з [^3H]аденіном та інгібітором фосфодіестерази, після чого в них утворюється мічений [^3H]АТФ. Потім клітини відмивають для видалення позаклітинного міченого аденіну, додають агоністи рецепторів, зв'язаних із G-білками та інкубують клітини за температури 37 °С у планшетах. Зупиняють реакцію видаленням поживного середовища і додаванням ТХО. До лунок планшета додають [^{32}P]цАМФ, який використовують як внутрішній стандарт. [^3H]цАМФ відокремлюють від [^3H]АТФ та інших нуклеотидів шляхом послідовної хроматографії на колонках з Dowex та оксидом алюмінію. В елюаті, отриманому після хроматографії на Dowex, вимірюють радіоактивність для оцінки включення [^3H]аденіну в [^3H]АТФ. В елюатах, одержаних з колонки з оксидом алюмінію, визначають радіоактивність у двоканальному режимі. При цьому за вмістом [^{32}P] судять про відновлення внутрішнього стандарту, а за вмістом [^3H]цАМФ – про вміст цАМФ у зразку.

6.2.2.2. Метод FlashPlate

Цей метод є новою модифікацією радіоізотопних методів визначення активності аденілатциклази. Він дозволяє визначати активацію цього ферменту за накопиченням продукту – цАМФ (англ. назва методу – Adenyl Cyclase Activation FlashPlate Assay). З його допомогою можна визначати не тільки активацію, а й інгібування аденілатциклази у мембранних препаратах під дією рецепторів, зв'язаних з G-білками.

Метод FlashPlate має цілий ряд переваг перед іншими радіоактивними методами визначення активності аденілатциклази. Він є функціональним, оскільки визначення можна проводити також у живих клітинах. Метод є гомогенним і виконується лише в декілька етапів, не потребуючи екстракції цАМФ і відми-

вань. Для цього використовуються планшети – FlashPlate, які являють собою білі полістиролові мікропланшети, придатні для гомогенних радіометричних вимірювань у великому об'ємі. Внутрішня частина кожної лунки вкрита тонким шаром речовини, здатної до сцинтиляції, що дозволяє використовувати цілий ряд радіоактивних ізотопів (^3H , ^{125}I , ^{14}C і ^{33}P) без відмивання і без додавання сцинтиляційної рідини.

Живі клітини додають до планшета FlashPlate, стимулюють або інгібують, а потім лізують і проводять детекцію; результати можна отримати вже в перший день експерименту. Усі процедури виконуються в одній лунці. Клітини не потрібно вирощувати в мікропланшетах до стимуляції й тому не потрібно переносити. Метод також має високу специфічність. Концентрація цАМФ вимірюється у межах від 10 до 1000 пмоль/мл. Метод FlashPlate придатний для високоефективного скринінгу великої кількості суперродини рецепторів, пов'язаних з G-білками, та вивчення дії агоністів і антагоністів.

Процедура визначення проводиться наступним чином (рис. 6.17). На лунках планшета FlashPlate іммобілізовано анти-цАМФ антитіла. До лунок додають клітини і цАМФ стандарт. Клітини стимулюють фосколіном – безпосереднім активатором аденілатциклази, оскільки в нестимульованих клітинах базальний рівень цАМФ дуже низький. Додають детекційну суміш, яка містить сполуку, що збільшує проникність клітинної мембрани, та азид натрію. Інкують клітини за кімнатної температури протягом доби для базальної продукції цАМФ. Після цього додають фіксовану кількість радіоактивно міченого [^{125}I]цАМФ. Останній зв'язується з анти-цАМФ антитілами, іммобілізованими на лунках планшета FlashPlate. Немічений цАМФ, що продукується клітинами, заміщує фіксовану кількість радіоактивно міченого цАМФ. При збільшенні вмісту неміченого цАМФ він заміщує свій радіоактивний аналог [^{125}I]цАМФ, при цьому з часом зменшується інтенсивність сигналу. Після інкубації планшети зчитують у сцинтиляційному лічильнику для мікропланшетів. З використанням цАМФ стандарту будують калібрувальну криву.

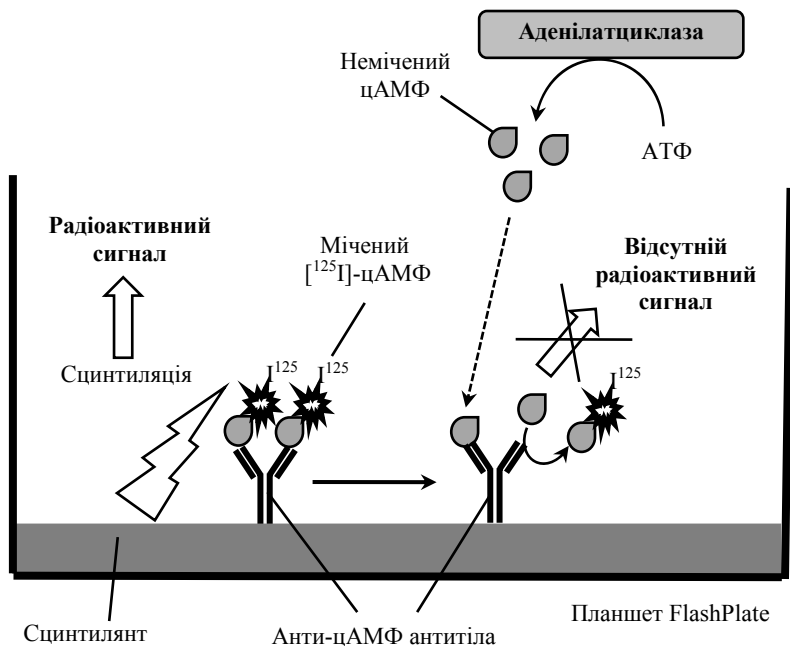


Рис. 6.17. Схема визначення активності аденілатциклази методом FlashPlate

6.2.2.3. Ензиматичний флуориметричний метод

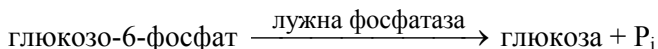
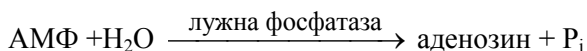
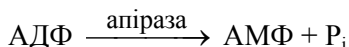
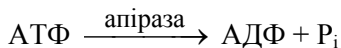
Незважаючи на високу чутливість, радіоактивні методи визначення активності аденілатциклази є дорогими і потребують тривалого часу для виконання. Нині запропоновано безпечніші для дослідника й навколишнього середовища нерадіоактивні методи.

Одним із них є високочутливий ензиматичний флуориметричний метод, який має чутливість, аналогічну до радіоактивного, і є більш безпечним, дешевим та швидким (Wiegn, 1993). Перевагою ензиматичного флуориметричного методу є те, що він дозволяє з високою точністю вимірювати накопичення цАМФ за дії аденілатциклази, використовуючи тільки ферментативні реакції, які включають в себе декілька етапів. Спочатку (етап 1) проводять видалення зі зразка селективно інтерферуючих сполук (АТФ, АДФ). Нециклічні аденілові нуклеотиди, такі як

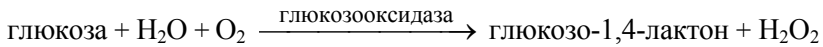
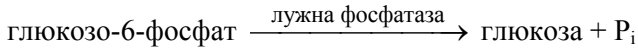
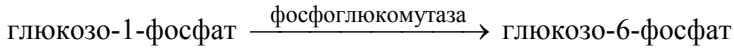
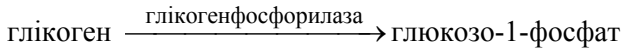
АМФ, АДФ і АТФ, присутні в біологічних зразках у концентраціях, у сотні й навіть у тисячі більших, ніж концентрація цАМФ, і, до того ж, їхня хімічна структура подібна до цАМФ. Зокрема, концентрація АТФ у клітині в мільйон разів перевищує концентрація цАМФ. Ці сполуки будуть інтерферувати з цАМФ під час його визначення у зразку, тому концентрацію останнього неможливо визначити без попереднього видалення ендogenous АТФ. У ході реакцій очищення 1-го етапу АТФ послідовно перетворюють за допомогою апірази на АДФ і АМФ, після чого АМФ розщеплюється до аденозину, а аденозин – до інозину. Для видалення глікогену із зразка його розщеплюють на глюкозо-1-фосфат, який перетворюють на глюкозо-6-фосфат, а його – на глюкозу. При окисненні глюкози утворюється глюкозо-1,4-лактон. На 2-му етапі цАМФ за допомогою фосфодіестрази перетворюють на АМФ, який на 3-му етапі фосфорилується міокіназою до АДФ, який у реакції з фосфоенолпіруватом фосфорилується до АТФ. На 4-му етапі проводять ампліфікацію утвореного АТФ у реакціях з фруктозою з утворенням фруктозо-6-фосфату та АДФ з наступною взаємодією АДФ з фосфоенолпіруватом з утворенням АТФ і пірувату. Етап 5 являє собою безпосередньо детекцію НАДФН, який утворюється, коли фруктозо-6-фосфат ізомеризується у глюкозо-6-фосфат, а останній реагує з НАДФ⁺. Продуктами цієї реакції є фосфоглюконолактон і НАДФН. Концентрацію утвореного НАДФН визначають флуориметрично, за її величиною судять про концентрацію цАМФ. Механізм визначення складається з таких етапів.

Етап 1

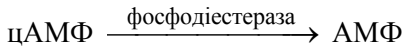
1.1. Реакції очищення-видалення нециклічних нуклеотидів та ендogenous глюкозо-6-фосфату:



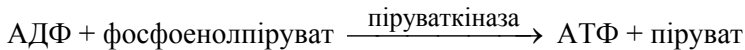
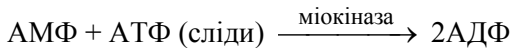
1.2. Необов'язкові реакції очищення – видалення ендogenous глікогену в біологічному зразку:



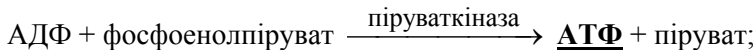
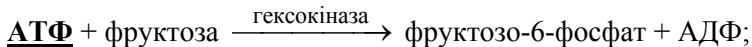
Етап 2. Реакція перетворення на цАМФ на АТФ:



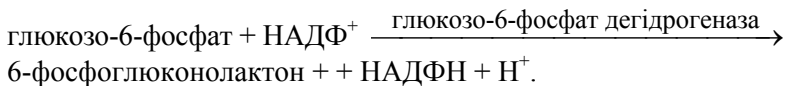
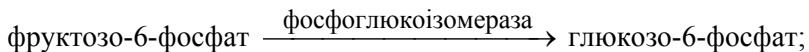
Етап 3. Реакції перетворення АМФ на АТФ:



Етап 4. Ампліфікація за допомогою циклічних реакцій АТФ-АДФ (чутливість методу підвищується у 6 000–10 000 разів).



Етап 5. Реакція детекції – фотометричне визначення НАДФН:



Метод дозволяє визначити концентрацію цАМФ у біологічному зразку у межах пікомолів і фентомолів.

6.2.2.4. Метод ELISA

Активність аденілатциклази також визначають методом ELISA з використанням анти-цАМФ антитіл, за яким можна судити про накопичення цАМФ в інтактних клітинах (рис. 6.18).

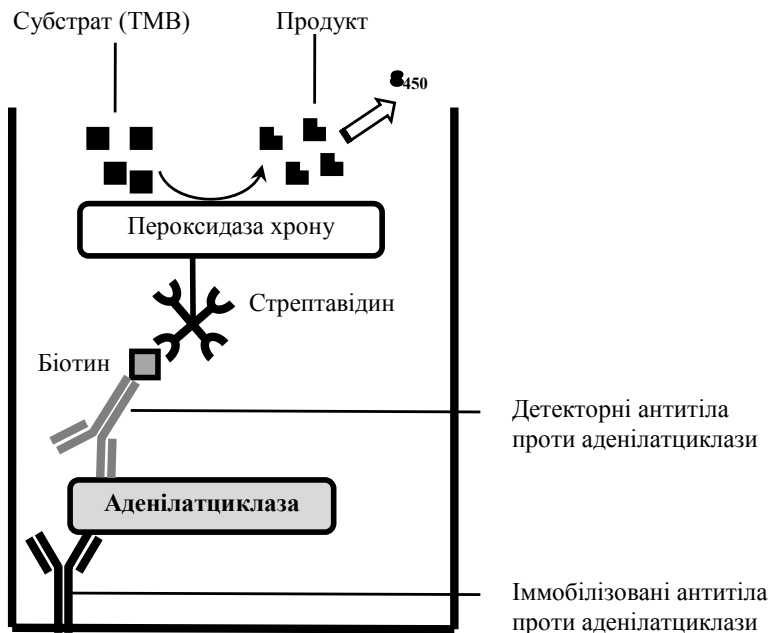


Рис. 6.18. Схема визначення активності аденілатциклази методом ELISA

Принцип аналогічний до того, що використовується для визначення вмісту цАМФ у біологічних зразках (див. підрозд. 6.2.1.3). Недоліком є те, що компоненти реакційної суміші можуть перехресно взаємодіяти з антитілами. Даний метод визначення активності аденілатциклази є кількісним "сендвіч"-ІФА (принцип викладено в підрозд. 6.1.2). Антитіла, специфічні до цього ферменту, іммобілізовано на мікропланшеті. До лунок вносять зразок (джерело аденілатциклази), фермент іммобілізується на антитілах. Після інкубації додають цАМФ-стандарт або цАМФ-зразок. Після видалення незв'язаних сполук вносять специфічні до аденілатциклази антитіла, кон'юговані з біотином. Інкують 1 год за температури 37 °С, відмивають і додають пероксидазу хрону, кон'юговану з авідином. Знову інкують і відмивають для видалення незв'язаного ферменту й додають субстрат ТМВ.

Розвивається забарвлення, інтенсивність якого пропорційна вмісту аденілатциклази, яка зв'язалась з антитілами на першому етапі визначення. Зупиняють реакцію додаванням 1 н H_2SO_4 . Вимірюють на рідері для мікропланшетів оптичну щільність у кожній лунці за довжини хвилі 450 нм, віднімаючи від неї значення за довжини хвилі 570 нм.

6.2.3. Визначення активності фосфодіестерази циклічних нуклеотидів

Фосфодіестерази циклічних нуклеотидів залучені до багатьох клітинних процесів, оскільки вони контролюють внутрішньоклітинний рівень вторинних посередників цАМФ і цГМФ. На сьогодні визначено щонайменше сім родин фосфодіестераз (англ., PDE I-VII). Вони відрізняються за субстратною специфічністю, тканинним розподілом, чутливістю до інгібіторів та особливостями регуляції. Ці ферменти класифікують за їхньою специфічністю до цАМФ чи цГМФ. Існують фосфодіестерази, які гідролізують виключно цАМФ або виключно цГМФ, а також ті, які діють на обидва циклічні нуклеотиди. Інгібування фосфодіестераз приводить до накопичення у клітині як цАМФ, так і цГМФ, які залучені у величезну кількість біохімічних процесів та фізіологічних ефектів.

Активність фосфодіестераз порушується за різних хвороб: астми, хронічній обструктивній хворобі легень, дисфункції ерекції, порушеннях навчання та пам'яті, депресії, нейродегенеративних та аутоімунних захворюваннях, серцевій недостатності, інфаркті міокарда тощо. Дослідження показали, що фосфодіестераза може бути ефективною мішенню для багатьох фармакологічних препаратів. Особливо актуальним є пошук інгібіторів, специфічних до певних ізоферментів фосфодіестерази. У різних тканинах експресуються певні ізоформи цього ферменту, які залучені у специфічні для даної тканини процеси. Тому нові селективні інгібітори фосфодіестераз дозволяють спрямовано впливати на ці процеси. Зокрема, інгібітори PDE IV привертають увагу як нові препарати для лікування астми, що здатні посилювати активацію клітин запалення.

На сучасному етапі розроблено велику кількість методів визначення активності фосфодіестерази циклічних нуклеотидів. Створено нові високопродуктивні методи HTS (High Throughput Screening), які дозволяють швидко, з високою чутливістю і точністю визначати активність ферменту у великій кількості зразків.

Активність 2'-фосфодіестерази циклічних нуклеотидів зазвичай оцінюють *in vitro* за рівнем гідролізу цАМФ/цГМФ. Класичними методами визначення активності була радіометрична детекція з використанням міченого цАМФ. На їхній основі сьогодні створено нові методи (SPA, FlashPlate), виконання яких є більш простим, а результати – більш коректними. Дешевшими й доступнішими є нерадіоактивні методи, найпоширенішим серед яких є PDE-Glo™ і HTRF (Eapen, 2010). Вони використовуються для дослідження процесів сигнальної трансдукції, які ініціюються рецепторами, зв'язаними з G-білками, а також для пошуку нових селективних інгібіторів фосфодіестераз тощо. Такі інгібітори є потенційними фармакологічними препаратами. Справді, було знайдено нові препарати, які селективно інгібують різні форми фосфодіестераз. До них належить, наприклад, препарат Viagra® – інгібітор PDE V.

6.2.3.1. Метод SPA

Цей новий радіоактивний метод було розроблено для пошуку дії інгібіторів фосфодіестерази циклічних нуклеотидів. У ньому використовуються мічені циклічні нуклеотиди [³H]цАМФ або [³H]цГМФ, при гідролізі яких за дії фосфодіестерази утворюють мічені нуклеозидмонофосфати – відповідно [³H]АМФ і [³H]ГМФ. Їхню радіоактивність визначають за допомогою SPA гранул, здатних до сцинтиляції, завдяки чому сигнал посилюється. Традиційні методи визначення активності фосфодіестерази циклічних нуклеотидів за гідролізом цАМФ чи цГМФ включали в себе очищення утворених продуктів шляхом хроматографії на колонці (Thompson, 1979) і селективної преципітації (Schilling, 1994). Але такі методи є малоефективними для високопродуктивного аналізу великої кількості зразків.

Метод SPA (Scintillation proximity assay) ґрунтується на тому, що у присутності сульфату цинку лінійні (нециклічні) нуклеотиди міцніше зв'язуються зі SPA-гранулами, ніж циклічні. Якщо вірно підібрати умови, продукт ферментативної реакції гідролізу $[^3\text{H}]\text{цАМФ}/[^3\text{H}]\text{цГМФ}$ під впливом фосфодіестерази циклічних нуклеотидів буде безпосередньо зв'язуватись із гранулами, а субстрат – ні. SPA гранули являють собою кульки з ітрію – аналогу лантану, хімічного елементу з атомним номером 39, сіро-білого металу, який відносять до рідкоземельних елементів.

При зв'язуванні радіоактивно міченого продукту з гранулою ізотоп опиняється в безпосередній близькості до них, і радіоактивне випромінювання тритію збуджує сцинтиляцію всередині гранули (рис. 6.19). Незв'язана радіоактивна мітка нездатна викликати сцинтиляцію, оскільки вона знаходиться на відстані, недостатній для перенесення енергії з ізотопу на гранулу, і в цьому випадку сигнал не виникає. До того ж, оскільки циклічний нуклеотид нездатний ефективно зв'язуватися з гранулою, майже не виникає фонового сигналу. Оптимальні концентрації сульфату цинку посилюють зв'язування субстрату фосфодіестерази $[^3\text{H}]\text{цАМФ}/[^3\text{H}]\text{цГМФ}$ з гранулою. Тому сульфат цинку використовують для зупинки реакції, оскільки при додаванні їх лінійний нуклеотид $[^3\text{H}]\text{АМФ}/[^3\text{H}]\text{ГМФ}$ припиняє зв'язуватися з гранулами.

Реакцію проводять у спеціальних мікропланшетах або поліпропіленових пробірках. У проби вносять зразок (фосфодіестеразу), буферний розчин, інгібітор ферменту та $[^3\text{H}]\text{цАМФ}/[^3\text{H}]\text{цГМФ}$. Інкубують 30 хв за температури 30 °С. Зупиняють реакцію гідролізу додаванням SPA гранул, струшуванням суспензії на шейкері, інкубують 20 хв і вираховують радіоактивність у сцинтиляційному лічильнику. Для визначення активності фосфодіестерази будують стандартну криву залежності радіоактивності від різних концентрацій міченого $[^3\text{H}]\text{АМФ}$. Для цього проводять ферментативну реакцію, використовуючи стандартну кількість ферменту та мітку в діапазоні концентрацій (до 0,25 мкКю/пробу), у цих межах залежність є лінійною.

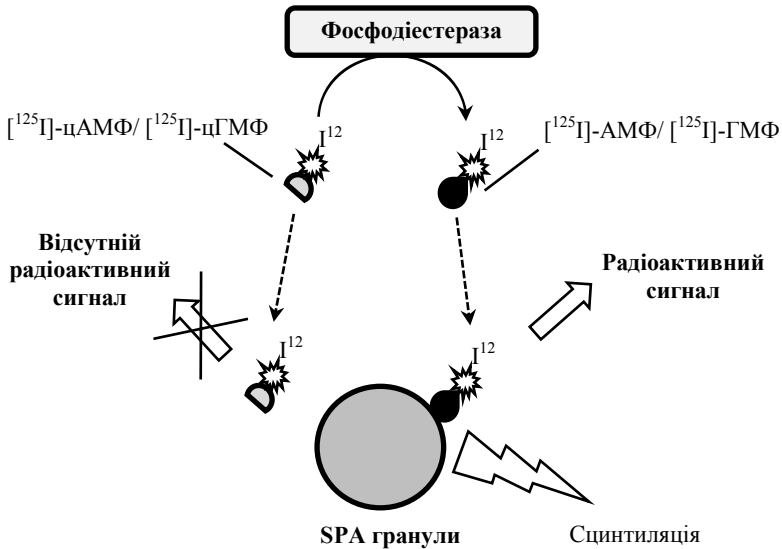


Рис. 6.19. Схема визначення активності фосфодіестерази циклічних нуклеотидів методом SPA

6.2.3.2. Метод FlashPlate®

Цим методом визначають активність фосфодіестерази циклічних нуклеотидів з використанням радіоактивно мічених циклічних нуклеозидмонофосфатів – $[^{125}\text{I}]\text{цАМФ}$ і $[^{125}\text{I}]\text{цГМФ}$. Принцип методу аналогічний методу FlashPlate® визначення активності аденілатциклази (описано в підрозд. 6.2.2.2). Реакцію проводять у спеціальному планшеті (FlashPlate), лунки якого вкриті сполукою, здатною до сцинтиляції. На лунках планшета FlashPlate також іммобілізовано анти-цАМФ (або анти-цГМФ) антитіла. При зв'язуванні з ними мічених циклічних нуклеозидмонофосфатів у сцинтиляційній субстанції генерується радіоактивний сигнал.

Фосфодіестераза каталізує розщеплення $[^{125}\text{I}]\text{цАМФ}$ або $[^{125}\text{I}]\text{цГМФ}$ з утворенням відповідно $[^{125}\text{I}]\text{АМФ}$ і $[^{125}\text{I}]\text{ГМФ}$. Анти-цАМФ і анти-цГМФ антитіла не зв'язуються з утвореними міченими нуклеозидмонофосфатами, тому сцинтиляції не виникає й інтенсивність радіоактивного сигналу зменшується (рис. 6.20).

Якщо досліджують вплив інгібіторів на активність фосфодіестерази, то при внесенні таких сполук активність ферменту зменшується, і зменшення вмісту циклічних нуклеотидів не реєструється.

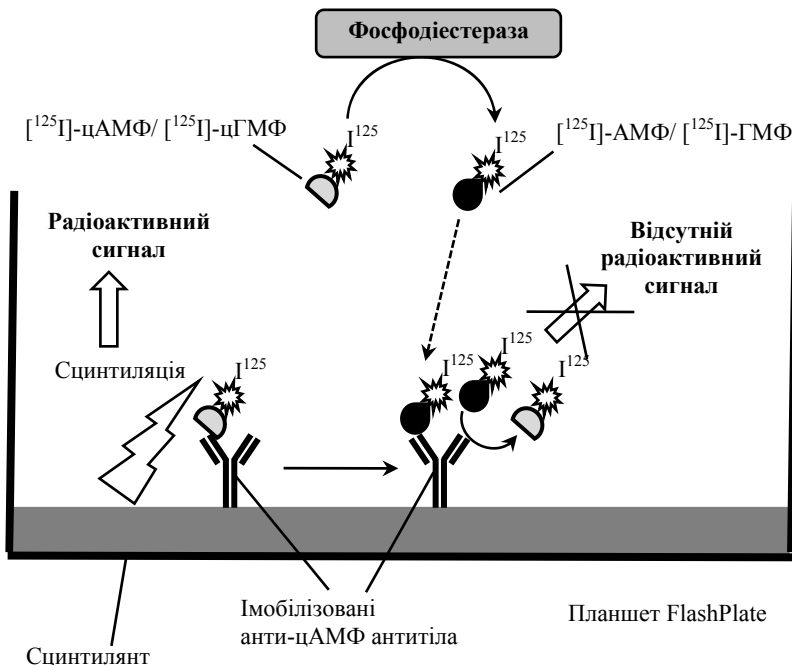


Рис. 6.20. Схема визначення активності фосфодіестерази циклічних нуклеотидів методом FlashPlate®

Метод FlashPlate® дуже простий у виконанні. У лунки планшета вносять зразок (джерело фосфодіестерази) у стимуляційному буфері, детекторну суміш (містить $[^{125}\text{I}]\text{-АМФ}$), інкубують 2 год за кімнатної температури і зчитують радіоактивність у планшеті на сцинтиляційному лічильнику. Для побудування стандартної кривої замість фосфодіестерази зразка використовують немічений цАМФ/цГМФ і проводять аналогічні операції.

Метод є гомогенним, тобто не потребує відокремлення зв'язаних $[^{125}\text{I}]\text{-цАМФ}$ і $[^{125}\text{I}]\text{-цГМФ}$ від незв'язаних. З його допомогою можна одночасно аналізувати велику кількість зразків

(у 96 та 384 лунках), що особливо важливо при тестуванні потенційних фармакологічних препаратів на базі інгібіторів фосфодіестерази циклічних нуклеотидів. Висока точність уможливило його використання для кінетичних досліджень. Методом FlashPlate® можна визначати вміст цАМФ і цГМФ у сироватці та плазмі крові й сечі.

6.2.3.3. Метод поляризації флуоресценції

Метод є нерадіоактивним, він базується на поляризації флуоресценції й належить до категорії методів HTS-методів (англ., High Throughput Screening). Для визначення активності фосфодіестерази циклічних нуклеотидів використовуються антитіла, що впізнають мічений флуоресцеїном цАМФ (Флуо-цАМФ) (рис. 6.21). При його зв'язуванні з антитілами ці великі молекули обертаються повільно, і тому реєструється високий рівень поляризаційного сигналу. У присутності фосфодіестерази мічений Флуо-цАМФ розщеплюється до Флуо-АМФ, який нездатний зв'язатися з анти-цАМФ антитілами. Малі молекули Флуо-АМФ обертаються швидко, що викликає низький рівень поляризаційного сигналу.

Визначення проводять таким чином. У лунки мікропланшета вносять антитіла, зразок (джерело фосфодіестерази), детекторну суміш (містить Флуо-цАМФ), інкубують 60 хв за кімнатної температури і зчитують мікропланшет на флуоресцентно-поляризаційному рідері. Стандартну криву будують, використовуючи замість фосфодіестерази немічений цАМФ і проводячи ті самі операції.

Алгоритм визначення активності фосфодіестерази методом поляризації флуоресценції схожий з таким для методу FlashPlate® (описано у попередньому розділі), у якому використовують не флуоресцентно, а радіоактивно мічений цАМФ, і при його зв'язуванні з анти-цАМФ антитілами реєструють не флуоресценцію, а радіоактивність.

Метод поляризації флуоресценції також є гомогенним, дозволяє оцінити велику кількість зразків і добре підлягає мініатюризації, тобто визначення може бути проведено в малих об'ємах.

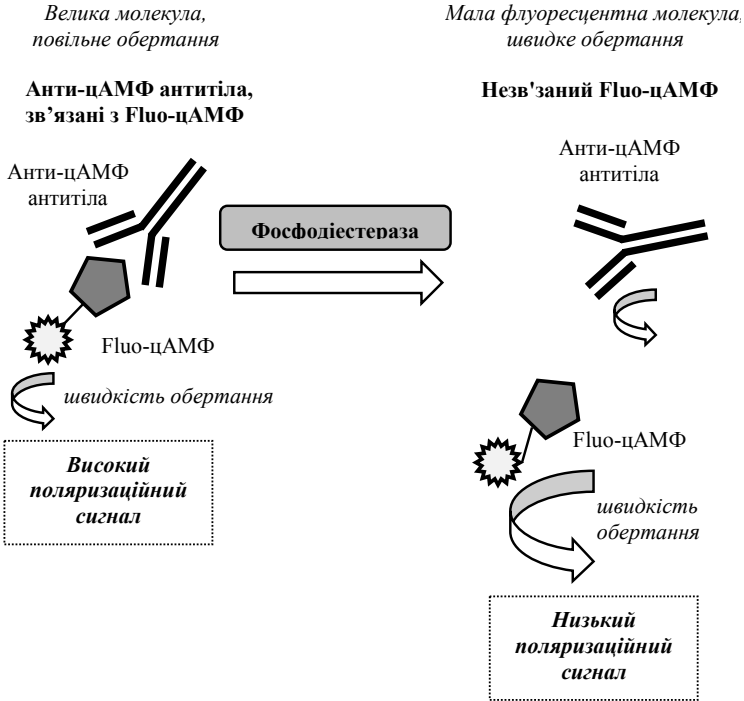


Рис. 6.21. Схема визначення активності фосфодіестерази циклічних нуклеотидів методом поляризації флуоресценції

6.2.3.4. Метод PDE-Glo™

Цей люмінесцентний метод має високу продуктивність і дозволяє визначити активність фосфодіестерази циклічних нуклеотидів у багатьох біологічних зразках. Принцип методу аналогічний до цАМФ-Glo™, описаного в підрозд. 6.2.1.6. З його допомогою можна оцінити активність як цАМФ-залежної, так і цГМФ-залежної фосфодіестерази.

Визначення здійснюють таким чином (рис. 6.22). Реакції проводять у спеціальній камері без освітлення. Фосфодіестераза гідролізує цАМФ, унаслідок чого його концентрація зменшується. цАМФ зв'язується з холоферментом неактивної протеїнкінази А, її регуляторна субодиниця підлягає конформаційним змінам, а каталітичні субодиниці вивільнюються.

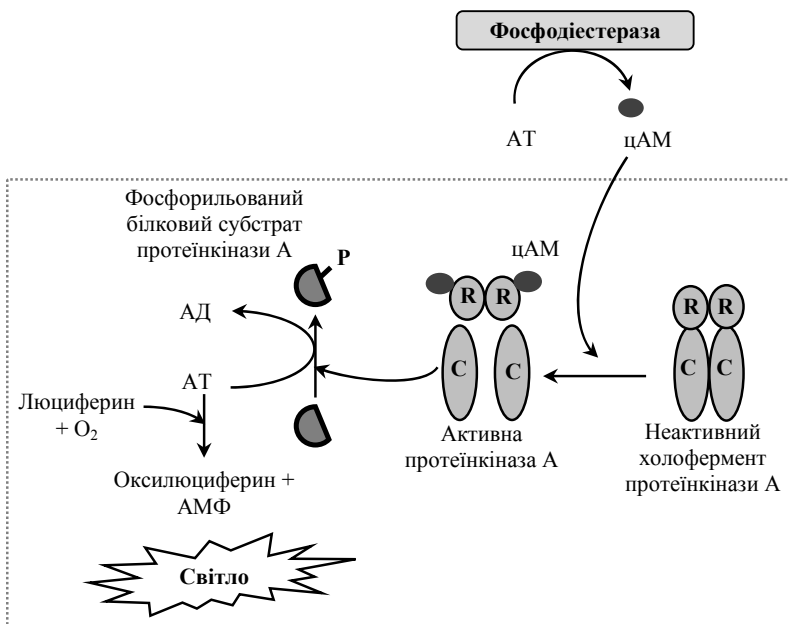


Рис. 6.22. Схема визначення активності фосфодіестерази циклічних нуклеотидів методом PDE-Glo™

Вільні каталітичні субодиниці каталізують перенесення кінцевого залишку фосфорної кислоти від АТФ на субстрат протеїнкінази А, таким чином у реакцію залучається АТФ, який використовується люциферазою для перетворення люциферину на оксилюциферин і генерацію світла. Оскільки протеїнкіназна та люциферазна реакції зчеплені, то чим більшим є рівень залишкового (не перетвореного протеїнкіназою) АТФ, тим активніше проходить люциферазна реакція, і тим більша інтенсивність світлового сигналу і, відповідно, меншою є активність фосфодіестерази цАМФ. Отже, активність фосфодіестерази обернено пропорційна величині сигналу. У зв'язку з тим, що фосфодіестераза гідролізує цАМФ, його вміст зменшується, і чим він нижче, тим менше активується протеїнкіназа А і тим більша кількість АТФ доступна для люциферазної реакції. У результаті люмінесценція збільшується. Отже, рівень люмінесценції прямо пропорційний залишковому рівню АТФ, що прямо пропорційно активності фосфодіестерази.

Спочатку проводять реакцію гідролізу цАМФ під впливом фосфодіестерази, після інкубації додають реагент Kinase-Glo[®], інкубують 10 хв і вимірюють інтенсивність світла на люмінометрі для мікропланшетів. Напівіснування люмінесцентного сигналу становить близько 4 год. Усі процедури в методі PDE-Glo[™] потребують лише 1 год для виконання. Реакції проводять у мікропланшеті на 384 лунки (можливе також використання мікропланшета на 1536 лунок), що дозволяє одночасно дослідити велику кількість зразків.

Як позитивний контроль при визначенні цАМФ використовують очищену активну рекомбінантну фосфодіестеразу, специфічну до цАМФ (наприклад, виділену із мозку бика). При визначенні фосфодіестерази цГМФ використовують, відповідно, фермент, специфічний до цГМФ.

Аналогічний принцип має метод PDELight[™], у якому зміну вмісту цАМФ під час його гідролізу фосфодіестеразою визначають у зчепленій люциферазній реакції.

6.2.3.5. Метод фосфатного сенсора

Для визначення активності фосфодіестераз циклічних нуклеотидів (цАМФ і цГМФ) оптимізовано метод фосфатного сенсора (Phosphate Sensor). У цьому методі застосовують фосфатний сенсор – дуже просту систему, придатну для безпосереднього вимірювання вмісту неорганічного фосфату, утвореного під час ферментативної реакції. Він являє собою фосфатзв'язувальний білок, з'єднаний із флуорофором MDCC (Blount, 2004). Коли сенсор зв'язується з неорганічним фосфатом, інтенсивність його флуоресценції збільшується у 6–8 разів, що можна відстежувати в реальному часі. Величина флуоресцентного сигналу залежить від вмісту фосфату, що вивільнюється. Таке вимірювання вмісту фосфату не залежить від специфічного субстрату чи ферменту, тому цей метод можна широко використовувати для визначення активності багатьох ферментів.

Для вимірювання активності фосфодіестерази циклічних нуклеотидів використовують зчеплену реакцію гідролізу нуклеозидмонофосфату (АМФ чи ГМФ), яка каталізується лужною фо-

сфатазою (рис. 6.23). АМФ чи ГМФ утворюються при розщепленні відповідно цАМФ і цГМФ за дії фосфодіестерази циклічних нуклеотидів. Коли фосфодіестераза розщеплює циклічний нуклеотид, утворюється нуклеозидмонофосфат. У зчепленій реакції під впливом лужної фосфатази він гідролізується до нуклеозиду і неорганічного фосфату. Останній зв'язується з фосфатним сенсором. Флуорофор, зв'язаний з білком сенсора, починає випромінювати світло. Інтенсивність флуоресценції вимірюють на рідері для мікропланшетів за довжини хвилі збудження 430 м і випромінювання 450 нм.

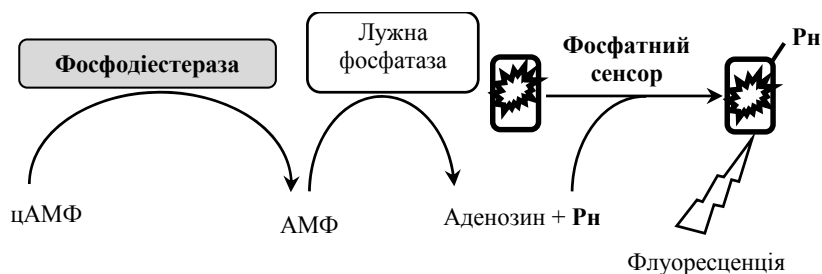


Рис. 6.23. Схема визначення активності фосфодіестерази циклічних нуклеотидів методом фосфатного сенсора

Метод фосфатного сенсора набагато чутливіший, більш швидкий і простіший порівняно з іншими методами, наприклад тими, у яких використовується люцифераза (метод PDE-Glo™, див. підрозд. 6.2.3.4). Він дозволяє вимірювати пікомольні кількості неорганічного фосфату при визначенні активності не лише фосфодіестерази, а й протеїнфосфатази, АТФаз, ГТФаз тощо. Оскільки вимірювання здійснюється в реальному часі, метод придатний для проведення кінетичних досліджень.

При проведенні аналізу слід пам'ятати, що неорганічний фосфат присутній у багатьох біологічних зразках, буферних розчинах і реагентах, пластиковому і скляному посуді. Тому при використанні фосфатного сенсора слід уникати контамінації фосфатами. Для цього методу фірмами-виробниками розроблено спеціальні мікропланшети на 384 лунки.

6.2.3.6. Метод Biomol Green

Метод є нерадіоактивним, у ньому поєднано ферментативну систему з колориметричним визначенням неорганічного фосфату за допомогою реагенту Biomol Green. Він також належить до категорії HTS (high throughput screening) методів, тому що має високу точність, чутливість і простоту виконання. Метод адаптовано для мікропланшетів, завдяки чому можна одночасно протестувати багато зразків, зокрема при проведенні скринінгу модуляторів та інгібіторів фосфодіестерази циклічних нуклеотидів.

Визначення проводять таким чином (рис. 6.24). Фосфодіестераза циклічних нуклеотидів розщеплює цАМФ чи цГМФ до АМФ і ГМФ відповідно. Утворені 5'-нуклеозидмонофосфати розщеплюються, гідролізуються 5'-нуклеотидазою до 5'-нуклеозидів і неорганічного фосфату. Вміст фосфату визначають за допомогою реагенту Biomol Green модифікованим аналогом малахітового зеленого. Цей реагент використовують для визначення неорганічного фосфату, а також, наприклад, для визначення активності таких ферментів, як фосфатази (див. підрозд. 6.2.3.6).

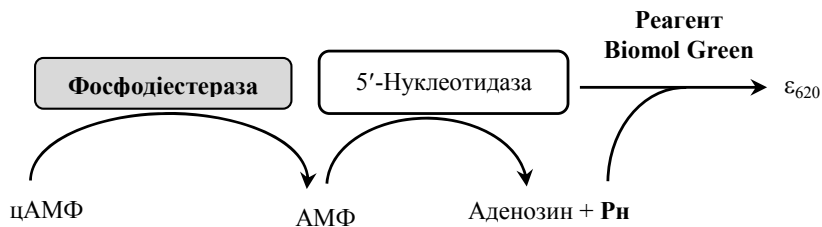


Рис. 6.24. Схема визначення активності фосфодіестерази циклічних нуклеотидів методом Biomol Green

Зразок або очищену фосфодіестеразу інкубують з цАМФ і 5'-нуклеотидазою у присутності IBMX або без нього за температури 30 °С. Реакцію зупиняють додаванням реагенту Biomol Green, інкубують протягом 30 хв і вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 620 нм на спектрофотометрі для мікропланшетів. Як стандарт використовують 5'-АМФ, за допомогою якого будують стандартну криву залежності оптичної густини розчину від концентрації цього нуклеозидмонофосфату.

Як і в інших методах скринінгу інгібіторів фосфодіестерази циклічних нуклеотидів, для контролю використовують неспецифічний інгібітор ферменту 3-ізобутил-1-метилксантин (ІВМХ).

6.2.4. Визначення активності цАМФ-залежної протеїнкінази

Протеїнкіназа А (цАМФ-залежна протеїнкіназа) належить до важливого класу протеїнкіназ, які називаються Арг-спрямованими кіназами, або родиною АРС-кіназ. До неї також відносять протеїнкінази G (цГМФ-залежна протеїнкіназа) і С, а також Акт і RSK-кінази. Ці протеїнкінази мають субстратну специфічність до Арг у положенні 3 щодо фосфорильованого серину чи треоніну.

Неактивна протеїнкіназа А є гетеротетрамером, який складається із димеру регуляторних субодиниць (R) і димеру каталітичних субодиниць (C). Псевдосубстратні послідовності в R-субодиниці блокують активні центри в C-субодиниці. Вторинний посередник цАМФ активує протеїнкіназу А і тим самим запускає фосфорилування білків-мішеней, залучене до процесів регуляції транскрипції генів, іонного транспорту тощо. цАМФ, зв'язуючись із тандемними сайтами на кожній R-субодиниці, холофермент дисоціює і полегшує аутоінгібіторний контакт, у результаті вивільнюється активна C-субодиниця. Активна протеїнкіназа А фосфорилує білкові субстрати за залишками серину і треоніну, які присутні в послідовності Арг-Арг-Хаа-Сер/Тре або Ліз-Арг-Хаа-Хаа-Сер/Тре. Протеїнкіназа А має таку саму субстратну специфічність, як і протеїнкінази С4 і Акт. Субстратами, котрі мають цю послідовність і фосфорилуються протеїнкіназою А, є, наприклад, транскрипційні фактори Bad, CREB, NF-κB. Вхід активної C-субодиниці в клітинне ядро і наступне фосфорилування транскрипційних факторів та ядерних рецепторів забезпечує регуляцію й активацію транскрипції.

Протеїнкіназа А залучена до багатьох клітинних процесів, включаючи модуляцію інших протеїнкіназ, регуляцію внутрішньоклітинної концентрації кальцію та регуляцію транскрипції. Тому вона є однією із мішеней для дії існуючих сьогодні фармакологічних препаратів, а також тих, що перебувають у стадії розробки.

6.2.4.1. Радіоактивний метод

Одним із найперших підходів визначення активності цАМФ-залежної кінази протеїнкінази (протеїнкінази А) був радіоактивний метод, у якому як субстрат для ферменту використовували мічений $[\gamma^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ (Кіо, 1970). Другим (білковим) субстратом є гістон. Під час реакції фосфорилування гістону мічений $[\gamma^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ конкурує з неміченим за зв'язування з ферментом (рис. 6.25).

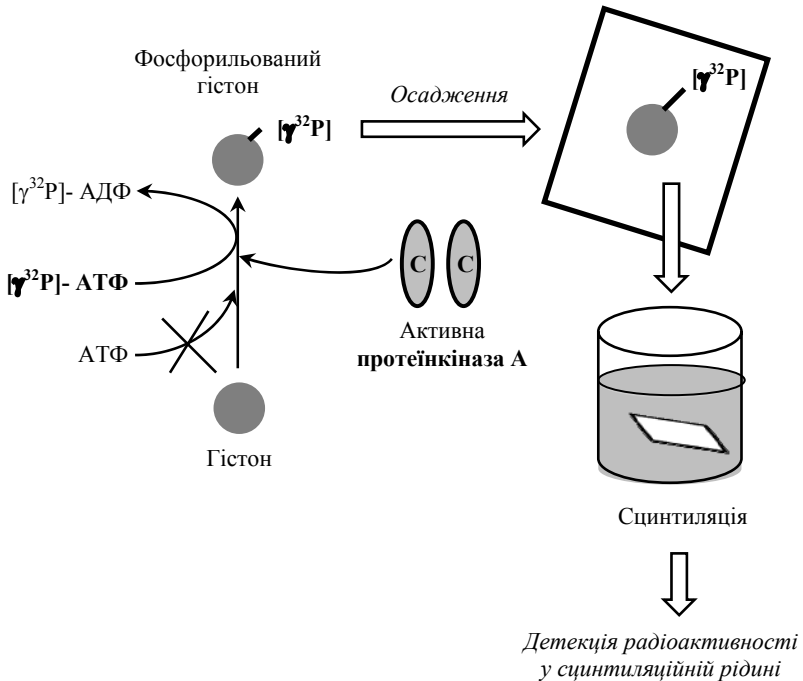


Рис. 6.25. Схема визначення активності протеїнкінази А радіоактивним методом з використанням гістону як субстрату

Реакцію зупиняють додаванням трихлороцтової кислоти (ТХО) і проводять осадження центрифугуванням, після чого розчиняють осад у лузі та ТХО. Далі білок осаджують заокисленням середовища (додають сірчану кислоту, центрифугують, розчиняють осад білка в лузі, після чого повторюють процедуру

осадження ще раз. Радіоактивність вимірюють у сцинтиляційній рідині за допомогою сцинтиляційного лічильника. Вміст утвореного цАМФ у зразку визначають за стандартною кривою залежності інтенсивності радіоактивності від вмісту цАМФ у зразку. Для її побудовання використовують очищений цАМФ.

Нині радіоактивні методи активності протеїнкінази А суттєво вдосконалені. Зазвичай білковий чи пептидний субстрат для ферменту зв'язують на фосфоцелюлозних мембранних фільтрах за рахунок слабких електростатичних взаємодій. Однак за присутності багатьох кіназ (наприклад, у клітинному екстракті) ^{32}P -мічені пептиди чи білки можуть фосфорилуватися не тільки протеїнкіназою А, а й іншими протеїнкіназами.

Для підвищення специфічності визначення активності протеїнкінази А радіоактивним методом було розроблено метод **SignaTECT®** (Goueli, 2001). У ньому використовують пептидний субстрат кемптимід (англ., *Kemptide*) послідовністю LRRASLG, що є похідною природного субстрату піруваткінази. Кемптимід є високоспецифічним субстратом для протеїнкінази А, висока афінність ферменту ($K_m = 5\text{--}10\text{ мкМ}$) до нього надає методу чутливості й дозволяє визначати його активність у багатьох біологічних зразках. Біотинільований субстрат кемптимід, мічений за $[\gamma^{32}\text{P}]$ (10 мкКю/мкл), приєднано до так званої "біотин-утримувальної" мембрани (SAM2® Biotin Capture Membrane), що являє собою стрептавідиновий матрикс. Цю мембрану заздалегідь пронумеровують і частково розрізають для подальшого зчитування радіоактивності у сцинтиляційній рідині. Мембрану можна також аналізувати за допомогою авторадіографії.

Визначення проводять наступним чином (рис. 6.26). У мікроцентрифужних пробірках готують реакційну суміш, яка містить цАМФ, біотинільований пептидний субстрат, мічений $[\gamma^{32}\text{P}]$ АТФ і немічений АТФ. До суміші додають біологічний зразок (джерело ферменту) і проводять інкубацію. Під час ферментативної реакції протеїнкіназа А фосфорилує білковий субстрат, використовуючи радіоактивно мічений АТФ, який конкурує з неміченим АТФ за зв'язування з ферментом. Зупиняють реакцію термінуючим буфером, після чого реакційну суміш наносять на квадратні фрагменти фосфоцелюлозних мембранних фільтрів. Фо-

сфорильований (мічений $[\gamma^{32}\text{P}]$) біотинільований білковий субстрат швидко іммобілізується на мембрані. Для видалення компонентів, які не зв'язалися, фільтр відмивають у соляній та ортофосфатній кислотах, після чого висушують, використовуючи 95% етанол. Висушені зразки поміщають у флакони із сцинтиляційною рідиною і вимірюють радіоактивність. За значенням радіоактивності вираховують активність протеїнкінази А.

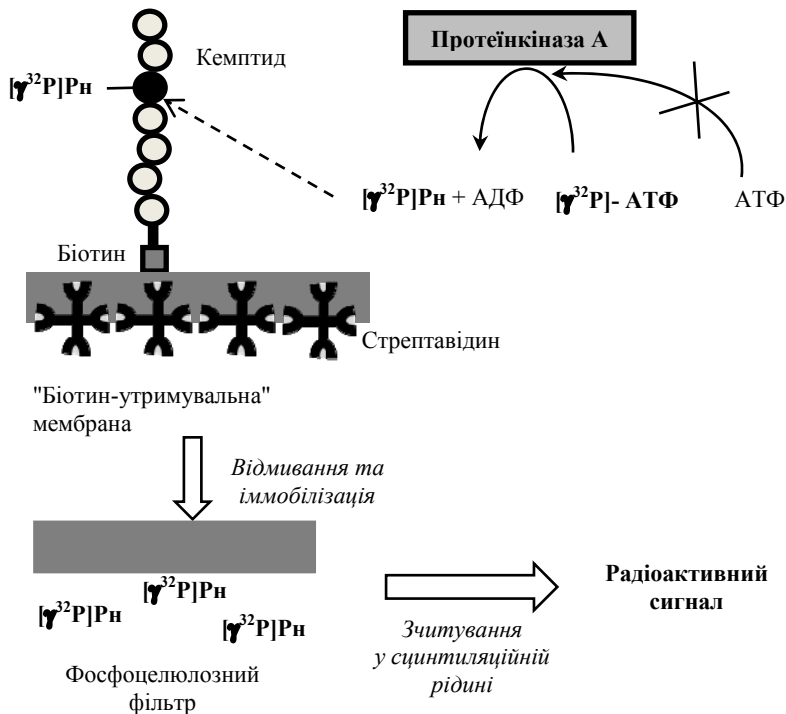


Рис. 6.26. Схема визначення активності протеїнкінази А радіоактивним методом SignaTECT®

Ця зручна і швидка технологія дозволяє проводити визначення з малим рівнем фонового "шуму" та високим співвідношенням сигнал-"шум", навіть якщо використовуються грубі клітинні екстракти.

6.2.4.2. Флуориметричний метод PerTag®

Серед нерадіоактивних методів для визначення активності протеїнкінази А застосовуються модифікації флуориметричного методу (Kagege, 2001). Так, метод PerTag® дозволяє визначити активність протеїнкінази А, а також протеїнкінази С. Як субстрати для протеїнкінази використовують пептиди, мічені флуоресцентною міткою, при розщепленні яких з високою інтенсивністю випромінюється світло (рис. 6.27).

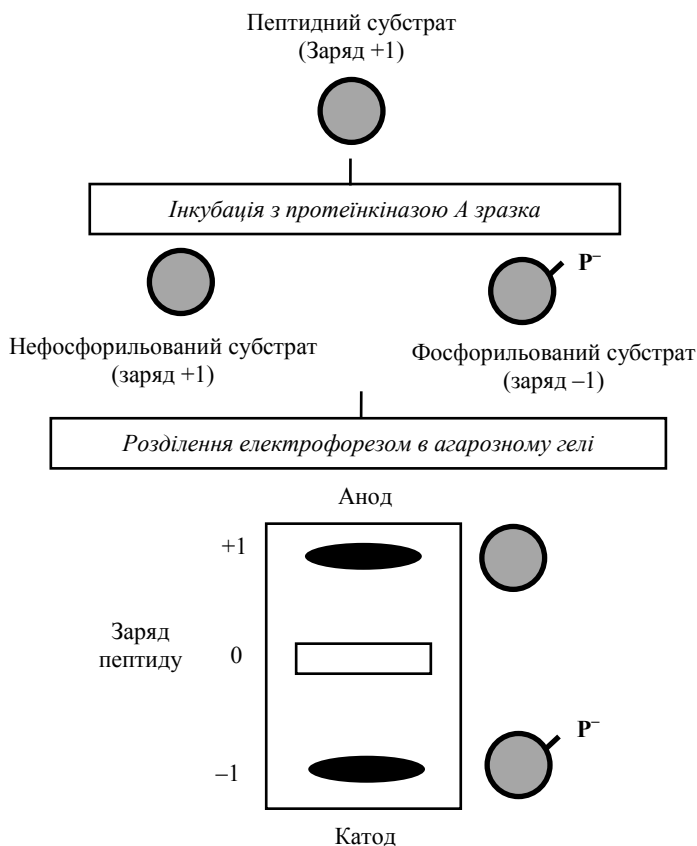


Рис. 6.27. Схема визначення активності протеїнкінази А методом PerTag®

Специфічним пептидним субстратом для протеїнкінази А є пептид PerTag A1 (LRRASLG) або так званий кемптид, для протеїнкінази С – пептид PerTag C1 (PLSRTLVAAK). Фосфорилування таких пептидів за дії протеїнкіназ змінює результуючий заряд із +1 на -1. Це дозволяє відокремити фосфорильований і нефосфорильований субстрати за допомогою електрофорезу в 0,8% агарозному гелі при нейтральному рН. Фосфорильований пептид мігрує до катода (+), а нефосфорильований – до анода (-). Для визначення вмісту фосфорильованого протеїнкіназою пептидного субстрату використовують флуоресцентні системи детекції, вимірюючи інтенсивність випромінювання світла на флуориметрі. За вмістом утвореного субстрату судять про активність протеїнкінази. Крім флуоресцентного методу, його вміст також визначають денситометрично (за допомогою денситометра сканують забарвлені смуги на електрофореграмі) або спектрофотометрично (на рідері для планшетів, вимірюючи екстинкцію за довжини хвилі 570 нм).

Кожна тест-система для визначення активності протеїнкінази містить позитивний контроль – очищений фермент. Для створення позитивного контролю PerTag® пептид інкубують різними кількостями протеїнкінази, зупиняють реакцію прогріванням за температури 95 °С і розділяють зразки електрофоретично. Після цього гель фотографують у трансілюмінаторі. Негативним контролем є зразок, який містить PerTag® пептид і не містить протеїнкінази.

Перевагою методу PerTag® є його швидкість і чутливість: активність очищеної протеїнкінази (у кількості менш ніж 2 нг) можна визначити менш ніж за 2 год. Активність ферменту можна також визначити у частково очищених зразках, що є корисним для швидкого скринінгу фракцій, отриманих під час колонкової хроматографії, а також для скринінгу активаторів та інгібіторів протеїнкіназ.

Метод PerTag® має багато переваг перед радіоактивними методами визначення активності протеїнкіназ. Оскільки використовують флуоресцентно мічений субстрат, то навіть якщо в біологічному зразку відбувається фосфорилування протеїнкіназою інших субстратів, це не впливає на вимірювані значення активності ферменту.

6.2.4.3. Метод ELISA

На відміну від радіоактивного методу, ELISA є безпечним, простим і надійним методом. Його можна застосовувати для скринінгу інгібіторів або активаторів протеїнкінази та для визначення її активності в частково очищених чи грубих ферментних препаратах. Метод базується на твердофазовому непрямому ІФА, принцип якого викладено в підрозд. 6.1.2. У ньому використовують пептидний субстрат протеїнкінази А, іммобілізований на лунках мікропланшета (рис. 6.28). Якщо протеїнкіназа А присутня у зразку, то при додаванні АТФ, що є її другим субстратом, вона фосфорилує пептидний субстрат. Кролячі антитіла, специфічні до фосфорильованого субстрату, зв'язуються з ним. Після цього кіназну реакцію зупиняють, далі додають мічені пероксидазою хрому вторинні антитіла (отримані з кози), специфічні до кролячих IgG. Після короткої інкубації та відмивання додають субстрат для пероксидази (ТМВ), знову інкубують, зупиняють реакцію розчином соляної кислоти і вимірюють оптичну густину розчину за довжини хвилі 650 нм на рідері для мікропланшетів. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна вмісту протеїнкінази А у зразку чи стандарті. Будують стандартну криву з використанням стандарту – очищеної протеїнкінази А з відомою активністю, що є у складі набору для ELISA.

Цим методом можна вимірювати активність протеїнкінази А у великій кількості зразків. Схожий варіант визначення активності протеїнкінази А за допомогою ELISA розроблено низкою компаній – "ArborAssays" (метод DetectX®), "Abcam" та ін.

6.2.4.4. Метод ADP-Glo™

Метод ADP-Glo™ (ADP-Glo™ Kinase Assay) ґрунтується на явищі біоломінесценції й широко застосовується для визначення активності багатьох протеїнкіназ. Він є універсальним, гомогенним і має високу продуктивність. У ньому використовується термостабільна рекомбінантна люцифераза – фермент, який перетворює люциферин на оксилюциферин, що супроводжується випромінюванням світла (біоломінесценцією).

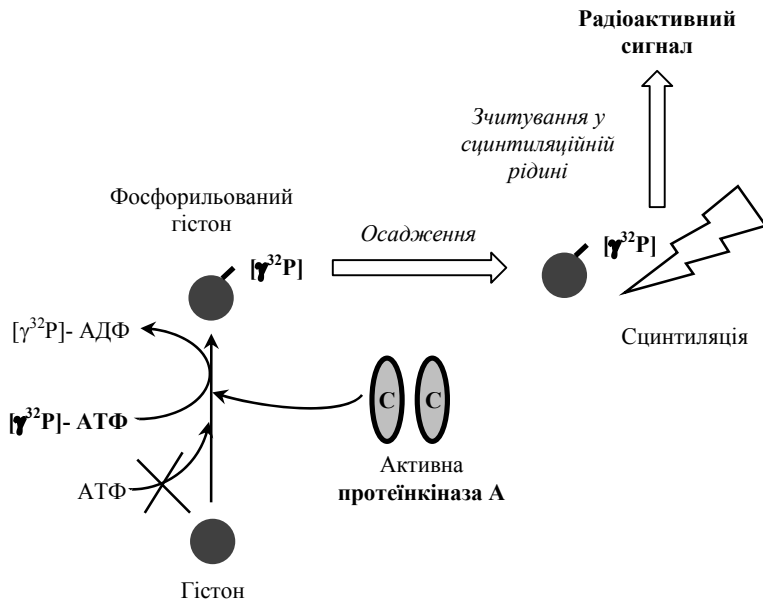


Рис. 6.28. Схема визначення активності протеїнкінази А методом ELISA (DetectX®)

Біоломінесцентним методом Glo™ визначають також вміст цАМФ (див. підрозд. 6.2.1.6, у якому описано принцип методу) та активність фосфодіестерази циклічних нуклеотидів (див. підрозд. 6.2.3.4). Теоретично методом ADP-Glo™ можна визначити активність будь-якого АДФ-перетворювального ферменту (наприклад, кінази або АТФази), використовуючи АТФ у концентрації до 1 мМ. Передбачено використання будь-якої комбінації кінази й субстрату, який може бути пептидом, білком, ліпідом чи цукром. Завдяки своїй високій специфічності, методом ADP-Glo™ можна визначати активність протеїнкіназ навіть із низькою швидкістю перетворення АТФ, наприклад тирозинкіназ, пов'язаних з рецептором фактора росту. Тому метод має високу продуктивність. Перевагою методу є те, що він не потребує використання радіоактивно мічених сполук чи антитіл.

Реакції проводять у мікропланшетах, причому об'єм може бути не більше ніж 5 мкл. Визначення здійснюють у два етапи.

Першим є кіназна реакція, під час якої фосфорилується субстрат, а рівень АТФ зменшується. Її зупиняють додаванням реагенту ADP-Glo™. На другому етапі додають спеціальний кіназо-детектувальний реагент (Kinase Detection Reagent), який перетворює АДФ на АТФ, а вміст новосинтезованого АТФ установлюють у зчепленій люциферазній реакції (рис. 6.29). Люцифераза за участю утвореного АТФ перетворює люциферин на оксилюциферин, що супроводжується випромінюванням світла (біоломінесценцією). Воно є стабільним понад 3 год. Механізм реакції докладно охарактеризовано в підрозділі 6.2.1.6, де описано метод цАМФ-Glo™, тому тут його не наведено. Інтенсивність випромінювання світла (люмінесценції) вимірюють на люмінометрі для мікропланшетів. Вона пропорційна концентрації АДФ, яку визначають за допомогою стандартної кривої, і, відповідно, протеїнкіназної активності. Ця крива являє собою лінійну залежність інтенсивності люмінесценції від відсотка АТФ, перетвореного на АДФ. Метод ADP-Glo™ високочутливий і дозволяє визначати дуже низькі концентрації АДФ (20 нМ), що відповідає 1 мМ концентрації АТФ у реакційній суміші. Це можливо завдяки тому, що співвідношення сигнал-"фон" є дуже високим.

Завдяки своїй чутливості та специфічності метод ADP-Glo™ може використовуватися для визначення кінетичних параметрів ферментів. Оскільки метод придатний для застосування широкого діапазону концентрації АТФ (від мікромолів до мілімолів), він дозволяє виявляти й відокремлювати ефекти конкурентних і неконкурентних інгібіторів кіназ.

6.2.4.5. Метод ProFluor®

Активність очищеної протеїнкінази А з використанням субстрату, міченого флуоресцентною міткою – бісамідом родаміню 110, вимірюють методом ProFluor®. Реакції здійснюють у мікропланшеті на 96 і 384 лунки. Спочатку проводять стандартну кіназну реакцію: додають субстрат протеїнкінази А, сам фермент у буферному розчині та АТФ (рис. 6.30). У цій формі (бісамід родаміню 110) субстрат є нефлуоресцентним. Під час кіназної реакції цей субстрат фосфорилується. Реакцію зупиняють термі-

нуючим буфером, що містить протеазу. Вона одночасно зупиняє кіназну реакцію та видаляє амінокислотні залишки з нефосфорилюваного субстрату протеїнкінази А. Унаслідок цього вивільнюється родамін 110 і флуоресцює. Проте фосфорилюваний субстрат не розщеплюється протеазою повністю і тому нездатний до флуоресценції. Вимірюють інтенсивність флуоресценції за довжини хвилі збудження 485 нм і випромінювання – 530 нм.

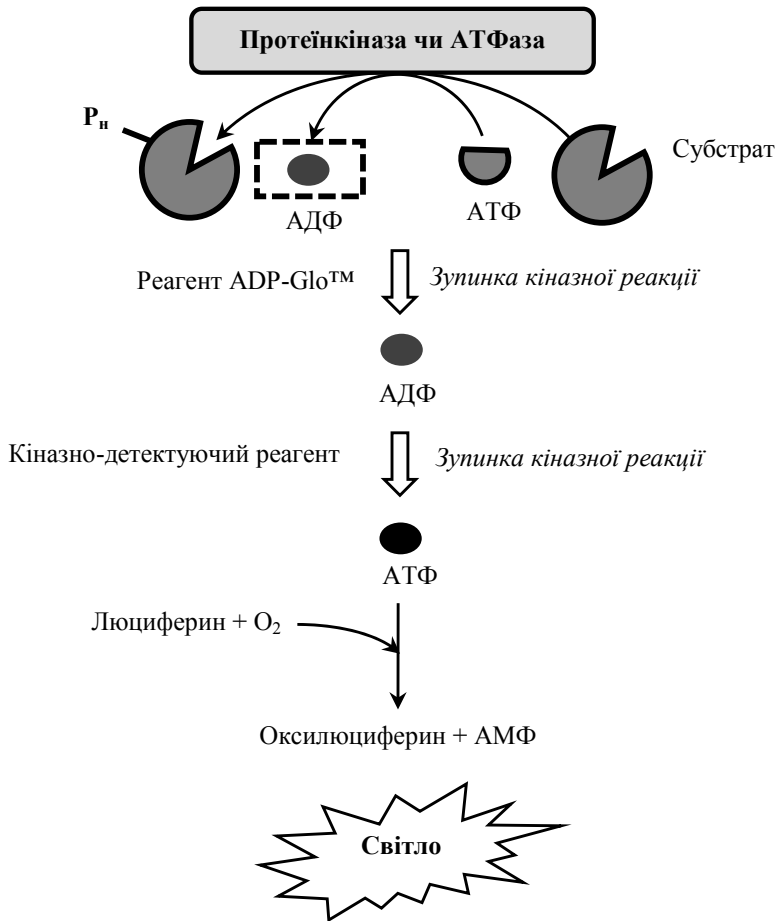


Рис. 6.29. Схема визначення активності протеїнкінази А методом ADP-Glo™

Активність ферменту у зразку визначають за стандартною кривою, яка являє собою залежність інтенсивності флуоресценції (у відносних світлових одиницях) від відсотка фосфорильованого пептидного субстрату. Для її отримання протягом 30 хв проводять реакцію із сумішшю фосфорильованого і нефосфорильованого субстрату, яку розщеплюють протеазою.

Завдяки використанню відповідного субстрату метод ProFluor® має високу чутливість і специфічність. Він дозволяє не тільки визначати активність протеїнкінази А, а й вивчати дію її інгібіторів та відрізнити їх від інших сполук. Для цього необхідні дуже малі кількості ферменту (нг/лунку). Флуоресцентний сигнал дуже стабільний (протягом 4 год інтенсивність флуоресценції змінюється не більше, ніж на 10%).

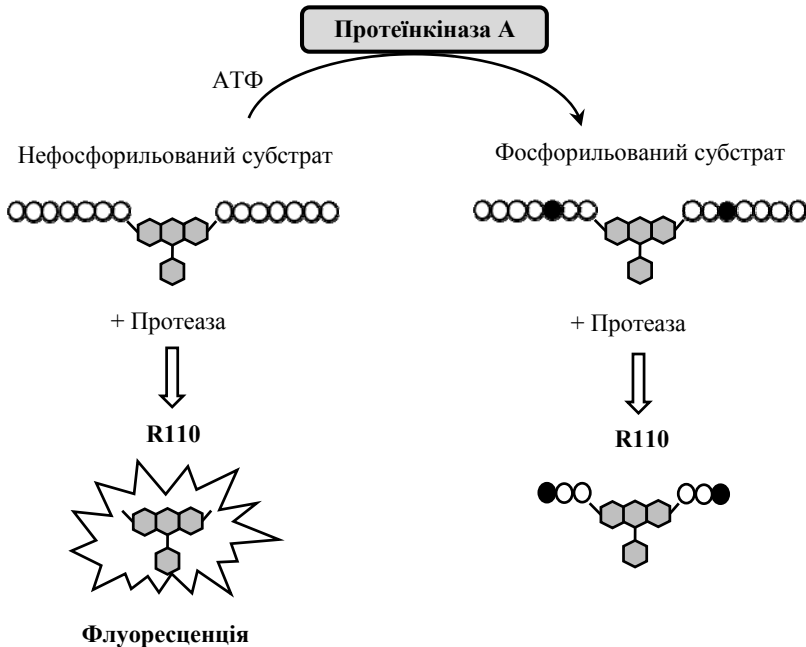


Рис. 6.30. Схема визначення активності протеїнкінази А методом ProFluor®

6.3. ВИВЧЕННЯ цГМФ -ЗАЛЕЖНОЇ СИГНАЛЬНОЇ СИСТЕМИ

6.3.1. Визначення вмісту цГМФ

3',5'-Циклічний гуанозинмонофосфат (цГМФ) є вторинним посередником, який утворюється за дії ферменту гуанілатциклази. Він бере участь у багатьох фізіологічних процесах, включаючи розслаблення гладеньких м'язів, функціонування нирок, запальні процеси, трансдукція сигналу в сітківці. Як і цАМФ , цГМФ широко розповсюджений у всіх тканинах як тварин, так і прокаріотів. Тканинний рівень цГМФ становить від 1/10 до 1/100 від рівня цАМФ і може змінюватися у широких межах. Показано, що ряд лігандів, таких як окситоцин, інсулін, серотонін та гістамін, впливають на внутрішньоклітинну концентрацію цГМФ , що супроводжується зменшенням рівня цАМФ . Вважається, що ці два вторинні посередники сумісно контролюють клітинні функції, діючи як антагоністи, причому важливим є їхнє співвідношення.

Функції цГМФ докладно вивчаються. Він привертає до себе увагу в контексті клінічної медицини. Метаболізм циклічних нуклеотидів порушується під час багатьох хвороб, що супроводжується зростанням рівня цих сполук у крові й сечі, у зв'язку з чим він може бути діагностичним показником. Оскільки цГМФ має важливе фундаментальне і прикладне значення, тепер створено велику кількість методів його визначення. Вони аналогічні до методів визначення цАМФ , найпоширенішими є радіоімунний аналіз, різні варіанти ELISA, HTRF-технологія, що базується на флуоресцентно-резонансному перенесенні енергії, метод AlphaScreen® тощо.

6.3.1.1. Радіоімунний аналіз

Одним із радіоактивних методів визначення вмісту цГМФ у біологічних зразках є радіоімунний аналіз (RIA). Він базується на конкуренції між радіоактивним і нерадіоактивним антигеном за зв'язування з фіксованою кількістю специфічних антитіл.

Схему визначення цАМФ методом RIA було наведено в підрозд. 6.2.1.2, принцип самого методу – у підрозд. 6.1.3.

Даний підхід є модифікацією методу Steiner та ін. (Steiner, 1972). Цими дослідниками було показано, що циклічні нуклеотиди, заміщені у 2'-положенні рибози, мають більшу афінність до антитіл, ніж немодифіковані аналоги. Пізніше групою Cailla було показано, що використання 2'-О-сукциніл-цАМФ збільшує чутливість методу у 100 разів, що дозволяє вимірювати фемтомолярні концентрації нуклеотидів (Cailla, 1973). Також у методі RIA використовують 2'-О-сукциніл-цГМФ.

Як мічений антиген використовують похідну цГМФ – його метиловий ефір, мічений [^{125}I] за тирозином. Немічений цГМФ зразка конкурує з фіксованою кількістю [^{125}I]цГМФ за обмежену кількість центрів зв'язування анти-цГМФ антитіл. Оскільки вміст міченого [^{125}I]цГМФ і вміст антитіл у пробі відомі, кількість міченого нуклеотиду, зв'язаного з антитілами, обернено пропорційна кількості неміченого нуклеотиду, який міститься у біологічному зразку

Відокремлення зв'язаного цГМФ від вільного здійснюють за допомогою комплексу первинних і вторинних антитіл. Первинні антитіла проти сукциніл-цГМФ-альбумінового кон'югату отримують із кроля, а вторинні – проти глобуліну кролів – із вівці. Суміш первинних і вторинних антитіл одночасно вносять у зразок, що дозволяє уникнути декількох етапів інкубації. Проводять лише один етап інкубації протягом ночі за температури 2–8 °С, додають буфер, центрифугують проби й розраховують радіоактивність в осаді на гамма-лічильнику. Методом RIA можна визначити концентрацію цГМФ у межах 0,0025–10,0 пікомолів.

В іншому підході антитіла, зв'язані з цГМФ, реагують із вторинними антитілами, пов'язаними з намагніченими полімерними часточками. Фракцію цГМФ, що зв'язалася з антитілами, відокремлюють від фракції вільного цГМФ за допомогою дії магнітного поля, центрифугування або декантування супернатанту. Вимірювання радіоактивності часточок дозволяє вирахувати вміст цГМФ у зв'язаній фракції. Концентрацію неміченого цГМФ у зразку визначають за стандартною кривою.

6.3.1.2. Метод колориметричного ELISA

Метод визначення вмісту цГМФ у зразках тканин або клітин, як і описаний раніше метод визначення цАМФ (див. підрозд. 6.2.1.3), ґрунтується на процедурі конкурентного ІФА. У цьому випадку цГМФ зразка конкурує з фіксованою кількістю цГМФ, кон'югованого з пероксидазою хрону, за зв'язування з антикродлячими моноклональними антитілами (кроля), іммобілізованими на планшеті. Аналогічно до методу визначення цАМФ, проводять відмивання надлишкового цГМФ, після чого додають хромогенний субстрат ТМВ і вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 450 нм. Для проведення визначення також необхідна побудова калібрувальної кривої з використанням цГМФ стандарту – залежності поглинання від різних концентрацій цГМФ. Її отримують за допомогою указанного вище методу.

6.3.1.3. Метод люмінесцентного ELISA

Метод визначення аналогічний до такого для цАМФ (див. розд. 6.2.1.4). У лунках мікропланшета іммобілізують моноклональні анти-цГМФ антитіла. При додаванні зразка (джерела цГМФ) і фіксованої кількості цГМФ стандарту (кон'югованого з пероксидазою хрону) вони конкурують за зв'язування з антитілами. Внесений хемілюмінесцентний субстрат (люміноген) окиснюється киснем – продуктом ферментативного розщеплення пероксиду водню. Інтенсивність світла, що випромінюється, вимірюють на планшетному люмінометрі. Її величина обернено пропорційна вмісту ГМФ у зразку. Вимірювання інтенсивності випромінювання світла цГМФ стандарту (у різних концентраціях) дозволяє врахувати вміст ГМФ у зразку.

6.3.1.4. Метод HTRF (TR-FRET)

Конкурентний метод на базі Time-Resolved FRET є тотожним методу визначення цАМФ (див. підрозд. 6.2.1.7) і базується на флуоресцентному перенесенні енергії. У ньому використовують анти-цГМФ антитіла, мічені криптомом Eu^{3+} (HTRF-донор), і цГМФ, мічений d2 (HTRF-акцептор). За відсутності цГМФ у зразку антитіла, мічені донором, взаємодіють з міченим цГМФ тест-системи, і спостерігається максимальний сигнал FRET. Це вияв-

ляється у випромінюванні світла за довжини хвилі 665 нм (рис. 6.31). цГМФ зразка конкурує з міченим цГМФ за зв'язування з антитілами, при цьому інтенсивність сигналу FRET зменшується. Інтенсивність сигналу обернено пропорційна концентрації цГМФ у зразку, що дозволяє проводити розрахунки.

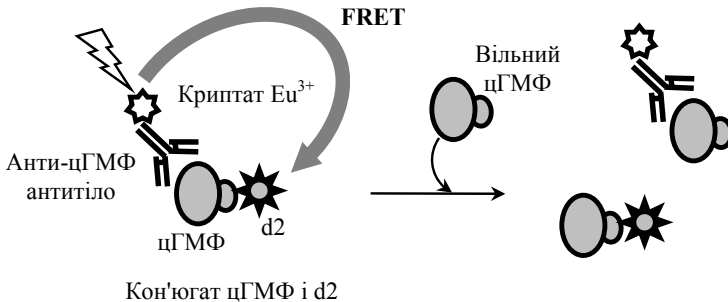


Рис. 6.31. Схематичне зображення визначення вмісту цГМФ конкурентним методом TR-FRET

Визначення можна проводити у цілих чи заморожених клітинах, а також у клітинних екстрактах. Метод є швидким, він потребує лише одного етапу інкубації, аналіз може бути здійснено через 2 год після стимуляції клітин.

6.3.1.5. Метод AlphaScreen®

Принцип методу описано в підрозд. 1.6.2 і є аналогічним до того, що використовується для визначення вмісту цАМФ (див. підрозд. 6.2.1.5). Ендогенний цГМФ конкурує з біотинільованим аналогом (цГМФ тест-системи) за зав'язування з анти-цГМФ антитілами, іммобілізованими на акцепторних гранулах через протеїн А (рис. 6.32). Якщо у зразку немає ендогенного цГМФ, біотинільований цГМФ тест-системи зв'язується з донорними гранулами, укритими стрептавідином, і з антитілами, асоційованими з акцепторними гранулами. При збудженні донорних гранул випромінюється світло з довжиною хвилі 520–620 нм. При збільшенні концентрації ендогенного цГМФ у зразку антитіла насичуються ним і не зв'язуються з біотинільованим цГМ тест-системи, у результаті сигнал зменшується. За стандартною кривою можна визначити вміст цГМФ у зразку.

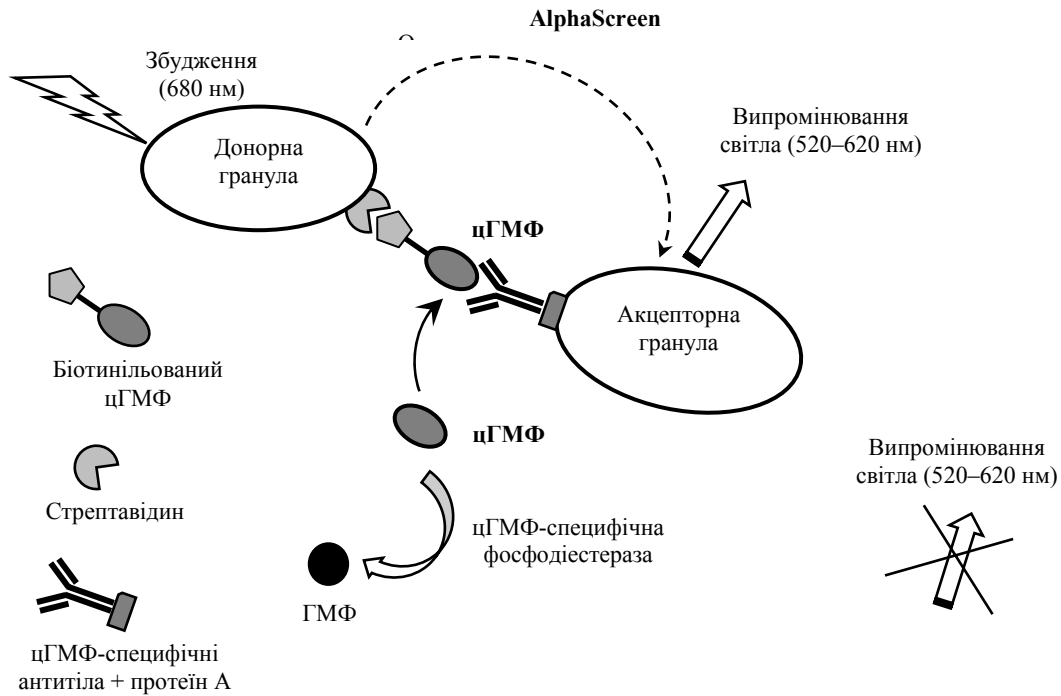


Рис. 6.32. Принцип визначення цГМФ методом AlphaScreen

Метод AlphaScreen® дуже простий для виконання. У лунки мікропланшета вносять суміш акцепторних гранул, укритих портеїном А, з яким зв'язані анти-цГМФ антитіла. Додають стандартний зразок (джерело цГМФ), біотинільований цГМФ, інкубують 5 хв, після чого суміш донорних гранул, укритих стрептавідином, інкубують протягом години за кімнатної температури й вимірюють поглинання на мікрорідері.

6.3.2. Визначення активності гуанілатциклази

Розчинна гуанілатциклаза (ГТФ-пірофосфатліаза циклізуюча, К.Ф. 4.6.1.2) каталізує перетворення ГТФ на цГМФ та іпрофосфат. Вона є ключовим ферментом у сигнальній системі оксиду азоту (NO), яка виконує важливу роль у регуляції фізіологічних функцій. Її продукт цГМФ бере участь у м'язовому скороченні, агрегації тромбоцитів, адгезії лейкоцитів, клітинній проліферації та міграції, нейропередачі.

Розчинні гуанілатциклази є гетеродимерними білками. Вони містять α - і β -субодиниці та простетичну групу – гем. При зв'язуванні вторинного месенджера – оксиду азоту (NO) з гемом гуанілатциклаза активується і за присутності Mg^{2+} (чи Mn^{2+}). Новосинтезований цГМФ активує цГМФ-залежні протеїнкінази. Існує 4 типи субодиниць гуанілатциклази: α_1 і β_1 знайдені в легенях, нирках і мозку, β_2 експресується в нирках і печінці, α_2 – у плаценті. Димеризація субодиниць є передумовою для утворення каталітично активного ферменту. Відомі гетеродимери α_1/β_1 , α_2/β_1 і α_1/β_2 , у яких ділянки каталітичного центру мають високий ступінь гомології. Гем у складі молекули ферменту складається з атома заліза і протопорфірину IX. В окисненому стані атом заліза має валентність +2 або +3. Ступінь окиснення визначає активний чи неактивний стан гуанілатциклази. Фермент із Fe^{3+} проявляє тільки базальну активність, як і фермент узагалі без гему, і нездатний активуватися NO.

Традиційними методами визначення активності розчинної гуанілатциклази є радіометричні методи, у яких відстежується перетворення $[^{32}P]ГТФ$ на $[^{32}P]цГМФ$ (Karczewski, 1978). Таким

методом досліджували активність також інших нуклеотидциклаз. Модифікацією радіоактивного методу є радіоімунний аналіз, який і досі використовується в наукових дослідженнях. З часом ці методи заміщувалися нерадіоактивними, такими як імуноферментний аналіз і HPLC (Pietta, 1997). У методі ELISA використовують антитіла проти цГМФ, визначення високочутливе, але тривале, вартість його висока. Метод HPLC, який базується на відокремленні ГТФ від цГМФ у зразку, є також чутливим, проте недорогим. Проте для розділення компонентів необхідно багато часу. Один аналіз може тривати декілька годин, і тому можливо проаналізувати обмежену кількість зразків. Дешевим та надійним є спектрофотометричний метод з використанням реактиву малахітовий зелений. Високоєфективним і швидким є біоломінесцентний метод, який базується на зчепленій люциферазній реакції.

Активність розчинної гуанілатциклази також можна визначити фотометричними методами за вмістом гему у складі ферменту. При визначенні слід урахувати редокс-стан заліза у складі гему. Активні фармакологічні препарати нездатні активувати розчинну гуанілатциклазу, якщо атом Fe у складі гему перебуває у тривалентному стані. Доцільно визначати активність гуанілатциклази, у якій гем міститься саме в такій формі. Були спроби знайти хімічні сполуки, спроможні активувати фермент з атомом Fe³⁺. До них належить 2-(4-(тіоморфолін-4-сульфоніл)феніл)бензамід.

6.3.2.1. Спектрофотометричний метод

Активність розчинної гуанілатциклази можна визначити за вмістом утвореного цГМФ, а також за вмістом неорганічного пірофосфату, який також є її продуктом. Гуанілатциклаза перетворює ГТФ на цГМФ і неорганічний пірофосфат (PP_n). PP_n під впливом неорганічної пірофосфатази перетворюється на неорганічний фосфат (P_n). Його вміст визначають за допомогою барвника малахітового зеленого (Sousa, 2006). Такий підхід є модифікацією методу визначення неорганічного фосфату за Фіске – Суббароу (Fiske, 1925), проте чутливіший у 30 разів. Протонована форма барвника зв'язується з аніонним фосфомолібденовим комплексом, унаслідок чого розвивається забарвлення (Cogan, 1999).

Визначення активності гуанілатциклази проводять таким чином (рис. 6.33). Реакційна суміш, крім компонентів буферного середовища, містить неорганічну пірофосфатазу, очищену розчинну гуанілатциклазу (очищений фермент або біологічний зразок). Паралельно створюють проби, які містять/не містять донор NO (нітропрурид натрію чи N,N-діетиланілін-NO). Проводять інкубацію протягом 5–20 хв і зупиняють реакцію розчином ацетату натрію, рН 4. Залежно від ступеня очищення зразка, для визначення базального рівня активності гуанілатциклази необхідна більша кількість ферменту у пробах, які не містять донора NO, порівняно з NO-активованими пробами. Далі реакційну суміш переносять у лунки мікропланшета, де визначають вміст P_n у реакції з малахітовим зеленим. Інтенсивність забарвлення оцінюють, вимірюючи оптичну густину за довжини хвилі 620 нм.

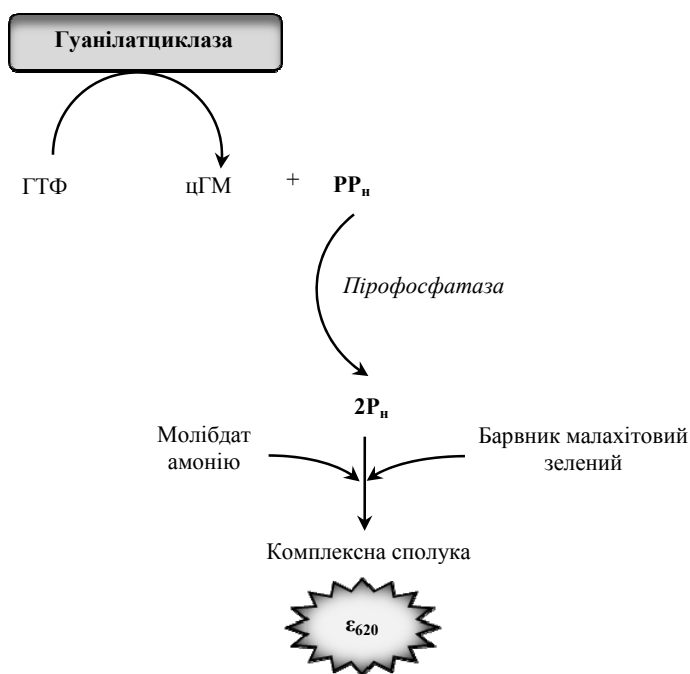


Рис. 6.33. Схема перетворення неорганічного пірофосфату на неорганічний фосфат за дії розчинної гуанілатциклази та його визначення за допомогою барвника малахітового зеленого

Будують стандартну криву за неорганічним пірофосфатом, використовуючи P_n -стандарт (розчин KH_2PO_4) у діапазоні концентрацій від 1 до 100 мМ. Змішують рівні об'єми P_n -стандарту і кольорового реагенту, інкубують у мікропланшеті протягом 60 хв і вимірюють оптичну густину.

Реакції можна проводити в мікропланшеті, що дозволяє швидко оцінити велику кількість зразків.

6.3.2.2. Люмінесцентний метод

В основі методу лежить явище біоломінесценції. Розчинна гуанілатциклаза зразка перетворює ГТФ на цГМФ, при цьому вивільнюється пірофосфат. У присутності НАД⁺ і нікотинамід-мононуклеотидаденілілтрансферази (К.Ф. 2.7.7.1) із пірофосфату синтезується АТФ, при цьому відновлюється нікотинамід-мононуклеотид. Уміст утвореного АТФ визначають біоломінесцентним методом з використанням люциферази (принцип описано в підрозд. 6.2.1.6). Цей фермент за участю АТФ перетворює люциферин на оксилуциферин, що супроводжується випромінюванням світла (рис. 6.34) Інтенсивність випромінювання світла вимірюють на люмінометорі для планшетів. Уміст АТФ пропорційний активності розчинної гуанілатциклази.

Люмінесцентний метод придатний для проведення скринінгу хімічних сполук, здатних активувати розчинну гуанілатциклазу. Його перевагою перед імунологічними, ферментативними та фотометричними методами є те, що він дозволяє протестувати велику кількість сполук за короткий проміжок часу. Він може бути автоматизованим (реакцію ініціюють, додаючи до реакційної суміші біологічний зразок, що є джерелом гуанілатциклази). Метод високопродуктивний і може бути віднесений до категорії HTS (high throughput screening). Він дозволяє визначати активність ферменту, у якому атом заліза у складі гему перебуває у тривалентному стані.

За патологічних станів, таких як рак, діабет, інфаркт міокарда, серцева недостатність, тромбози, анемія, порушення серцево-судинні та ерекції, мають місце зміни активності гуанілатциклази. Тому люмінесцентний метод може використовуватися не тільки в наукових дослідженнях, а й у діагностиці захворювань.

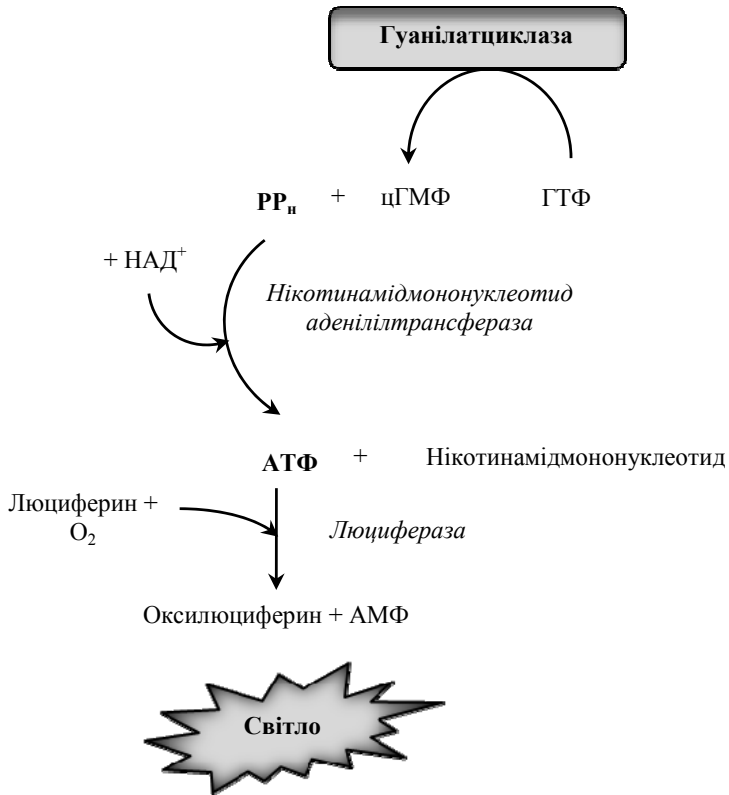


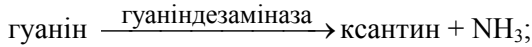
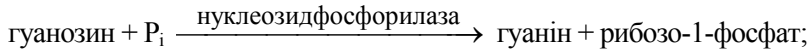
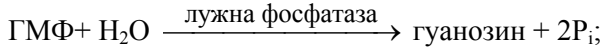
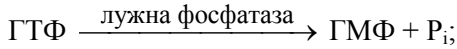
Рис. 6.34. Схема визначення активності розчинної гуанілатциклази біоломінесцентним методом

6.3.2.3. Ензиматичний флуориметричний метод

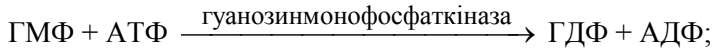
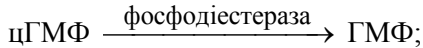
Для визначення активності вмісту цГМФ у біологічному матеріалі й, відповідно, активності гуанілатциклази було розроблено неарadioактивний метод, принцип якого аналогічний до ензиматичного флуориметричного методу для аденілатциклази. Для цього використовують також ферменти, які беруть участь у каскадних реакціях, що ініціюються цГМФ.

Процедура визначення складається з наступних етапів.

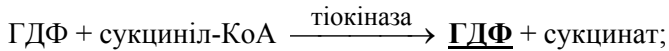
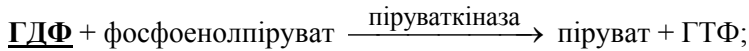
Етап 1. Реакції очищення – видалення ГТФ із біологічного зразка:



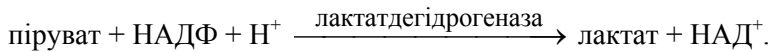
Етап 2. Реакції перетворення цГМФ на ГДФ:



Етап 3. Циклічні реакції:



Етап 4. Реакції детекції:



Під час першого етапу, який називають реакціями очищення, видаляють ГТФ зі зразка, оскільки він за структурою має схожість із цГМФ і може бути причиною похибок при визначенні. Для видалення ГТФ його послідовно розщеплюють на ГДФ, ГМФ, а потім – на гуанозин і гуанін, який дезамінують до ксантину. На другому етапі утворений під впливом гуанілатциклази цГМФ розщеплюють до ГМФ за дії фосфодіестерази, після чого фосфорилують до ГДФ. Третій етап включає в себе циклічні реакції ампліфікації ГДФ, під час яких утворюється піруват. Він на четвертому етапі відновлюється до лактату, донором протонів є НАДФН. Вимірюючи вміст окисненого НАДФ⁺, проводять детекцію сигналу, за цим показником судять про вміст цГМФ і про активність гуанілатциклази.

6.3.3. Визначення активності цГМФ-специфічної фосфодіестерази

Фосфодіестераза цГМФ є ферментом, що належить до родини фосфодіестераз циклічних нуклеотидів. Методи визначення активності цих ферментів було докладно описано в підрозд. 6.2.3. Більшість методів вивчення активності фосфодіестерази цАМФ придатні й для фосфодіестерази ГМФ. Серед них поширені радіометричні методи SPA, FlashPlate, біоломінесцентний метод PDE-Glo™, флуоресцентно-резонансний метод HTRF тощо. Високу ефективність має також метод AlphaScreen.

Визначення активності цГМФ-специфічної фосфодіестерази методом AlphaScreen проводять аналогічно до визначення вмісту цГМФ (див. підрозд. 6.3.1.5). Воно базується на зв'язуванні біотинільованого цГМФ-мітки із стрептавідином, який іммобілізовано на донорних гранулах. На акцепторних гранулах, кон'югованих з протеїном А, іммобілізовано специфічні анти-цГМФ антитіла (рис. 6.35). Біотинільований цГМФ-мітка з високою афінністю зв'язується з цими антитілами, донорні й акцепторні гранули опиняються в безпосередній близькості. При збудженні їх світлом, довжина хвилі якого становить 680 нм, генерується сигнал AlphaScreen – випромінюється світло за довжини хвилі 520–620 нм.

Якщо цГМФ присутній у біологічному зразку, він конкурує з цГМФ, міченим біотином, за зв'язування з анти-цГМФ антитілами, зв'язаними з донорними гранулами. У результаті донорні та акцепторні гранули не взаємодіють, і інтенсивність сигналу (випромінювання світла) зменшується. Інтенсивність сигналу обернено пропорційна концентрації цГМФ у зразку.

Фосфодіестераза розщеплює цГМФ на 5'-ГМФ, він не впізнається анти-цГМФ антитілами, тому не конкурує з біотинільованим цГМФ-міткою. У цьому випадку інтенсивність сигналу AlphaScreen збільшується, що прямо пропорційно активності фосфодіестерази. За допомогою методу AlphaScreen можна визначати також активність цГМФ-специфічної фосфодіестерази та гуанілатциклази.

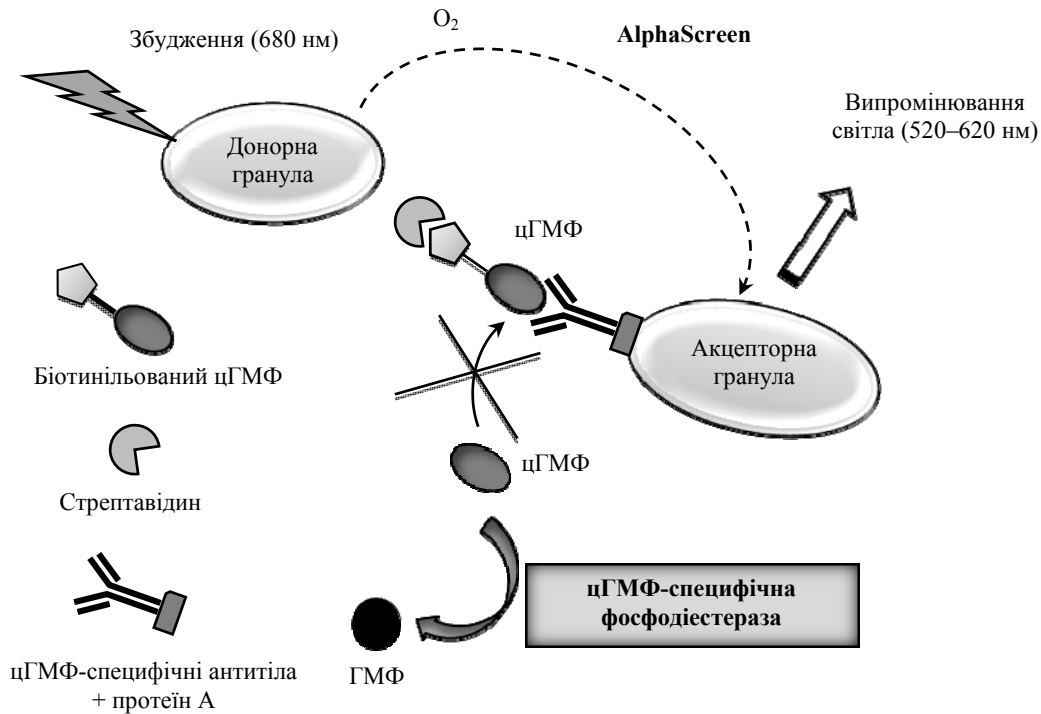


Рис. 6.35. Принцип визначення цГМФ-специфічної фосфодіестерази методом AlphaScreen

6.3.4. Визначення цГМФ-залежної протеїнкінази

цГМФ-залежна протеїнкіназа (протеїнкіназа G) – серин/треонін специфічна протеїнкіназа, яка активується цГМФ. Вона фосфорилує цілий ряд біологічно важливих білків-мішеней, залучених до регуляції розслаблення гладеньких м'язів, функціонування тромбоцитів, клітинного поділу, синтезу нуклеїнових кислот, сперматогенезу тощо.

Активність протеїнкінази G визначають методами, аналогічними до методів визначення протеїнкінази A (див. підрозд. 6.2.4), тому тут вони не описані. Одним із найперших методів був радіометричний з використанням міченого [$\gamma^{32}\text{P}$]-АТФ. Сьогодні поширені нерадіоактивні методи, це, зокрема, методи ELISA, електрофоретичний метод PerTag®, біоломінесцентний метод ADP-Glo™, флуоресцентно-резонансний метод HTRF KinEASE™ (аналогічний до відповідного методу визначення активності тирозинкінази, див. підрозд. 6.5.1.4).

Цим методом визначають вміст протеїнкінази G у сироватці й плазмі крові та тканинних гомогенатах. Він базується на кількісному "сендвіч"-ІФА (принцип викладено в підрозд. 6.1.2). На лунках мікропланшета іммобілізовано антитіла, специфічні до протеїнкінази G (рис. 6.36). До лунок додають біологічний зразок або стандарт. Фермент у складі зразка або фермент-стандарт тест-системи зв'язується із цими антитілами.

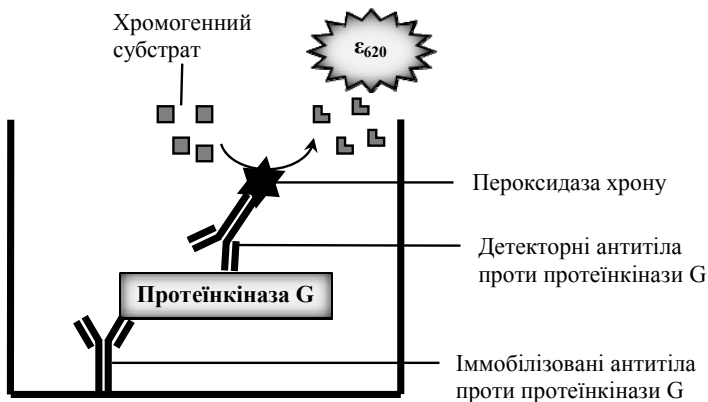


Рис. 6.36. Схема визначення вмісту протеїнкінази G методом ELISA

Після видалення незв'язаних білків шляхом відмивання у лунки вносять антитіла проти протеїнкінази G, кон'юговані з біотином. Відмивають та додають пероксидазу хрому, кон'юговану з авідином. Знову відмивають для видалення ферменту, що не зв'язався, і додають розчин хромогенного субстрату. Зупиняють реакцію і вимірюють оптичну густина.

6.4. ВИВЧЕННЯ ІНОЗИТОЛФОСФАТНОЇ СИГНАЛЬНОЇ СИСТЕМИ

6.4.1. Визначення активності фосфоліпази C

Фосфоліпази C є класом ферментів, які каталізують розщеплення фосфоліпідів між фосфатним залишком та ОН-групою гліцеролу. Фосфоліпаза C, локалізована у плазматичній мембрані, є ключовим ферментом інозитолфосфатної сигнальної системи. Вона гідролізує фосфатидилінозитол на діацилгліцерол та інозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃), які є вторинними посередниками й активують кальцієві канали ендоплазматичного ретикулума та протеїнкіназу C відповідно. Фосфоліпаза C виконує важливу роль у багатьох процесах сигнальної трансдукції, залучених до апоптозу, виживання клітин, патогенезу різних захворювань – від раку до ВІЛ-інфекції.

На початку вивчення фосфоліпази C визначати швидкість утворення її продуктів було проблематично, оскільки для цього були потрібні радіоактивно мічені субстрати. Продукти реакції відокремлювали за допомогою екстракції в органічній фазі, після чого їх кількість вимірювали радіометрично. У новіших модифікаціях радіоактивного методу використовували мічений [³H]-фосфоінозитидний субстрат, іммобілізований на поверхні, здатний до сцинтиляції. Це дозволило визначити активність фосфоліпази C у гомогенному форматі, провівши ферментативний гідроліз субстрату в безпосередній близькості до сцинтилюючої сполуки. Тепер широко застосовуються нерадіоактивні методи визначення активності фосфоліпази C: ферментативний колориметричний і флуориметричний підходи та метод ELISA.

6.4.1.1. Метод FlashPlate

У методі фосфоліпідного FlashPlate використовується нова технологія, яка дозволяє приєднувати за допомогою гідрофобних взаємодій ліпідні субстрати до поверхні планшета. Завдяки цьому можна вимірювати активність мембранозв'язаної фосфоліпази С, уникаючи органічної екстракції. Метод було мініатюризовано, тобто визначення проводять у малих об'ємах, для чого використовують мікропланшети на 384 лунки. Метод FlashPlate є гомогенним, не потребує довготривалих процедур для екстракції, відокремлення продуктів та відмивання, тому він придатний для високопродуктивного скринінгу (HTS).

Як субстрат для фосфоліпази С використовують радіоактивно мічений $[^3\text{H}]\text{PIP}_2$, його за допомогою гідрофобних взаємодій іммобілізують на поверхні планшета FlashPlate, укритій сполукою, здатною до сцинтиляції (тверда фаза). Оскільки сцинтилююча сполука (сцинтилянт) міститься у безпосередній близькості до міченого атома $[^3\text{H}]$ у складі продукту гідролізу $[^3\text{H}]\text{PIP}_2$, відбувається випромінювання світла, що фіксують за допомогою сцинтиляційного лічильника для мікропланшетів (рис. 6.37).

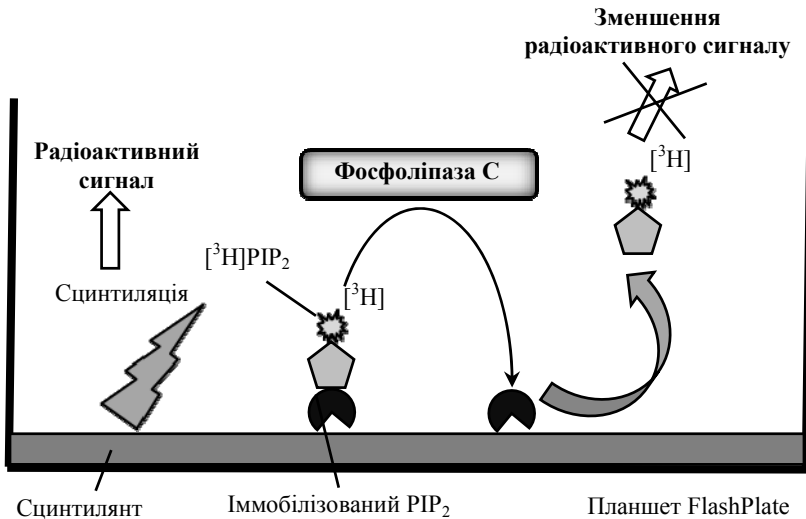


Рис. 6.37. Схема визначення активності фосфоліпази С методом FlashPlate

Зв'язана радіоактивність у такій системі збільшується з часом інкубації міченого субстрату в лунках мікропланшета. Це відповідає ступеню включення субстрату у тверду фазу. Також радіоактивність (срт/лунку) пропорційна концентрації $[^3\text{H}]\text{PIP}_2$ в межах до 3 мкКю/мл. Тому, коли фосфоліпаза С зразка гідролізує зв'язаний на поверхні субстрат $[^3\text{H}]\text{PIP}_2$, радіоактивність зменшується, за її зміною судять про ступінь гідролізу субстрату, а отже, і про активність цього ферменту.

6.4.1.2. Ферментативний колориметричний і флуориметричний методи

У цьому методі фосфоліпаза С ініціює каскад реакцій, кінцевим продуктом яких є пероксид водню. Як субстрат використовують фосфоліпід лецитин (фосфатидилхолін), який розщеплюється на діацилгліцерол і фосфохолін.

Фосфатидилхолін + H_2O $\xrightarrow{\text{фосфоліпаза С}}$ діацилгліцерол + холінфосфат

Холін-фосфат + H_2O $\xrightarrow{\text{лужна фосфатаза}}$ холін + P_n

Холін + O_2 $\xrightarrow{\text{холіноксидаза}}$ бетаінальдегід + H_2O_2

H_2O_2 + фенол + 4-аміноантипирин $\xrightarrow{\text{пероксидаза}}$ 4 H_2O + червоний барвник

Вміст пероксиду водню фіксують за допомогою підходу, аналогічного до того що застосовується в методі ELISA. У присутності ферменту (пероксидази хрону) і барвника (хромогенного субстрату) утворюється забарвлена сполука, кількість якої визначають колориметрично, вимірюючи оптичну густину на спектрофотометрі для планшетів. Якщо застосовують флуоресцентну мітку, вимірюють інтенсивність флуоресценції на флуориметрі для мікропланшетів. Таким барвником може бути 4-аміноантипирин (англ., 4-aminoantipyrine) (4-аміно-2,3-диметил-1-феніл-3-піразолін-5-он), який використовують для колориметричного визначення пероксиду водню та фенолів (рис. 6.38). При його окисненні утворюється червона сполука, кількість якої визначають колориметрично.

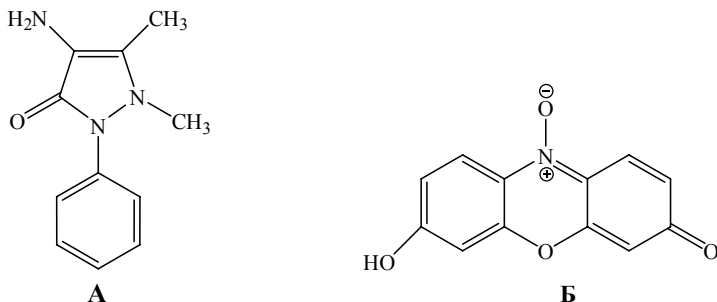


Рис. 6.38. Структура 4-аміноантипірину (А) та резазурину (Б)

Для визначення кількості утвореного пероксиду водню використовують і резазурін (7-гідрокси-3Н-феноксазин-3-он 10-оксид) (англ., resazurin) – блакитний барвник, окисно-відновний індикатор. При відновленні він перетворюється на рожевий резорурфін, здатний до потужної флуоресценції. Вміст резорурфіну в розчині можна визначити за флуоресценцією (вимірюючи інтенсивність за довжини хвилі збудження / інтенсивність за довжини хвилі випромінювання) або колориметрично (вимірюючи поглинання). Стандартна крива являє собою залежність інтенсивності флуоресценції від концентрації фосфоліпази С.

6.4.2. Вивчення флуктуацій внутрішньоклітинного кальцію (Ca^{2+})

Внутрішньоклітинний кальцій відіграє важливу роль у регуляції фізіологічних функцій. Він є вторинним посередником у інозитолфосфатній сигнальній системі й вивільнюється з ЕПР при надходженні продукту розщеплення фосфатиділінозитолфосфату – інозитолтрифосфату. Велика кількість клітинних процесів регулюється змінами концентрації внутрішньоклітинного кальцію, у першу чергу – функціонування рецепторів та іонних каналів. Кальцій опосередковує процеси скорочення й розслаблення кровоносних судин, передачі нервового імпульсу, м'язового скорочення, секреції гормонів. Кальцієві іонні канали контролюють вивільнення іонів Ca^{2+} через клітинну мембрану, регулюючи активацію та інгібування багатьох ферментів. Під-

вищений рівень кальцію у сироватці крові спостерігається при гіперпаратиреозі, метастазах у кістки, гіпервітамінозі. Зниження рівня кальцію супроводжує хронічні порушення нирок, дефіцит вітаміну D, рахіт, стеаторею та ін.

Методи визначення концентрації внутрішньоклітинного кальцію широко використовуються для дослідження багатьох біологічних процесів. Вивчення процесів сигналізації за участю кальцію проводиться при дослідженні функціонування рецепторів, зв'язаних з G-білками (GPCR). Сьогодні актуальним є пошук препаратів, які б впливали на мобілізацію кальцію, опосередковану GPCR. Визначення рівня кальцію також проводиться у складі комплексної діагностики цілого ряду захворювань.

6.4.2.1. Колориметричні методи

На сьогодні розроблено цілий ряд методів прямого колориметричного визначення концентрації кальцію в біологічних зразках. Хоч їх і не застосовують для визначення концентрації саме внутрішньоклітинного кальцію, вони, однак, придатні для його визначення в сироватці крові, сечі та слині. Ці методи широко застосовують у діагностиці захворювань, пов'язаних із порушеннями трансдукції сигналу за участю внутрішньоклітинного кальцію, а також використовують при пошуку нових фармакологічних препаратів. Тому їх описано в цьому підрозділі.

У методі **ScienCell™** використовується реагент орто-крезол-фталейнін, який у лужному середовищі утворює з кальцієм пурпурно-червоний комплекс. Після інкубації вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 570 нм. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації кальцію у фізіологічному діапазоні (0,3–20 мМ). Стандартну криву будують, беручи різні концентрації кальцію-стандарту, проводячи з ними всі вказані вище операції та вимірюючи ϵ_{570} . Умови визначення оптимізовано таким чином, щоб уникнути реакції з іонами магнію та сприяти вивільненню кальцію, зв'язаного з білками.

Метод **QuantiChrom** дозволяє визначати кальцій у біологічних зразках без попередньої обробки. Він простий у виконанні, реакції проводять у мікропланшеті, усі процедури можуть бути автоматизованими. Барвник фенолсульфонфталейн утворює ду-

же стабільний блакитний комплекс із вільним кальцієм. Інтенсивність забарвлення, яку вимірюють за довжини хвилі 612 нм, прямо пропорційна концентрації кальцію у зразку. Умови оптимізовано таким чином, щоб уникнути інтерференції з магнієм, ліпідами, білками та білірубіном у крові. Стандартна крива являє собою залежність оптичної густини від концентрації кальцію, її будують, використовуючи стандартний розчин кальцію.

6.4.2.2. Флуоресцентні методи

Для визначення концентрації кальцію широко застосовують флуоресцентні барвники (індикатори). Механізм їхньої дії було описано в розд. 1.6). Ці флуоресцентні барвники випромінюють світло у видимому діапазоні довжин хвиль, мають високу чутливість. При зв'язуванні з Ca^{2+} їхня флуоресценція значно посилюється.

Кальцієвими індикаторами користуються для вивчення різноманітних процесів, пов'язаних зі змінами концентрації внутрішньоклітинного кальцію, для вивчення надходження кальцію у клітину та його вивільнення, а також для візуалізації флуктуацій кальцію у живих клітинах. Вони ефективні для вивчення сигналізації за участю кальцію у живих клітинах, стимульованих агоністами GPCRs, а також для вивчення функціонування іонних каналів.

Ці індикатори дозволяють проводити дослідження у гомогенному форматі (без відмивань, кількість етапів невелика, усі операції виконуються в межах однієї лунки мікропланшета). Методи можуть бути автоматизованими і мають високу продуктивність. Клітини навантажують індикатором, флуоресцентний сигнал вимірюють методами флуоресцентної мікроскопії, аналізу флуоресценції у планшетах та проточної цитофлуориметрії.

Широковживаним є Fura-2, з використанням якого розроблено цілий ряд тест-систем вимірювання мобілізації кальцію. Сьогодні створено нові тест-системи на базі цього барвника, які дозволяють проводити гомогенне визначення (без відмивання), мінімізують шкідливий вплив на клітини навантаження барвником.

З використанням Fura-2 у 1999 р. було розроблено методи **FLIPR®** і **FlexStation Systems**, спрямовані на вивчення мобілізації кальцію, опосередкованої GPCR.

Метод FLIPR базується на технології, що використовує екрануючий барвник (masking dye). Така технологія значно зменшує фонову флуоресценцію, збільшує співвідношення сигнал : "шум" і дозволяє проводити визначення без відмивання клітин. Було створено декілька тест-систем для визначення кальцію методом FLIPR. Перша з них – FLIPR Calcium Assay Kit – дозволила проводити визначення у гомогенному форматі (без відмивань) і використовувала чутливий до кальцію флуорофор. Вона базувалася на патентованій технології гасіння флуоресценції. З її допомогою досліджували потужні зміни концентрації кальцію, як, наприклад, при активації M1 мускаринових холінорецепторів за дії агоністів.

Fluo-4 Direct™ є поліпшеним флуоресцентним кальцієвим індикатором, який до також дозволяє позбутися фонові флуоресценції. На відміну від багатьох інших флуоресцентних барвників, його можна додавати безпосередньо в лунки з клітинами, що ростуть у культуральному середовищі, причому його не потрібно видаляти і немає необхідності відмивати клітини. Завдяки цьому отримані результати більш точні, а процедура визначення – більш простою і швидкою. Базальна флуоресценція культурального середовища елімінується за допомогою пригнічувального барвника, який пригнічує фонову флуоресценцію. При використанні флуоресцентних індикаторів може виникати флуоресценція навколо клітин, спричинена виходом цих сполук із клітин за допомогою транспортерів органічних аніонів. Для його пригнічення використовують синтетичну сірковмісну сполуку пробенецид (англ., probenecid, pro(pyl) + + ben(zoic) + -e- + (a)cid), яка сприяє вивільненню сечової кислоти і використовувалася раніше для лікування початкових стадій подагри. Її водорозчинна форма входить до наборів для визначення кальцію за допомогою Fluo-4 (наприклад, Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kits). Вона інгібує транспорт кальцію крізь клітинну мембрану і тому зменшує базальну флуоресценцію. Методи адаптовано для мікропланшетів. Вони належать до категорії HTS-методів (high-throughput screening), оскільки дозволяють з високою продуктивністю, швидкістю й точністю оцінити велику кількість біологічних зразків.

Визначення проводять таким чином. Спочатку навантажують клітини флуоресцентним індикатором: до лунок культуральних мікропланшетів, що містять клітини і культуральне середовище, додають навантажувальний розчин, що містить Fluo-4. Інкують клітини за температури 37 °С протягом 30–60 хв. Вимірюють флуоресценцію на флуориметрі мікропланшетів за довжини хвилі збудження 494 нм і випромінювання 516 нм. Коли клітини стимулюють агоністами GPCR, сигнал від них передається за участю кальцію – він вивільнюється з внутрішньоклітинних депо, зв'язується з Fluo-8, і його флуоресценція значно зростає (у понад 100 разів).

Створено новий індикатор **Fluo-8** (рис. 6.39), який також використовується вивчення мобілізації внутрішньоклітинного кальцію гомогенним флуоресцентним методом. З його допомогою досліджують клітини, що експресують GPCR, передача сигналу від яких здійснюється за допомогою кальцію. Клітини навантажують Fluo-8, який проходить всередину крізь клітинну мембрану. У цитоплазмі ліпофільні блокуючі групи Fluo-8 розщеплюються естеразою, він набуває негативного заряду і залишається всередині клітини. При зв'язуванні з кальцієм його флуоресценція значно зростає. Метод має високу чутливість, адаптований для мікропланшетів і може бути автоматизований.

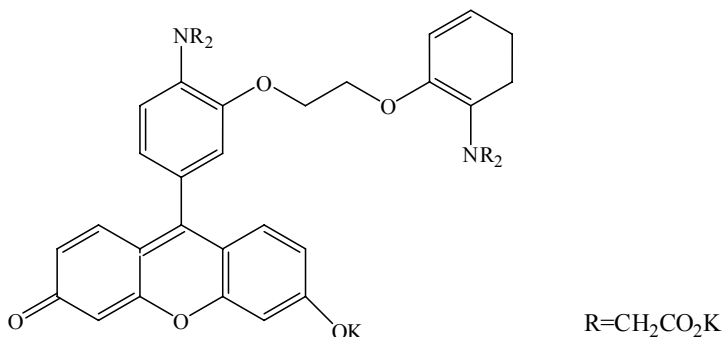


Рис. 6.39. Структурна формула Fluo-8

Індикатор **Calcium-Green** має співвідношення довжин хвиль збудження та поглинання 506/531 нм, при зв'язуванні з Ca²⁺ інтенсивність флуоресценції збільшується у 14 разів, причому величина зсуву довжини хвилі незначна (рис. 6.40).

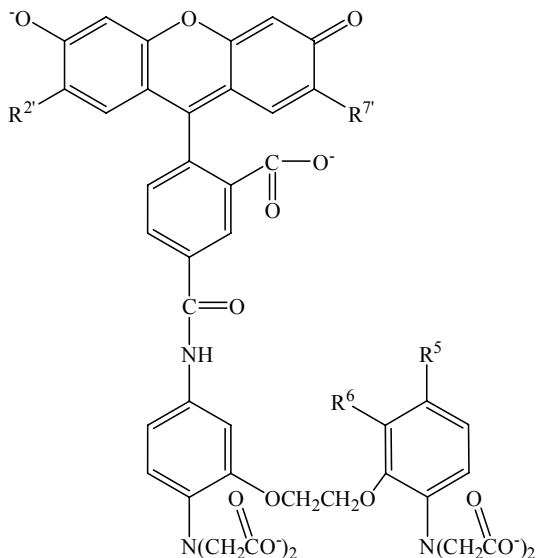


Рис. 6.40. Структурна формула Calcium-Green

Розроблено також індикатори **Calcium Green**, **Calcium Yellow**, **Calcium Orange** та **Calcium Crimson**, флуоресценція яких збільшується при зв'язуванні з кальцієм, проте зсув довжин хвиль також невеликий. Клітини навантажують ними у вигляді АМ-ефірів (англ., АМ – acetoxymethyl). Сполуки Calcium Orange та Calcium Crimson є більш фотостабільними порівняно з fluo-3 та Calcium Green.

Кальцеїн (англ., Calcein) є флуоресцентним індикатором Zn^{2+} та інших іонів металів (рис. 6.41). Він використовується як порівняно низькоафінний хелатор Ca^{2+} . Константа дисоціації комплексів Ca^{2+} і Mg^{2+} з кальцеїном за фізіологічних рН знаходиться в межах від 10^{-3} ... 10^{-4} М. Оскільки кальцеїн є похідною імінодіоцтової кислоти (англ., iminodiacetic acid), він афінний до іонів металів, причому ця афінність значно підвищується за високих значень рН (хоча при рН 12 він не флуоресцює).

Тому для визначення концентрації Ca^{2+} і Mg^{2+} усередині клітини його використовувати недоцільно. За допомогою кальцеїну вимірюють кальцій у сироватці крові та вивчають зв'язування Ca^{2+} із саркоплазматичним ретикулумом. Найчастіше кальцеїн використовують для детекції Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} та Fe^{3+} і Zn^{2+} .

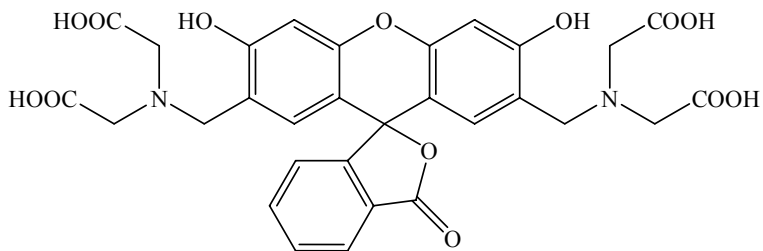


Рис. 6.41. Структурна формула кальцеїну

6.4.2.3. Методи AequoScreen та AequoZen™ frozen cells

Недоліком використання флуоресцентних індикаторів для визначення внутрішньоклітинного кальцію є те, що зміни його концентрації є дуже короткочасними, і для фіксації цих змін слід використовувати спеціальне обладнання, зокрема "інжектори", які швидко вводять зонд у лунки мікропланшетів.

Альтернатива флуоресцентним індикаторам – біосенсорні фотобілки, прикладом яких є екворин (англ., aequorin). Це люмінесцентний білок, виділений із медузи еквореї (*Aequorea victoria*), уперше отриманий у 1961–1962 рр. У присутності іонів кальцію екворин здатний до люмінесценції. Тому у відповідь на зростання концентрації внутрішньоклітинного кальцію білок екворин забезпечує потужний люмінесцентний сигнал. Технологія **AequoScreen** є альтернативною методу FLIPR, у якому використовуються флуоресцентні індикатори. Вона базується на використанні білка екворину і спрямована на вивчення змін концентрації кальцію у відповідь на активацію рецепторів, зв'язаних з білками G_q , G_s та G_i . Локалізований у мітохондріях живих клітин Ca^{2+} -активований фотобілок екворин посилює індуквану GPCRs (G_q), а саме клітинну відповідь за участю фосфатидилінозитольної сигнальної системи, що виявляється у посиленні люмінесценції.

Екворин складається з білкової частини (апопротеїну апоекворину) і простетичної групи целентеразину (англ. coelenterazine). Апоекворин є білком масою 21 kDa, який для активації потребує гідрофобну простетичну групу целентеразину. Цей фермент має три кальційзв'язувальні центри, які контролюють його актив-

ність. При зв'язуванні з Ca^{2+} екворин окиснює целентеразин до целентераміду (coelenteramide) з утворенням CO_2 , при цьому випромінюється світло (рис. 6.42). Зменшення рівня екворину пропорційно концентрації кальцію у фізіологічному діапазоні (від 50 нМ до 50 мкМ). Тому вимірювання інтенсивності світла, що випромінюється при окисненні целентеразину, є основою для визначення змін концентрації внутрішньоклітинного кальцію. Результати, отримані таким методом, зіставні з даними, отриманими за допомогою флуоресцентних індикаторів.

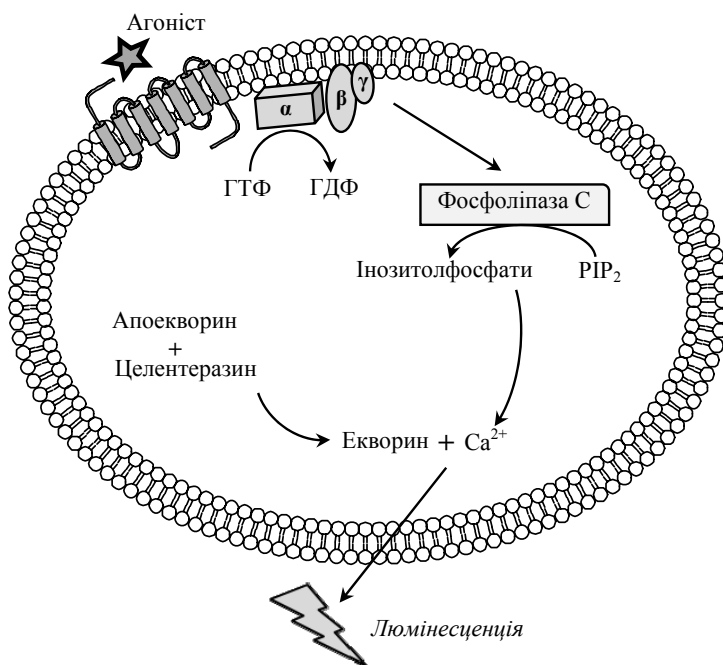


Рис. 6.42. Схема визначення концентрації внутрішньоклітинного кальцію AequoScreen за допомогою білка екворин

Було створено рекомбінантні клітинні лінії, які одночасно експресують білок екворин та GPCR. Їх використовують для дослідження активації цих рецепторів агоністами: при стимуляції GPCR випромінюється світло, його інтенсивність можна ви-

міряти. Система є ефективною, коли екворин синтезується у мітохондріях, на відміну від цитоплазми. Батьківські клітинні лінії, які стабільно експресували екворин, було отримано шляхом трансфекції клітин дикого типу СНО-К1 біцистронною плазмідною, що містила послідовність мітохондріально спрямованого екворину. Також ці клітини було трансфекровано плазмідною, яка містила послідовність досліджуваного GPCR. У результаті було отримано клітинні лінії AequoScreen.

Існують також системи **AequoZen™ frozen cells**, які містять опромінені γ -променями (для припинення росту) заморожені клітини, трансфектовані плазмідною, що експресує білок апоекворин, під контролем CMV промотору та GPCR.

Системи AequoScreen містять живі клітинні лінії, що експресують рецептори, пов'язані з G_q -білками – гістаміновий H1 або мускариновий M5 рецептори людини. Перший бере участь в алергічних реакціях, другий опосередковує метаботропний ефект нейромедіатору ацетилхоліну. Ці рецептори діють через утворення вторинних посередників інозитолтрифосфату та діацилгліцеролу і є рецепторами класу $Gq/11$. Гістаміновий H1 рецептор зумовлює потужні зміни концентрації кальцію, тоді як мускариновий M5 рецептор – більш слабкі. Тест-системи містять також агоністи й антагоністи вказаних рецепторів. Для гістамінових рецепторів – це гідрохлорид гістаміну та піриламін малеат відповідно, а для мускаринових – відповідно гідрохлорид ацетилхоліну та скополамін метилбромід.

Завдяки застосуванню фотобілків технологія AequoScreen має надзвичайну чутливість, високе співвідношення сигнал-"шум" та дає змогу визначати концентрацію кальцію в певних субклітинних ділянках. Виконання процедур є більш простим і швидким, а вартість меншою порівняно з флуоресцентними індикаторами. Тому AequoScreen дозволяє проводити різноспрямований скринінг препаратів – лігандів GPCR (агоністів, антагоністів та алостеричних модуляторів), а також проводити дослідження іонних каналів.

Крім технології AequoScreen, послуговуються також і люмінесцентною технологією **PhotoScreen** (Photina®), спрямованою на вивчення кінетики змін внутрішньоклітинного кальцію. У ній

теж використовують фотобілки, але отримані вони з іншого джерела – медузи *Obelia longissima*. Целентеразин, як і у випадку екворину, при зв'язуванні з кальцієм окиснюється до целентераміду, що супроводжується продукцією CO₂ і люмінесценцією. Білок PhotoScreen є химерним фотобілком, що складається з обеліну та клитіну (clutyn). Його застосовують для визначення змін концентрації кальцію, індукованих рецепторами, зв'язаними з Gq-, Gs- і Gi-білками, а також змін, спричинених роботою кальцієвих каналів та транспортерів.

6.4.3. Визначення кальмодуліну

Кальмодулін (CaM) є найбільш розповсюдженим кальційзв'язувальним білком, який відповідає на зміни концентрації внутрішньоклітинного кальцію. Він містить домен "EF"-рука, який з високою специфічністю зв'язує іони. Комплекс Ca²⁺/CaM взаємодіє з великою кількістю білків, включаючи серин/треонін-протеїнкінази, модулюючи тим самим їхню активність.

Традиційним методом визначення вмісту кальмодуліну є радіоімунний аналіз, у якому використовують антитіла проти кальмодуліну та мічений ²⁵¹I аналог цього білка. Також для визначення вмісту кальмодуліну використовують нерадіоактивний метод Cell-Based ELISA, який, крім того, дає можливість вимірювати цей білок не тільки у клітинних екстрактах, а й у цілих клітинах. Біологічну активність кальмодуліну визначають за його здатністю активувати фермент фосфодіестеразу.

6.4.3.1. Радіоімунний аналіз

Визначення кальмодуліну методом радіоімунного аналізу (RIA) ґрунтується на конкуренції між радіоактивно міченим ²⁵¹I-кальмодуліном і неміченим кальмодуліном біологічного зразка за зв'язування з моноклональними антитілами, специфічними до кальмодуліну. Принцип методу RIA було викладено в підрозд. 6.1.3. Спочатку проводять реакцію зв'язування антитіл з міченим ²⁵¹I-кальмодуліном. Після цього вносять зразок, у присутності в ньому кальмодуліну він витісняє мічений аналог, зв'язу-

ючись з антитілами. Це приводить до зменшення радіоактивності, що обернено пропорційно концентрації кальмодуліну у зразку. Стандартну криву для визначення вмісту кальмодуліну будують, використовуючи очищений білок у різних концентраціях, з яким проводять усі вказані вище реакції. У результаті отримують залежність радіоактивності від концентрації кальмодуліну у зразку.

6.4.3.2. Метод ELISA

Новою ефективною модифікацією методу імуоферментного аналізу є методи Cell-Based ELISA, придатні для визначення різноманітних білків-мішеней не у клітинних лізатах, а в цілих клітинах. Вони також дозволяють вивчати вплив різних стимулів на профіль експресії цих білків. Для цього використовується непрямий ELISA (принцип викладено в підрозд. 6.1.2).

Визначення кальмодуліну за допомогою Cell-Based ELISA є зручним, чутливим і високопродуктивним методом, який не потребує етапу отримання клітинних лізатів (рис. 6.43). З його допомогою оцінюють профіль експресії кальмодуліну в культурах клітин, а також вивчають вплив на нього різних лігандів, наприклад інгібіторів транскрипції (хімічних сполук або siРНК) та активаторів.

У лунки планшета висівають клітини (30 000 на лунку), інкубують, після чого обробляють активаторами або інгібіторами (залежно від мети експерименту). Видаляють поживне середовище й фіксують клітини за допомогою 4% формальдегіду, після чого відмивають. До клітин додають кролячі поліклональні антитіла, специфічні до кальмодуліну (первинні антитіла), або анти-GAPDH антитіла. Якщо кальмодулін зв'язується зі специфічними первинними антитілами, то з їхніми Fc-ділянками зв'язуються вторинні (антивидові) антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому. При додаванні хромогенного субстрату ТМВ розвивається забарвлення. Реакцію зупиняють і вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 450 нм. Паралельно визначають щільність клітин, використовуючи метод фарбування клітин за допомогою барвника Crystal Violet.

Як позитивний контроль використовують мишині моноклональні анти-GAPDH антитіла (англ., glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, укр., гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа). Вони необхідні для зіставлення отриманих даних оптичної густини зі значеннями кількості клітин у лунці.

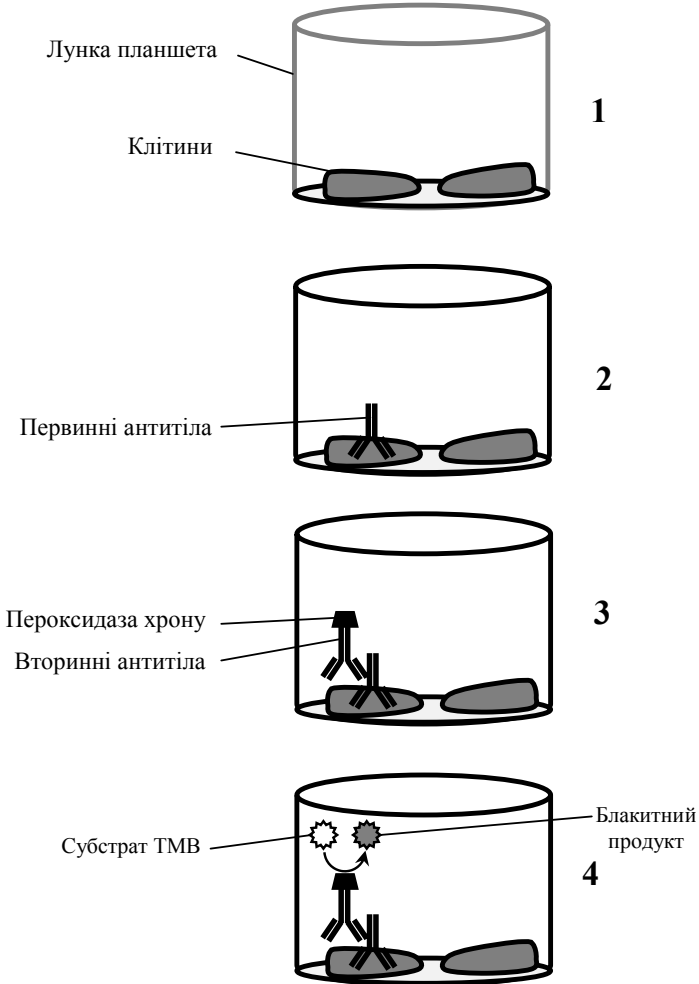


Рис. 6.43. Схема визначення кальмодуліну методом Cell-Based ELISA (пояснення в тексті)

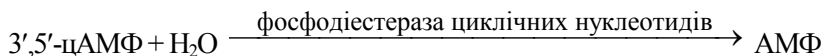
Негативним контролем є антикролячі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрону.

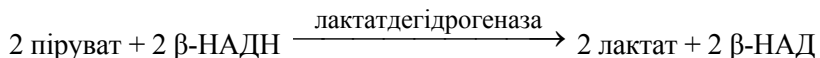
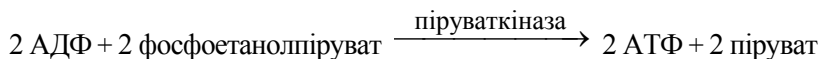
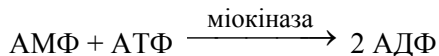
Клітини висівають на дно кожної лунки, фіксують, після чого блокують лунки (рис. 6.43, 1). Додають первинні антитіла, специфічні до білка, що визначають (рис. 6.43, 2). Додають вторинні антитіла, специфічні до первинних антитіл і кон'юговані з пероксидазою хрону (рис. 6.43, 3). Пероксидаза хрону перетворює субстрат ТМВ на блакитний дііміновий продукт, реакцію зупиняють додаванням сірчаної кислоти й вимірюють поглинання за довжини хвилі 450 нм (рис. 6.43, 4).

6.4.3.3. Метод визначення біологічної активності кальмодуліну

Біологічну активність кальмодуліну можна оцінити за його здатністю активувати фосфодіестеразу (методи визначення її активності наведено в підрозд. 6.2.3) (Хіао, 2005). Для цього проводять визначення активності ферменту за присутності у зразку очищеного кальмодуліну (MacNeil, 1982). Фосфодіестераза перетворює цАМФ на АМФ із вивільнення неорганічного фосфату. Вміст останнього вимірюють спектрофотометрично (за довжини хвилі 650 нм) після реакції з малахітовим зеленим. Для цього проводять визначення активності ферменту за присутності у зразку очищеного кальмодуліну або тотального клітинного білка. Зразок преінкубують з фосфодіестеразою та лужною фосфатазою в середовище без Ca^{2+} . Додають цАМФ та інкубують за температури 30 °С. Далі проводять реакцію з молібденовим реагентом і малахітовим зеленим і вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 650 нм. Активність кальмодуліну визначають за стандартною кривою, яку отримують з використанням різних концентрацій очищеного активованого кальмодуліну.

Інший метод визначення активності фосфодіестерази, яка активується кальмодуліном, полягає у здійсненні каскадних ферментативних реакцій:





Результат отримують, вимірюючи оптичну густину за довжини хвилі 340 нм, що відповідає поглинанню відновленого НАД. Зменшення ϵ_{340} є пропорційним активності фосфодіестерази, і, відповідно, біологічній активності кальмодуліну.

6.4.4. Визначення активності

Ca²⁺/кальмодулінзалежної протеїнкінази

Ca²⁺/кальмодулінзалежна протеїнкіназа II (CaM-кіназа II) є загальнорозповсюдженою протеїнкіназою, яка бере участь у проведенні сигналу від Ca²⁺ до численних білків-мішеней, зокрема іонних каналів та активаторів транскрипції. Вона має унікальну структуру холоферменту, здатна до ауторегуляції, що дозволяє їй забезпечувати пролонговану відповідь на короткочасові зміни (осциляції) концентрації внутрішньоклітинного кальцію. Фермент має широку субстратну специфічність, тому залучений до регуляції багатьох клітинних функцій.

У нейронах CaM-кіназа II опосередковує проведення сигналу за участю кальцію, під час активації вона транслокується у синаптичні ділянки і фосфорилує білки, залучені до нейропередачі. Вона регулює синтез і вивільнення нейромедіаторів, діяльність іонних каналів, експресію генів, ріст нервів, синаптичну пластичність тощо.

Для визначення активності CaM-кінази традиційним є радіоактивний метод. CaM-кіназу інкубують із субстратом – природним або синтетичним поліпептидом (наприклад, Syntide-2) у присутності Mg²⁺ та ³²P-міченого АТР. Відмивають для видалення нез'язаної радіоактивної мітки й зупиняють реакцію нанесенням реакційної суміші на диски із фосфоцелюлозних паперових філь-

трів. Потім за допомогою сцинтиляційного лічильника вимірюють радіоактивність мітки, котра зв'язалася з фільтрами.

Модифікацією радіоактивного методу є SignaTECT®, який має більшу чутливість і специфічність завдяки застосуванню стрептавідинової мембрани, з якою зв'язується біотинільований субстрат СаМ-кінази. Проте здебільшого застосовують нерадіоактивні методи імуноферментного аналізу.

6.4.4.1. Метод SignaTECT®

У цьому методі використовується радіоактивно мічений субстрат СаМ-кінази – $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ та біотинільований специфічний пептидний субстрат (рис. 6.44). Специфічність методу визначає SAM2® біотинільовальна мембрана, що являє собою стрептавідиновий матрикс (Goueli, 1995). Завдяки високій афінності біотину до стрептавідину ($K_d = 10^{-15}\text{M}$) з такою мембраною швидко зв'язується біотинільована молекула субстрату (мінімум – $1,1\text{ нмоль/см}^2$). До того ж, мембрана дозволяє уникнути неспецифічного зв'язування, оскільки використовується специфічний субстрат для СаМ-кінази. Висока зв'язувальна здатність SAM2® мембрани щодо біотинільованого пептиду (субстрату для СаМ-кінази) і низький рівень "шуму" збільшує співвідношення сигнал-"шум".

Принцип методу полягає в тому, що СаМ-кіназа зразка з використанням $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ фосфорилує біотинільований пептидний субстрат, який зв'язується із стрептавідиною SAM2® мембраною. Надлишок радіоактивної мітки, яка не зв'язалася, та небіотинільовані білки видаляють шляхом відмивання.

Оскільки зв'язування біотину зі стрептавідином швидке й сильне, на утворений комплекс біотин-стрептавідин не впливають ні зміни рН, ні зміни температури, концентрації солей, а також денатуруючі агенти. Радіоактивність вираховують методом авторадіографії або шляхом зчитування у сцинтиляційні рідині. У другому випадку мембрану розрізають на квадрати, поміщають їх у флакони і зчитують за допомогою сцинтиляційного лічильника.

Метод SignaTECT® визначає концентрації СаМ-кінази в діапазоні 0–10 нг. Цим методом можна визначити активність як очищеної СаМ-кінази, так і в клітинному екстракті.

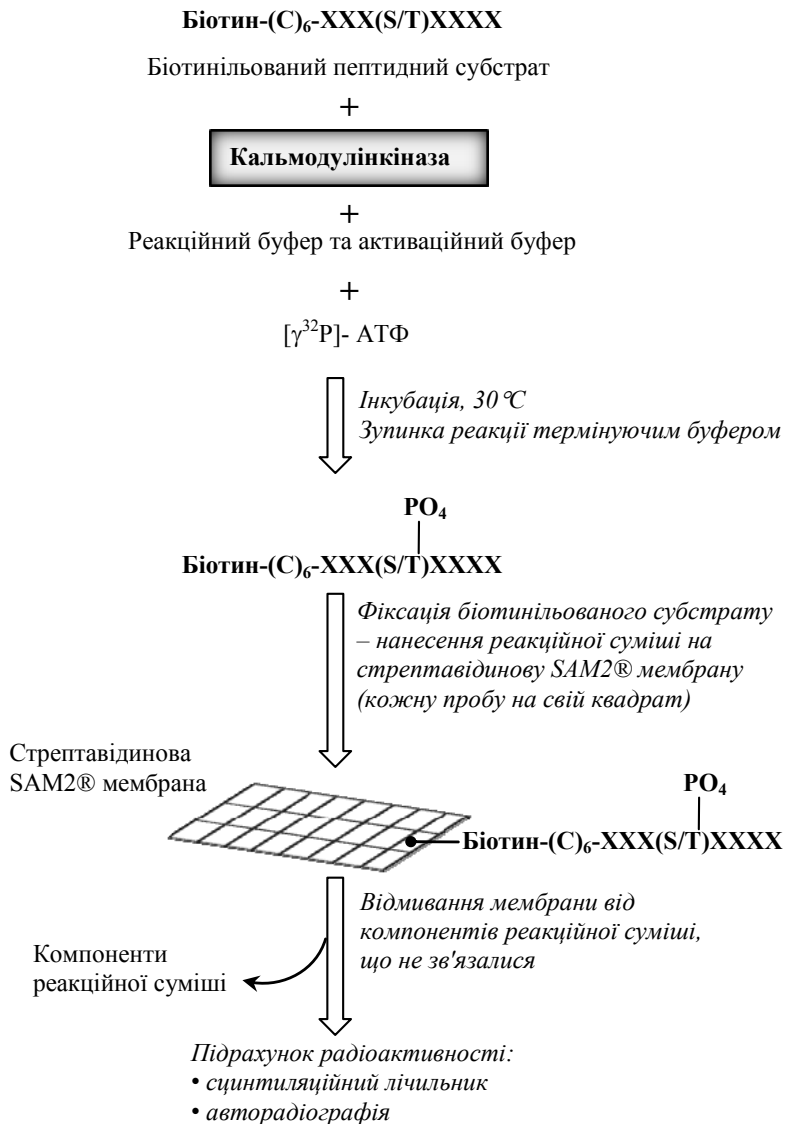


Рис. 6.44. Схема визначення активності СаМ-кінази методом SignaTECT®

6.4.4.2. Метод ELISA (CycLex®)

Незважаючи на високу чутливість, радіоактивні методи визначення активності СаМ-кінази є трудомісткими, небезпечними та залежать від часу напіврозпаду використаного радіоізоотопу. Зручним, чутливим та специфічним є нерадіоактивний метод CycLex®, який базується на технології "сендвіч"-ELISA. Він дозволяє зафіксувати СаМ-кіназну активність у фракціях, отриманих колонках та в гомогенатах тканин (якщо використовувати специфічний інгібітор СаМ-кінази). За допомогою цього методу проводять скринінг інгібіторів і активаторів СаМ-кінази, вивчають вплив фармакологічних препаратів, також він придатний для кінетичних аналізів.

Для визначення використовується пептидний субстрат СаМ-кінази – "Syntide-2", іммобілізований у лунках мікропланшета (рис. 6.45).

Додають 100 мкл реакційної суміші в кожен лунку

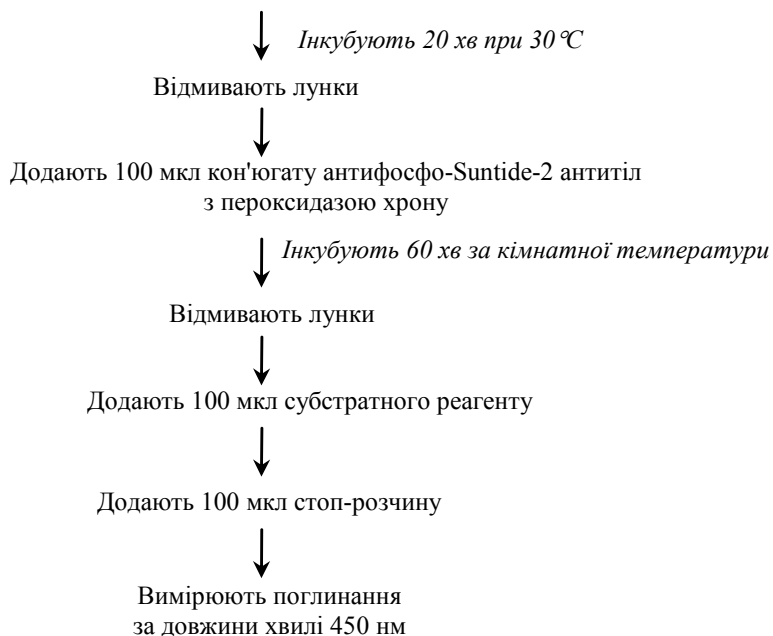


Рис. 6.45. Схема визначення активності СаМ-кінази методом CycLex®

Додають зразок (СаМ-кіназу) та АТФ, за присутності Mg^{2+} вона фосфорилує субстрат. Після цього вносять фосфоспецифічні моноклональні детекторні антитіла антитіла (MS-6E6), які впізнають залишок фосфотреоніну у фосфорильованому субстраті "Syntide-2". Ці антитіла кон'юговано з ферментом пероксидазою хрому, яка розщеплює хромогенний субстрат ТМВ, унаслідок чого розчин забарвлюється у блакитний колір або в жовтий після додавання стоп-реагенту).

Вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі за довжини хвилі 450/540 нм і вираховують активність СаМ-кінази, використовуючи стандартну криву. Для кінетичних досліджень до лунок додають зразок у різні проміжки часу, а реакцію зупиняють хелатором іонів (ЕДТА).

6.4.5. Визначення інозитол-1,4,5-трифосфату та інозитол-1-фосфату

Інозитол-1,4,5-трифосфат (IP3) є вторинним посередником, який мобілізує внутрішньоклітинні кальцієві депо у відповідь на стимуляцію клітин нейромедіаторами, гормонами тощо. Рецептори для IP3 знайдені в мембранах ендоплазматичного ретикулума (ЕПР) та інших органел. Зв'язування IP3 з рецепторами зумовлює відкриття кальцієвих каналів, і іони кальцію надходять із ЕПР у цитозоль. Зростання рівня IP3 у цитозолі викликає цілий ряд ефектів, включаючи м'язове скорочення, деполяризацію плазматичної мембрани, агрегацію тромбоцитів та вивільнення із них серотоніну. IP3 також бере участь у формуванні пам'яті.

Визначення IP3 у клітинах і тканинах проводиться як у фундаментальних дослідженнях процесів внутрішньоклітинної сигналізації, так і з метою пошуку нових фармакологічних препаратів. Більшість традиційних методів визначення IP3 потребують його очищення з клітинного екстракту шляхом іонообмінної хроматографії, якій передують хімічний або ферментативний гідроліз фосфатів. Інозитол визначають методами газової хроматографії, ферментативним або спектрофотометричним методом, що вимірює неорганічний фосфат. З використанням інозитол-1,4,5-трифосфат-3-кінази та радіоактивно міченого $[\gamma^{32}P]$ АТФ у частково очищених клітинних екстрактах визначають утворен-

ня [^{32}P]IP4 (інозитол-1,3,4,5-тетрафосфату) – продукту фосфорилювання IP3 у положенні 3, за яким оцінюють рівень безпосередньо IP3 (Tarver, 1987). В інших методах попередники IP3 мітять [^{32}P]-фосфатом чи [^3H]-інозитолом, відокремлюють інозитолфосфати за допомогою HPLC, ідентифікуючи піки на хроматографі за радіоактивністю. Кількість відновленого IP3 визначають за специфічною активністю фосфоінозитидного попередника. Усі ці методи дуже повільні, дорогі та трудомісткі. Новими модифікаціями радіоактивних методів є методи [^3H]-радіорецепторний та SPA. Також широко використовуються нерадіоактивні методи: імуоферментний метод ELISA та HTRF – метод, який базується на флуоресцентно-резонансному перенесенні енергії.

6.4.5.1. [^3H]-радіорецепторний метод

В основі методу покладено технологію радіорецепторного зв'язування. У ньому використовуються готові мембранні препарати, виділені з кори надниркових залоз та мозочка, які містять IP3-рецептор (Challiss, 1988). Функція цього підходу полягає у кількісному визначенні інозитол-1,4,5-трифосфату (IP3). Метод є швидким і простим у виконанні, чутливим та специфічним. Він базується на радіорецепторному методі (англ., radioreceptor assay, RRA), у якому радіоактивний ліганд конкурує з нерадіоактивним за зв'язування з обмеженою кількістю рецепторних сайтів (рис. 6.46). Немічений ліганд стандарту чи зразка та фіксована кількість міченого ліганду реагують з фіксованою обмеженою кількістю рецептора. Кількість мітки, що реагує з рецептором, зменшується, тоді як кількість неміченого ліганду збільшується.

Тест-набір ([^3H] Radioreceptor Assay Kit) містить IP3-рецептор у складі мембранних препаратів з мозочка теляти. Він зв'язується з природним IP3 зразка та з радіоактивно міченим [^3H]IP3. Вміст [^3H]IP3, зв'язаного з рецептором, установлюють, спочатку центрифугуючи пробірки з мембранними препаратами (вони опускаються на дно пробірки), після чого вимірюють їхню радіоактивність у сцинтиляційній рідині за допомогою сцинтиляційного лічильника. Оскільки немічений IP3 конкурує з міченим за зв'язування з рецепторами у складі мембранних препаратів, радіоактивність у пробірках зменшується. Визначення проводять у полістиролових або поліпропіленових пробірках.

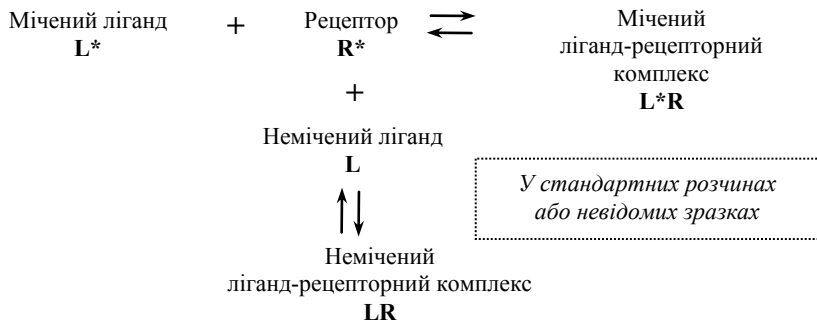


Рис. 6.46. Схема визначення інозитол-1,4,5-трифосфату методом рецепторного радіозв'язування

Для визначення кількості ліганду зразка, що зв'язався з рецептором, необхідно виключити рівень неспецифічного зв'язування. Воно може виникати внаслідок зв'язування мітки не з рецептором, а з іншими частинами мембрани у складі препарату. Для цього рецептор осаджують холодним розчином ліганду і вимірюють кількість мітки, що залишилася. В описаному методі неспецифічне зв'язування визначають, осаджуючи рецептор інозитолгексафосфатом (IP6). Стандартну криву будують, використовуючи IP3-стандарт відомої концентрації.

6.4.5.2. Метод SPA

Метод SPA (Scintillation Proximity Assay) дозволяє ефективно визначати вміст IP3 з використанням радіоактивних міток (принцип викладено в підрозд. 6.4.5.2). У ньому використовується біотинільований білок, який зв'язується з IP3. Зв'язувальний білок являє собою PH (pleckstrin homology) домен, отриманий із фосфоліпази C, здатний взаємодіяти з IP3. Цей білок іммобілізований на вкритих стрептавідином полівінілтолуенових (PVT) гранулах, спроможних до сцинтиляції. При додаванні радіоактивно міченого $[^3\text{H}]\text{IP}_3$ він зв'язується з даним білком і опиняється у безпосередній близькості до гранул завдяки взаємодії біотину зі стрептавідином. У результаті радіоактивний ізотоп тритій збуджує сцинтиляцію гранул, і вони починають випромінювати (рис. 6.47). Якщо мічений $[^3\text{H}]\text{IP}_3$ не зв'язаний із гранулами, радіоактивний сигнал не генерується.

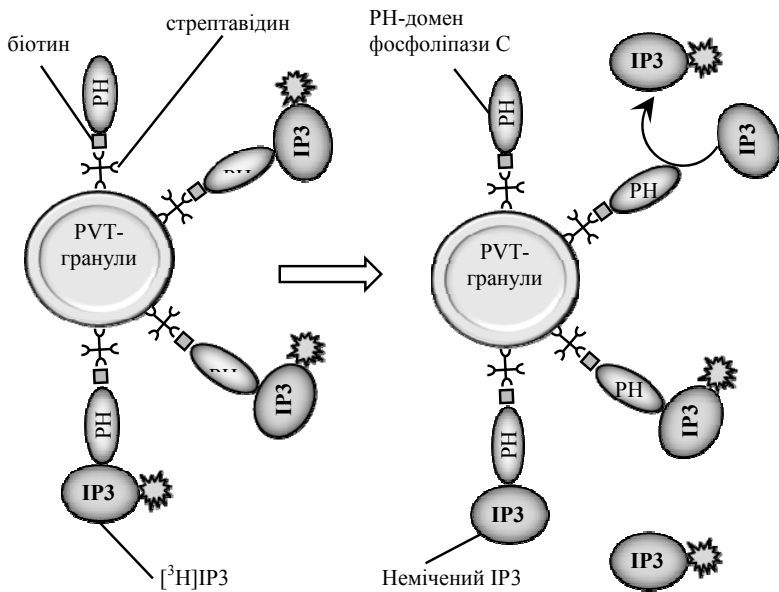


Рис. 6.47. Схема визначення інозитол-1,4,5-трифосфату методом SPA

Визначення IP3 базується на конкуренції між міченим $[^3\text{H}]\text{IP3}$ та неміченим IP3 стандартом чи зразка за зв'язування з білком, іммобілізованим на гранулах. Уміст IP3 у зразку установлюють за стандартною кривою, яку отримують, проводячи реакції з IP3-стандартом в обраному діапазоні концентрацій.

6.4.5.3. Метод ELISA

Визначення інозитол-1-фосфату (IP1) базується на конкурентному імуоферментному аналізі, у якому використовуються моноклональні антитіла проти IP1. IP1, кон'югований з пероксидазою хрому, що знаходиться у біологічному зразку, конкурує з IP1 у тест-системі за зв'язування з цими антитілами (рис. 6.48).

При зв'язуванні IP1 зразка з первинними антитілами він витісняє мічений аналог і інтенсивність сигналу зменшується. Вторинні антимишині антитіла сорбовано на пластику мікропланшета для ELISA, тому процедура аналізу потребує відповідного

етапу інкубації. Клітини стимулюють агоністами рецепторів, спряжених з G-білками, після чого лізують і переносять лізат у лунки мікропланшета, додають мічений пероксидазою хрому IP1 та первинні анти-IP1 антитіла, інкубують, додають хромогенний субстрат ТМВ (для пероксидази хрому) і зупиняють реакцію. Детекцію сигналу здійснюють колориметрично, вимірюючи екстинкцію за довжини хвилі 450 нм. Інтенсивність сигналу обернено пропорційна кількості IP1 у зразку.

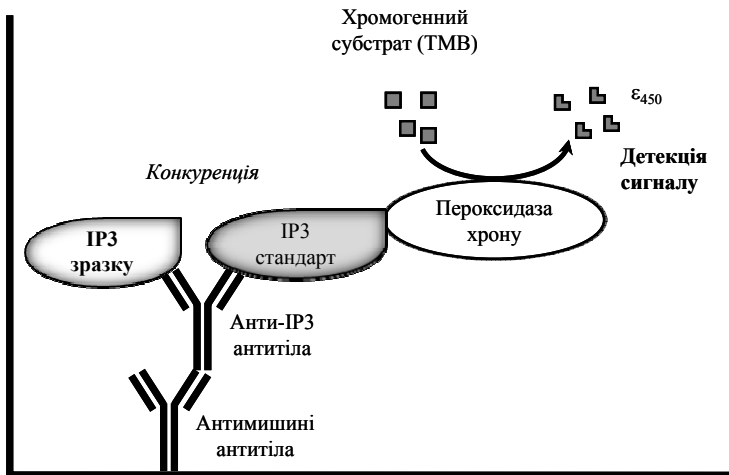


Рис. 6.48. Принцип (А) і схема (Б) визначення інозитол-1-фосфату методом ELISA

6.4.5.4. Метод HTRF (TR-FRET)

Вміст IP3 у цьому методі визначають за допомогою конкурентного імунологічного варіанта TR-FRET, в основі якого лежить явище флуоресцентного перенесення енергії, розділеного в часі (принцип описано в підрозд. 1.6.4). До складу тест-системи входять моноклональні анти-IP1 антитіла, мічені криптомом Eu³⁺ (HTRF-донор), та IP3, мічений d2 (HTRF-акцептор). За відсутності IP3 у зразку вони взаємодіють один з одним, при цьому генерується сигнал FRET, інтенсивність якого є максимальною. Це виявляється у випромінюванні світла за довжини хвилі 665 нм.

Аналогічно визначають не тільки інозитол-1,4,5-трифосфат (IP3), а і його метаболіт – інозитол-1-фосфат (IP1). Вміст цих сполук у клітині є показником, за яким оцінюють функціональний стан рецепторів, спряжених з G-білками. Стабільне накопичення у клітинах IP1 у присутності LiCl свідчить про активацію цих рецепторів.

Клітини стимулюють LiCl, що приводить до активації рецепторів, спряжених із G-білками (рис. 6.49). Це приводить до стимуляції передачі сигналу у Ca²⁺-поліфосфоінозитольній системі: активації мембранної фосфоліпази C, яка розщеплює фосфатидилінозитолдифосфат з утворенням інозитол-1,4,5-трифосфату (IP3). При постановці аналізу IP3 зразка конкурує з міченим d2 IP3 тест-системи за зв'язування з анти-IP3 антитілами, міченими Eu³⁺. При цьому інтенсивність сигналу FRET зменшується. Чим більша концентрація IP3 у зразку, тим менша інтенсивність сигналу.

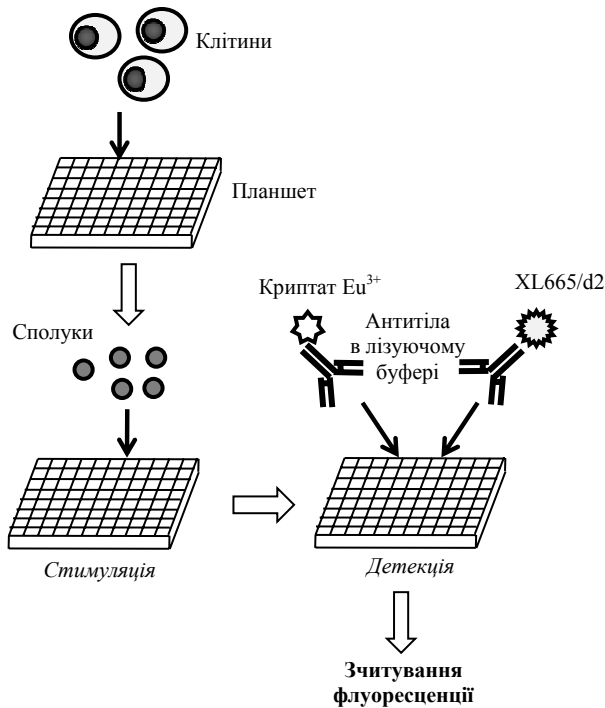


Рис. 6.49. Схематичне зображення визначення вмісту IP3 конкурентним методом TR-FRET

6.4.6. Визначення активності фосфатидилінозитол-3-кінази

Фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3-кінази) є широко розповсюдженими ферментами, які фосфорилують мембранний ліпід фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфат (PI(4,5)P₂) з утворенням фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфату (PI(3,4,5)P₃). В еукаріотичних клітинах присутні множинні форми PI3-кіназ. PIP3 є важливим вторинним посередником в інозитолфосфатній сигнальній системі. Він відіграє важливу роль у регуляції фундаментальних клітинних процесів, таких, наприклад, як клітинний ріст, проліферація, диференціація, міграція та виживання. У зв'язку зі своєю біологічною роллю PI3-кінази і PIP3 інтенсивно досліджуються з метою створення нових фармакологічних препаратів для лікування діабету, запальних та онкологічних захворювань.

Традиційним методом визначення активності PI3-кінази є радіоактивний, у якому використовуються мічений [$\gamma^{32}\text{P}$]-АТФ.

Створено нерадіоактивні методи, зокрема імуноферментний аналіз та флуоресцентний метод HTRF.

6.4.6.1. Радіоактивний метод

Активність фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3-кінази) визначають за допомогою радіоактивно міченого субстрату – [$\gamma^{32}\text{P}$]-АТФ, активність якого становить 1 мкКи (мікрокюри) (Fruman, 1998). У результаті ферментативної реакції фосфорилування мічений фосфат включається у ліпідний субстрат для PI3-кінази – фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат. Після інкубації реакцію зупиняють соляною кислотою і проводять екстракцію ліпідів із зразка сумішшю хлороформ:метанол (1:1). Для цього проби вортексують і центрифугують для розділення фаз, видаляють верхню водну фазу, а органічну фазу відмивають соляною кислотою. Мічений фосфорильований продукт відокремлюють за допомогою тонкошарової хроматографії на силікагелі, використовуючи як розчинник суміш 2 М оцтової кислоти з ізопропанолом (1 : 2). Після цього визначають радіоактивність отриманих плям на хроматографі за допомогою сцинтиляційного лічильника. Альтернативою є визначення радіоактивності у фазі, відмитій хлороформом, у сцинтиляційній рідині.

6.4.6.2. Метод НТRF

Для визначення активності ферменту фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3-кінази) фірмою "Millipore" (США) розроблено метод, який базується на НТRF-технології (див. підрозд. 1.6.4). Ця технологія полягає в тому, що для мічення біомолекул використовуються хелати лантаноїдів. Деякі з цих елементів, зокрема європій, тербій і самарій, мають довгий час життя збудженого стану (life-time fluorescence). Це дозволяє використовувати їх для вимірювань, які базуються на флуориметрії, розділених у часі (англ., time-resolved fluorometry, TRF). Такі методи мають високу чутливість і низький рівень фонового сигналу, який може бути викликаним матеріалом зразка або пластиковою поверхнею мікропланшета. Хелати лантаноїдів широко використовуються у методах, які базуються на спорідненості одних молекул до інших (bioaffinity assay). Фірмою "Kaivogen" (Фінляндія) створено флуоресцентні хелати, які використовуються як мітки-донори в технології TR-FRET, у яких усі реакції проводять безпосередньо на поверхні пластику.

Метод визначення активності PI3-кінази базується на здатності ферментів 1 класу PI3-кіназ каталізувати перетворення фосфатидилінозитол-4,5-біфосфату на фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат (PIP3) у присутності АТФ і Mg^{2+} (рис. 6.50).

Продукт реакції PIP3 конкурує зі своїм штучним біотинільованим аналогом за місце зв'язування в енерготранспортуючому комплексі, що складається із моноклональних анти-GST (англ., glutathione-S-transferase, глутатіон-S-трансфераза) антитіл, мічених європієм, GST-мітки PH (pleckstrin homology) домену, та стрептавідин-алофікоціаніну (англ., allophycocyanin, APC). Повний комплекс, утворення якого можливе лише за участі біотинільованого PIP3, має здатність за довжини збудження 330 нм передавати енергію на APC і флуоресціювати за довжини хвилі 665 нм. При цьому власне європій флуоресціює за довжини хвилі 620 нм. При взаємодії PIP3, утвореного під час реакції, з PH-доменом антитіл, мічених європієм, порушується передача та перетворення енергії всередині комплексу, що відображається на відсутності випромінювання при 665 нм і зростанні випромінювання при 620 нм. Оптичну густину можна виміряти на мікрорідері при довжині хвилі збудження – 330 нм та довжинах хвиль випромінювання – 620 нм та 665 нм. Для кількісного обрахунку використовують НТRF коефіцієнт, який знаходять за формулою:

$$\text{HTRF коефіцієнт} = \left(\frac{\text{поглинання при } 665 \text{ нм}}{\text{поглинання при } 620 \text{ нм}} \right) \times 10000$$

Чим нижчий коефіцієнт HTRF, тим вищою є PI3-кіназна активність досліджуваного зразка. Максимальне значення для коефіцієнта HTRF становить 7832 і відповідає холостій пробі, що містить усі необхідні компоненти реакції, крім білкового препарату – джерела PI3-кінасної активності.

6.4.7. Визначення активності Akt-кінази

Akt-кіназа (протеїнкіназа B) – серин/треонінпротеїнкіназа, яка бере участь у фосфатидилінозитольному сигнальному шляху. Akt-кіназа опосередковує клітинну відповідь, індуковану інсуліном, зокрема, інгібування кінази-3 глікогенсинтази, стимуляцію поглинання глюкози та посилення виживання клітин шляхом інгібування апоптозу. У клітинах ссавців експресуються три ізоформи Akt-кінази: Akt1, Akt2 і Akt3.

Коли фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат асоційований з плазматичною мембраною, Akt-кіназа опиняється безпосередньо близько до фосфоінозитидзалежної протеїнкінази 1 (PDK1). PDK1 фосфорилує Akt-кіназу. Це стимулює каталітичну активність Akt, і вона фосфорилує інші клітинні білки, які посилюють клітинний ріст, регулюють клітинний цикл та виживання клітин. Фосфорилування цих білків інгібує їхню активність. Кожна ізоформа Akt-кінази складається із трьох функціонально різних частин: N-кінцевого PH (pleckstrin homology) домену, який забезпечує зв'язування ферменту з PIP2 і PIP3, центрального каталітичного домену та C-кінцевої гідрофобної ділянки.

PH домен Akt-кінази зв'язується з фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфатом, який утворюється під дією PI3-кінази. Оскільки фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат і фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат заходять у плазматичній мембрані, це приводить до транслокації Akt-кінази в мембрану.

Надекспресія Akt1 або Akt2 спостерігається при карциномах яєчників, підшлункової та молочної залоз, а отже, актуальним є пошук нових інгібіторів цього ферменту. Тому розроблено цілу низку методів визначення активності Akt-кінази. Найбільш уживаними є методи ELISA, Western-блотингу та HTRF.

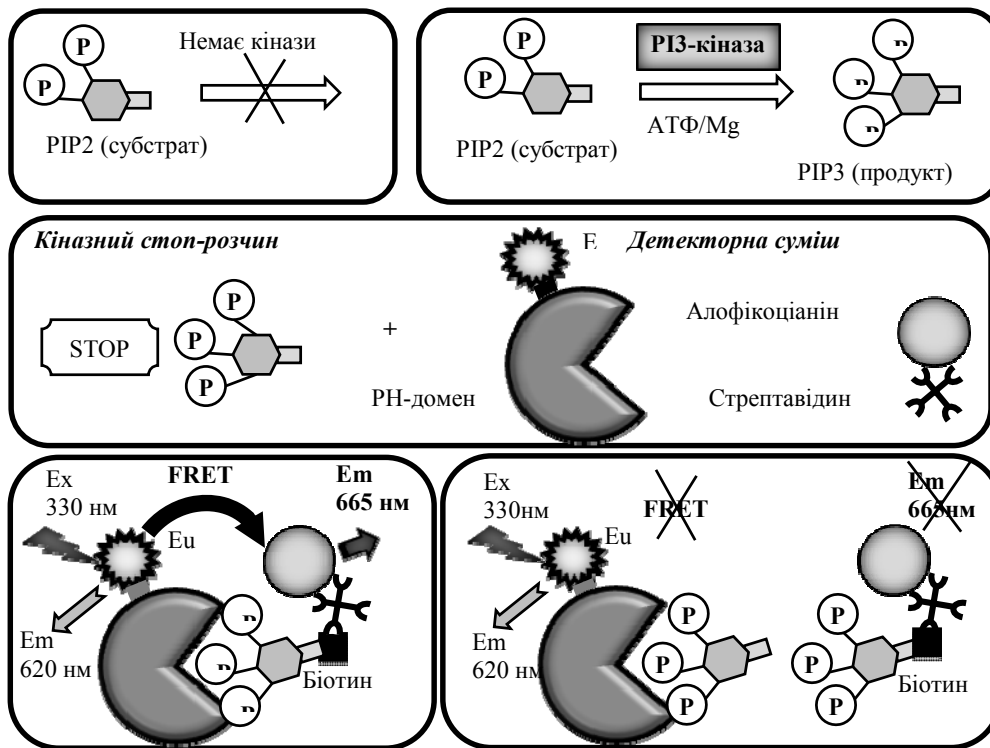


Рис. 6.50. Схема визначення активності PI3-кінази методом HTRF

6.4.7.1. Метод ELISA

Цей метод являє собою "сендвіч"-ELISA. У системі CysLex® використовують специфічний субстрат Akt-кінази, так званий "AKTide-2T", іммобілізований у лунках мікропланшета. Додають специфічні моноклональні антитіла проти даного субстрату. За присутності Akt-кінази зразка він фосфорилується, причому на нього діють усі три ізоформи ферменту (Akt1, 2 і 3). Детекторні антитіла AT-3E2 є моноклональними антитілами, які впізнають тільки фосфорильовану форму субстрату AKTide-2T. Вони кон'юговані з ферментом, що розщеплює хромогенний субстрат. Інтенсивність забарвлення, що розвивається, вимірюють на рідері для мікропланшетів. Цим методом можна вимірювати активність навіть частково очищеної Akt-кінази, а також вивчати вплив на її активність активаторів та інгібіторів.

Активність Akt-кінази визначають також методом Western-блотингу (метод KinaseSTAR™). З використанням специфічних антитіл проводять імунопреципітацію ферменту з клітинних лізатів, після чого визначають рівень фосфорилування субстрату GSK-3 α за допомогою антитіл, специфічних до GSK-3 α (Сер21).

6.4.7.2. Метод Western-блотингу

Даний метод дозволяє установити активність Akt-кінази без використання радіоактивної мітки. Визначення базується на селективній імунопреципітації Akt-кінази при її зв'язуванні з антитілами, іммобілізованими на гранулах сорбенту. Потім ці кульки інкубують у буфері, що містить білковий субстрат (химерний білок) і АТФ. Фосфорильований субстрат визначають методом Western-блотингу з використанням фосфоспецифічних антитіл. Перевагою підходу є те, що він є нерадіоактивним і має високу чутливість, яка досягається завдяки специфічним антитілам. Метод дозволяє вимірювати зміни активності Akt-кінази у клітинних екстрактах без очищення самого білка. Він застосовується також для вивчення ефективності нових інгібіторів цієї кінази: клітини обробляють інгібіторами, лізують і визначають у них активність ферменту.

Під час вимірювання спочатку проводять селективну імунопреципітацію Akt-кінази за допомогою антитіл проти цього білка, які іммобілізовані на гранулах сефарози (рис. 6.51). Далі ці гранули інкубують у кіназному буфері, що містить рекомбінантний химерний білок (fusion protein) GSK-3 – субстрат для протеїнкінази, і охолоджений розчин АТФ – другий субстрат ферменту.

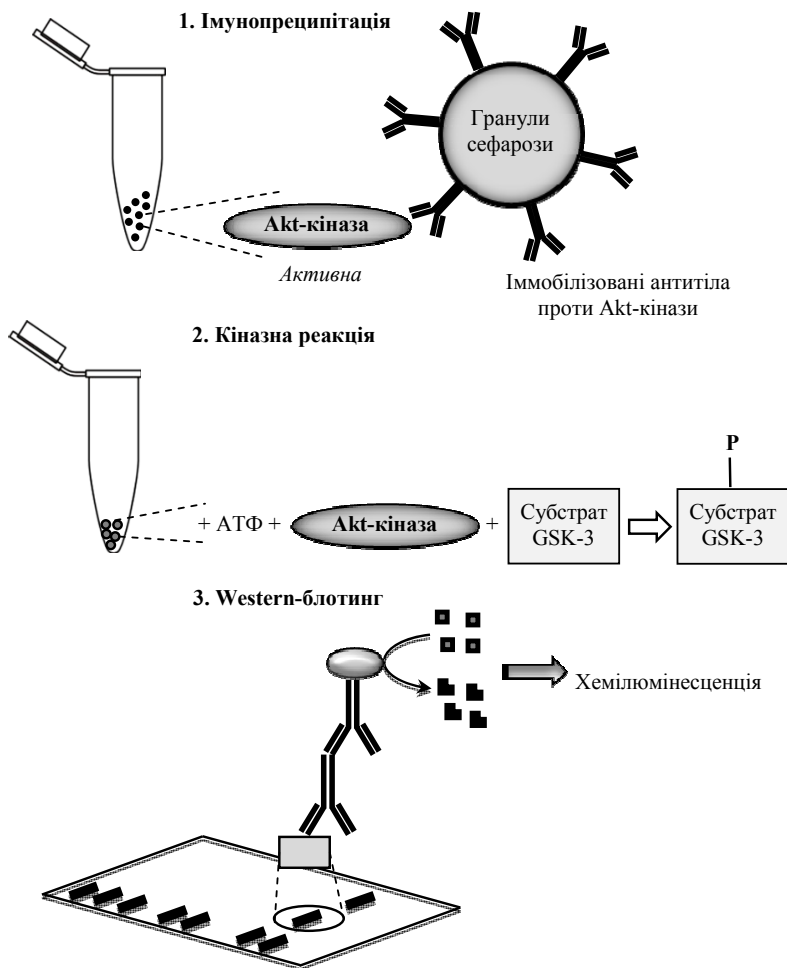


Рис. 6.51. Схема визначення активності Akt-кінази методом Western-блотингу

Фосфорильований химерний білок визначають методом Western-блотингу з використанням первинних антитіл проти цього білка (Phospho-GSK-3 α/β (Ser21/9)) та вторинних антитіл (IgG), кон'югованих з пероксидазою хрому. Смуги на блотограмі візуалізують хемілюмінесцентним методом.

6.4.7.3. Метод HTRF

Метод HTRF використовують для визначення активованої фосфо-Akt (Ser473) кінази у цілих клітинах. Він поєднує у собі HTRF-технологію (принцип викладено в підрозд. 1.6.4) і "сенд-віч"-імуноаналіз (див. підрозд. 6.1.2).

Дія на клітини сполуками, що активують рецептори, спряжені з G-білками, приводить до активації Akt шляхом її фосфорильовання. Після лізису клітин у лізат уводять кон'югат антифосфо-Akt-кіназних моноклональних антитіл, мічених криптатом Eu³⁺ (HTRF-донор) і кон'югат антитіл, мічених d2 (HTRF-акцептор) (рис. 6.52).

Якщо у зразку присутня фосфорильована Akt-кіназа, обидва типи антитіл зв'язуються з нею, і при збудженні Eu³⁺ відбувається флуоресцентне резонансне перенесення енергії на акцептор d2. Сигнал FRET, що виникає, реєструють, вимірюючи інтенсивність флуоресценції за довжини хвилі 620 нм. Інтенсивність сигналу пропорційна кількості фосфо-Akt кінази.

6.4.8. Визначення активності протеїнкінази C

Ca²⁺-фосфоліпідзалежні протеїнкінази (протеїнкінази C, PKC) є родиною протеїнкіназ, які активуються вторинними посередниками Ca²⁺, діацилгліцеролом та фосфоліпідом (таким, як фосфатидилсерин). Вони відіграють важливу роль в опосередкуванні клітинної відповіді на позаклітинні стимули та залучені до процесів проліферації, диференціації, апоптозу, екзоцитозу. Вони беруть участь у фосфорильованні нейрональних білків, які регулюють вивільнення нейромедіаторів та задіяні у процесах пам'яті. Активність протеїнкінази C пов'язують з розвитком ракових пухлин.

Важлива біологічна роль протеїнкінази C обумовила розробку різноманітних методів визначення її активності в біологічних зразках. Традиційними методами є радіометрична детекція з використанням ³²P-міченого фосфату.

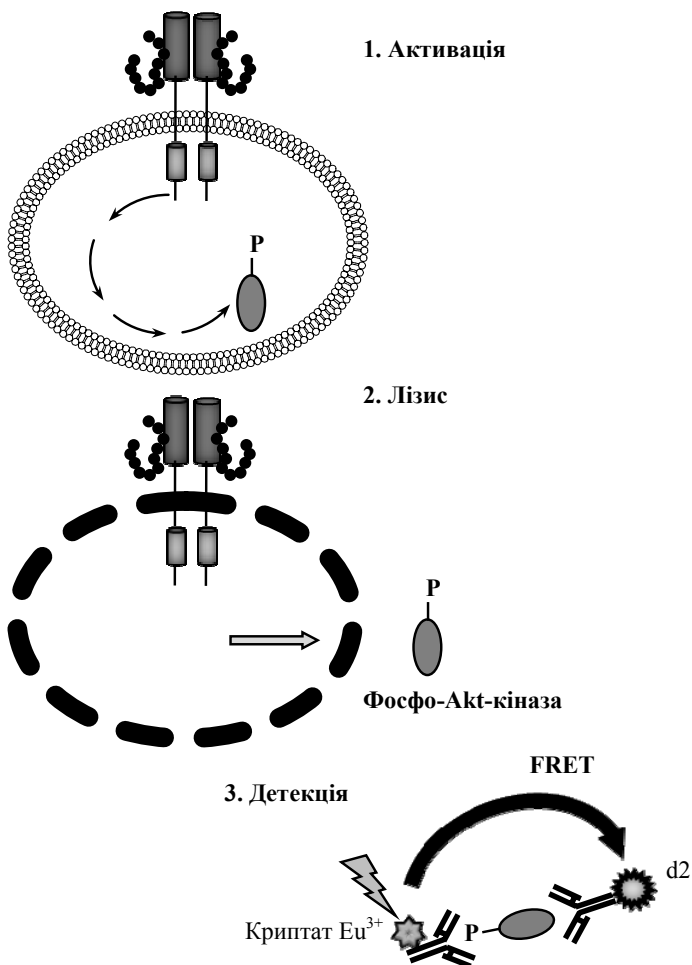


Рис. 6.52. Схема визначення активності фосфо-Акт-кінази методом HTRF

Сучасною, більш специфічною модифікацією є метод SignaTECT®, у якому використовується біотинільований специфічний субстрат, іммобілізований на стрептавідиновій мембрані. Попри високу ефективність, радіоактивні методи потенційно небезпечні. Сьогодні найпопулярнішими є нерадіоактивні методи на базі ELISA та флуориметричний метод PerTag®.

6.4.8.1. Радіоактивні методи

Найпоширенішим радіоактивним методом визначення активності протеїнкінази С є детекція перенесення міченого $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ фосфату з $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ АТР на білковий або пептидний субстрат, специфічний для протеїнкінази С (Biotrak™ protein kinase C (PKC) assay). Субстрат іммобілізують на фосфоцелюлозних фільтрах завдяки слабким електростатичним взаємодіям (Goswami, 1991).

Визначення проводять у мікроцентрифужних пробірках, у які вносять буферне середовище, ліпід (активатор протеїнкінази С), пептидний субстрат і зразок (джерело досліджуваного ферменту). Реакцію починають, додаючи до суміші $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ АТР, після чого інкубують, зупиняють реакцію та відмивають ортофосфорною кислотою. Після цього відокремлюють фосфорильований зі дії протеїнкінази С пептидний субстрат. Для цього суміш наносять на фосфоцелюлозні фільтри, знову відмивають, фільтри висушують і поміщають у флакони із сцинтиляційною рідиною. За допомогою сцинтиляційного лічильника вимірюють радіоактивність. Розраховують кількість радіоактивного фосфору $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$, включеного до пептидного субстрату. Ступінь його фосфорилування корелює з активністю протеїнкінази С. За допомогою такого методу можна визначити активність протеїнкінази С у багатьох зразках. Умови оптимізовано таким чином, щоб зафіксувати максимальні значення активності ферменту.

Недоліком описаного радіоактивного методу є те, що за присутності в біологічному зразку (наприклад, клітинному екстракті) багатьох протеїнкіназ, пептидні субстрати можуть фосфорилуватися не тільки протеїнкіназою С. Для підвищення специфічності визначення було розроблено **метод SignaTECT®**, у якому використовується специфічний субстрат протеїнкінази С – біотинільований пептид, що є похідною нейроспецифічного білка нейрограніну – (Chen, 1993). Протеїнкіназа С фосфорилує цей пептид шляхом перенесення $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -фосфатного залишку з $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ АТР. Фосфорильований $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -мічений субстрат зв'язується з біотинільовальною мембраною (SAM2® Membrane), яка являє собою стрептавідиновий мактрикс. Мембрану заздалегідь нумерують і розрізають на окремі частини, які згодом поміщають у флакони із сцинтиляційною рідиною. Цю мембрану можна аналізувати й методом авторадіографії. Метод є швидким, має високе співвідношення сигнал : "шум" і може бути застосований для кінетичних досліджень.

6.4.8.2. Метод ELISA

Цей метод є безпечним, швидким і специфічним. Він придатний для визначення активності не тільки очищеної протеїнкінази С, а й активності у грубих клітинних екстрактах. З його допомогою можна проводити скринінг інгібіторів протеїнкінази С.

Метод базується на твердофазовому ELISA (рис. 6.53). У ньому використовують специфічний синтетичний пептидний субстрат протеїнкінази С, іммобілізований у лунках мікропланшета. Коли фермент зразка фосфорилує цей субстрат, його фосфорильовану форму впізнають моноклональні антитіла.

Далі додають вторинні моноклональні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому. Вона розщеплює хромогенний субстрат ТМВ, у результаті чого розвивається забарвлення. Зупиняють реакцію та вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 450 нм на рідері для мікропланшетів. Вона пропорційна активності протеїнкінази С.

6.4.8.3. Флуориметричний метод PerTag®

Метод PerTag® використовується для дослідження багатьох протеїнкіназ. Його принцип описано в підрозд. 6.2.4.2, де він використовується для визначення активності протеїнкінази А. Цей метод нерадіоактивний, високочутливий і швидкий. У ньому використовується флуоресцентний пептидний субстрат – PerTag® С1 пептид, кон'югований з флуоресцентним барвником, що надає йому рожевого кольору. Амінокислотна послідовність субстрату протеїнкінази С – PerTag® С1 пептиду, являє собою P-L-S-R-T-L-S-V-A-A-K. Фосфорилування цього специфічного субстрату під впливом протеїнкінази С змінює цього заряд з +1 до -1. Тому фосфорильований і нефосфорильований субстрати можуть бути швидко відокремлені один від одного шляхом електрофорезу в агарозному гелі. Фосфорильований субстрат мігрує до позитивно зарядженого електрода, а нефосфорильований – до негативно зарядженого (див. рис. 6.27). Визначити вміст фосфорильованого пептиду проводять за допомогою флуориметра. Також можливо сканувати гель за допомогою денситометра.

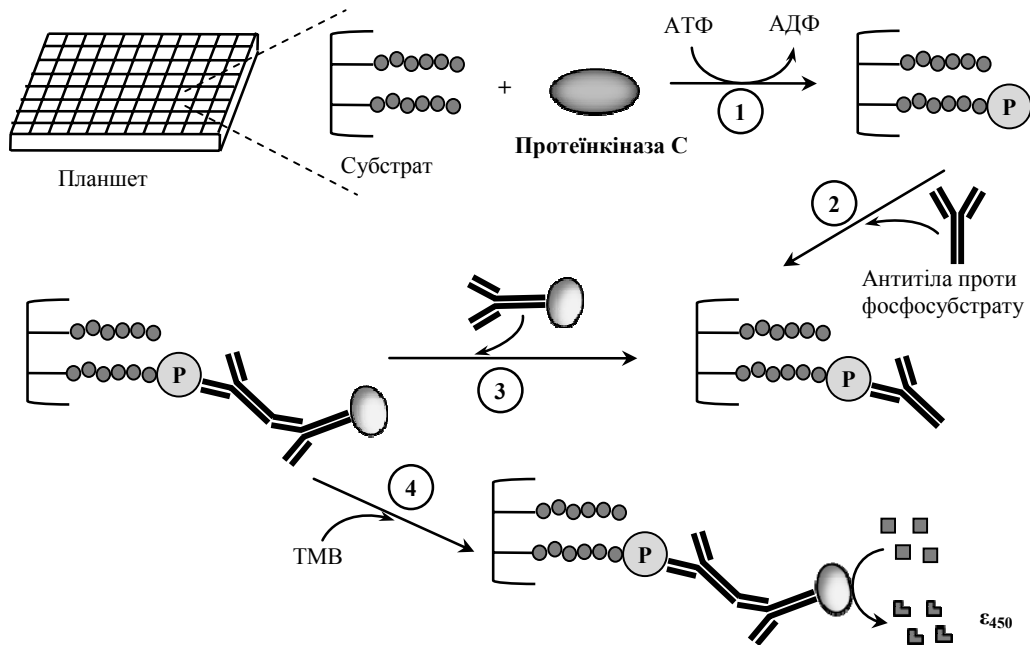


Рис. 6.53. Схема визначення активності протеїнкінази С методом ELISA:

1 – додавання протеїнкінази С й АТФ, кінзна реакція; 2 – додавання антитіл проти фосфосубстрату;

3 – додавання вторинних антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрону;

4 – додавання субстрату ТМВ, вимірювання поглинання (ϵ_{450})

З використанням методу PerTag® можна визначити менше 10 нг протеїнкінази менш ніж за 2 год. Це дозволяє провести швидкий скринінг великої кількості зразків, наприклад фракцій, отриманих із колонки під час хроматографічного очищення ферменту.

Метод PerTag® має цілий ряд переваг перед іншими нерадіоактивними методами визначення активності протеїнкіназ. Він має високу специфічність, тому що тільки фосфорилування PerTag® пептиду дає флуоресцентний сигнал. Якщо будуть фосфорильовані інші сполуки, це не впливатиме на результат вимірювання. Завдяки цьому рівень фонового сигналу є мінімальним навіть якщо фермент лише частково очищений.

6.5. ВИВЧЕННЯ СИСТЕМИ ТИРОЗИНОВОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ

6.5.1. Визначення активності тирозинпротеїнкінази

Тирозинпротеїнкінази є широко поширеними ферментами, які залучені до сигнальних шляхів, що регулюють клітинну проліферацію, диференціацію, трансформацію, нормальний і патологічний клітинний ріст, карциногенез, імунну відповідь та ін. Визначення їхньої активності проводять при дослідженні таких аспектів внутрішньоклітинної сигналізації: очищення і характеристика природних і рекомбінантних тирозинпротеїнкіназ, з'ясування їхніх біологічних функцій, розробка нових інгібіторів тощо.

Тирозинпротеїнкінази каталізують перенесення гамма-фосфатної групи від АТФ на тирозинові залишки білків. Тому методи визначення активності цих ферментів ґрунтуються на визначенні їхньої здатності фосфорилувати білкові субстрати або здатності до аутофосфорилування (Hawes, 2001). Таке визначення проводять з використанням радіоактивно міченого ³²P- або ³³P-фосфорильованого білка. У нерадіоактивних методах, наприклад методі ELISA, застосовують антитіла, котрі впізнають фосфорильовані тирозинові залишки. Високу чутливість мають флуориметричні методи, які базуються на явищі FRET, зокрема метод HTRF.

6.5.1.1. Метод SignaTECT®

Популярним методом визначення активності тирозинпротеїнкінази є радіоактивний метод, який базується на перенесенні міченого ^{32}P на залишки тирозину білка чи пептидного субстрату. Новий варіант такого методу – SignaTECT® має широку специфічність і дозволяє швидко і специфічно вимірювати ферментативну активність багатьох тирозинпротеїнкіназ, включаючи протеїнкінази, сполучені з трансмембранними рецепторами епідермального та тромбоцитарного ростових факторів, ростового фактора фібробластів, а також цитозольні протеїнкінази (p60src, p56lck, p93fes та p43abl).

У традиційних методах рівень фосфорилування пептидів під дією протеїнкіназ визначають на фосфоцелюлозних фільтрах, проте ці методи мають цілий ряд недоліків. Позитивно заряджені кіназні субстрати, мічені ^{32}P , зв'язують з цими фільтрами завдяки слабким електростатичним взаємодіям. Тому деяка кількість субстрату може втрачатися під час відмивання. Крім цього, пептидні субстрати можуть по-різному зв'язуватися з фосфоцелюлозними фільтрами (Casnellie, 1991). За присутності різних кіназ (наприклад, у клітинних екстрактах), пептидні субстрати чи білки, зв'язані з фосфоцелюлозою, можуть перетворюватися іншими протеїнкіназами. До того ж, препарати $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ можуть бути забруднені ^{32}P -міченими сполуками, які також можуть зв'язуватися з фосфоцелюлозними фільтрами. Таке неспецифічне зв'язування приводить до посилення фонового "шуму" та до зниження співвідношення сигнал-"шум" (Тоомік, 1992).

Тепер існують нові модифікації радіоактивного методу визначення протеїнкіназної активності, які дозволяють уникати неспецифічного зв'язування (наприклад, метод SignaTECT®). У них використовують біотинільовані пептидні субстрати, здатні зв'язуватися з мембраною, що "захоплює" біотин (SAM2® Biotin Capture Membrane). Така мембрана являє собою стрептавідиновий матрикс. Висока зв'язувальна здатність мембрани щодо біотинільованих пептидних субстратів і низький рівень фонового "шуму" збільшують співвідношення сигнал-"шум". У ході реакції тирозинпротеїнкіназа фосфорилує субстрат, він зв'язується з SAM2® мембраною, надлишок вільного $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

і небіотинільовані білки видаляються під час відмивання. Біотин зв'язується із стрептавідином швидко і міцно. Комплекс біотин-стрептавідин не піддається впливу екстремальних рН, температури, високих концентрацій солей і денатуруючих агентів. Завдяки силі цього зв'язування мічені ^{32}P біотинільовані пептидні субстрати тирозинпротеїнкінази не втрачаються під час відмивання мембрани. Вміст ^{32}P , включеного до субстрату, визначають зчитуванням радіоактивності у сцинтиляційній рідині або за допомогою авторадіографії.

Ферментативну реакцію проводять у мікроцентрифужних пробірках. Інкубаційне середовище містить біотинільований пептидний субстрат, немічений АТФ, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$, ванадат натрію (інгібітор тирозинпротеїнфосфатаз) і відновний агент (дитіотреїлол). Позитивним контролем є рецептор епідермального фактора росту, якому властива тирозинпротеїнкіназна активність. Реакцію ініціюють додаванням тирозинпротеїнкінази (очищеного ферменту або грубого клітинного екстракту). Після інкубації реакцію зупиняють додаванням гуанідингідрохлориду, проби центрифугують і наносять аліквоти на SAM2® мембрану. Її відмивають і висушують, після чого вимірюють радіоактивність.

6.5.1.2. Метод ELISA

Радіоактивні методи визначення активності тирозинпротеїнкіназ трудомісткі та пов'язані з роботою з небезпечними речовинами й потребують постійного постачання лабораторії радіоактивно міченим АТФ. Крім цього, час півжиття ізотопу ^{32}P дуже короткий (14,3 дні). Тому ширшого використання набули нерадіоактивні методи на базі імуноферментного аналізу, які дозволяють уникнути вживання міченого АТФ і мають цілий ряд переваг. Серед них: 1) висока специфічність, 2) відсутність перехресної реактивності з тирозином, фосфотреоніном чи фосфосерином, 3) кон'югати моноклональних антитіл з пероксидазою хрому дозволяють проводити пряму і специфічну детекцію тільки фосфорильованих тирозинових амінокислотних залишків, 4) чутливість методу ELISA зрівняна з такою для радіоактивних методів, 5) швидкість виконання (1,5–2 год).

Визначення активності тирозинпротеїнкінази методом ELISA проводять у мікропланшеті, лунки якого вкриті специфічним синтетичним субстратом poly-Глу-Тир (PGT), що містить множинні тирозинові залишки й може бути фосфорильованим різними тирозинпротеїнкіназами (рис. 6.54).

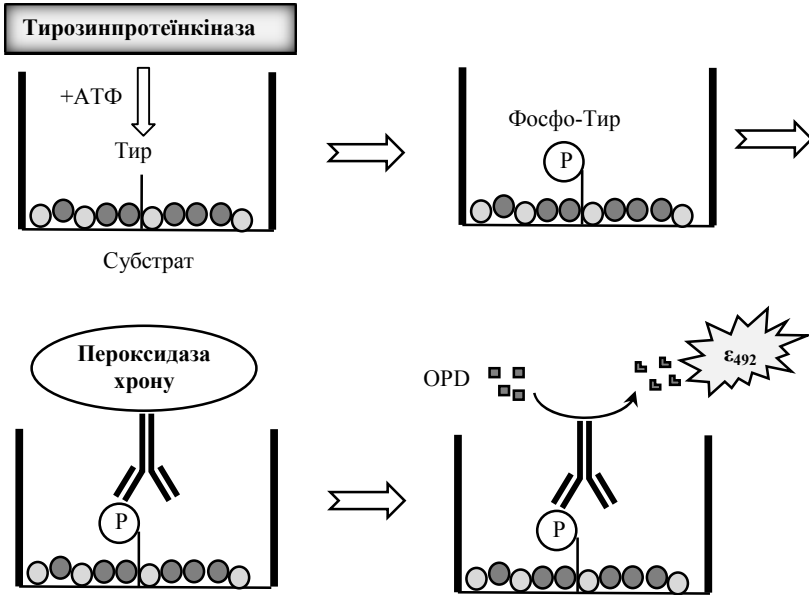


Рис. 6.54. Схема визначення активності тирозинпротеїнкінази методом ELISA

Реакцію фосфорильовання ініціюють додаванням тирозинпротеїнкіназами (тканинного чи клітинного екстракту або очищеного ферменту, як-то рецептор епідермального фактора росту) у буфері, що містить Mg^{2+} , Mn^{2+} , і АТФ. Фосфорильований фосфотирозиновий субстрат зв'язується з моноклональними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому. При розщепленні хромогенного субстрату ортофенілендіаміну (OPD) розвивається забарвлення, інтенсивність якого вимірюють спектрофотометрично на рідері. Величина оптичної щільності відображає присутність тирозинпротеїнкіназної активності у зразку (якісне визначення). Для кількісного визначення необхідно проводити

реакцію з позитивним контролем (рецептор епідермального фактора росту) і будувати стандартну криву (залежність оптичної щільності за $\lambda = 492$ нм від активності цього рецептора).

В інших тест-наборах для визначення активності тирозинпротеїнкінази як субстрат для пероксидази хрому використовують ТМВ, при розщеплення якого розвивається забарвлення за довжини хвилі 450 нм.

6.5.1.3. Метод Antibody Beacon™

Метод флуориметричний, у ньому використовують низькомолекулярний ліганд, мічений флуоресцентним барвником Oregon Green 488. У складі набору він зв'язаний з антифосфотирозиновими антитілами і у зв'язаному стані не флуоресцює. У присутності тирозинпротеїнкінази у зразку вона фосфорилує субстрат – тирозинвмісний пептид; утворений фосфорильований продукт швидко заміщує мічений ліганд на антигензв'язувальній ділянці антифосфотирозинових антитіл. Ліганд при цьому вивільнюється у розчин, і зв'язаний з ним барвник Oregon Green 488 флуоресцює. Після цього проводять детекцію сигналу, визначаючи інтенсивність флуоресценції (рис. 6.55).

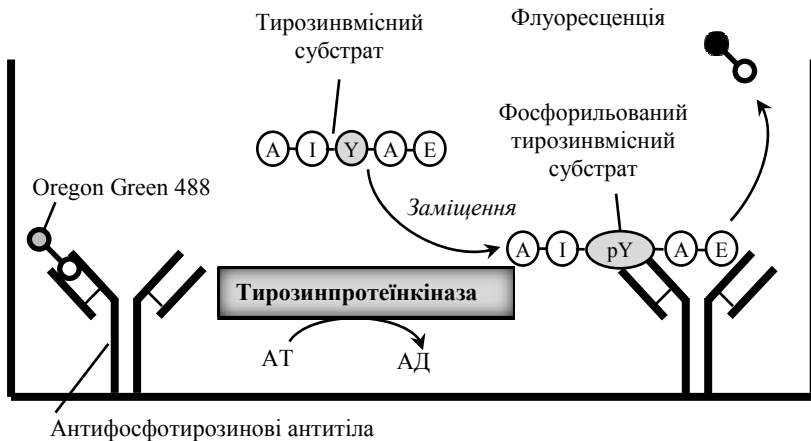


Рис. 6.55. Схема визначення активності тирозинпротеїнкінази методом Antibody Beacon™

Концентрацію кожного компоненту набору оптимізовано таким чином, щоб зменшити фонову флуоресценцію, досягти максимального заміщення ліганду в комплексі з антитілами за присутності фосфотирозиновмісних пептидів та значного посилення флуоресценції в результаті такого заміщення. Інтенсивність флуоресценції при цьому збільшується в 4 рази, а співвідношення сигнал-"шум" критично зменшується. Спектр збудження і випромінювання барвника Oregon Green 488 чітко зіставний з таким для флуоресцеїну, тому визначення можна проводити за допомогою будь-якого рідера для планшетів. Використання антитіл надає визначенню специфічності до фосфотирозиновмісних пептидів і запобігає впливові інших компонентів системи, таких як АТФ і відновні агенти (дитіотреїтол).

Значною перевагою методу Antibody Beacon™ перед ELISA є те, що він дозволяє спостерігати за змінами активності тирозинпротеїнкінази в реальному часі. Це досягається завдяки швидкій дисоціації комплексу антитіл з барвником і здатності компонентів одночасно утворювати комбінації. Цей метод придатний для вивчення ефективності інгібіторів тирозинпротеїнкінази.

6.5.1.4. Метод HTRF® KinEASE™

Метод HTRF® KinEASE™ використовують для визначення активності серин/треонінпротеїнкінази (107 Сер/Тре) і тирозинпротеїнкінази (58 Тир). Він поєднує в собі використання універсального пептидного субстрату для протеїнкіназ та моноклональних антитіл проти цих ферментів з HTRF-технологією (принцип викладено в підрозд. 1.6.4).

Постановка методу не потребує великої кількості ферменту, оскільки він є високочутливим. До того ж, метод дозволяє визначати широкий спектр концентрацій АТФ (до мікромолярних). Процедура визначення включає такі етапи (рис. 6.56).

Перший етап – кіназна реакція, для проведення якої зразок (джерело протеїнкінази) інкубують у кіназному буфері з пептидним субстратом для тирозинпротеїнкінази, кон'югованим з біотином. Реакцію ініціюють додаванням другого субстрату протеїнкінази (АТФ) та інкубують за температури 37 °С. Тирозинпротеїнкіназа фосфорилує пептидний субстрат.

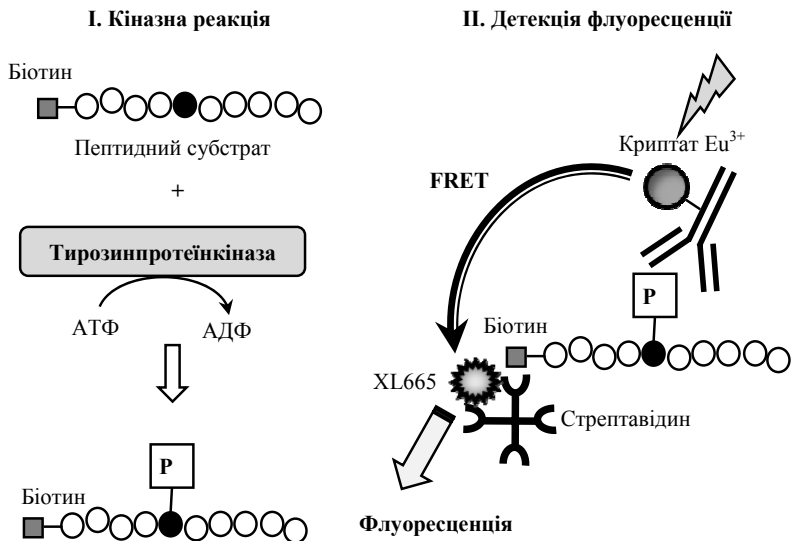


Рис. 6.56. Схема визначення активності тирозинпротеїнкінази методом HTRF

Другий етап – детекція сигналу, для чого додають кон'югати криптанту Eu^{3+} (HTRF-донор) з антитілами проти фосфорильованого пептидного субстрату тирозинпротеїнкінази і кон'югат XL665 (HTRF-акцептора) зі стрептавідином. У результаті утворюється комплекс: фосфорильований субстрат-біотин/стрептавідин – XL665 і виникає FRET. Після інкубації протягом 1 год реєструють інтенсивність флуоресценції. Величина сигналу TR-FRET пропорційна рівню фосфорильовання, тобто вмісту фосфорильованого за дії тирозинпротеїнкінази пептиду.

Описаний метод придатний не тільки для визначення тирозинпротеїнкінази, а також серин/треонінпротеїнкінази. Як субстрат для тирозинпротеїнкінази може використовуватися також олігопептид МСА-Глу-Асп-Ала-Глу-Тир(PO_3H_2)-Ала-Ала-Ліз(DNP)-Арг- NH_2 , що містить МСА (англ., 7-methoxycoumarin-4-acetic acid, укр. – 7-метоксикумарин-4-оцтова кислота) – полициклічний ароматичний вуглеводень (рис. 6.57).

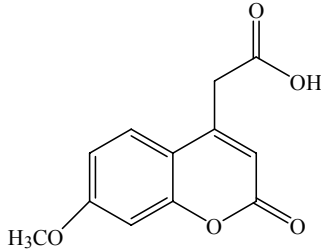


Рис. 6.57. Структурна формула 7-метоксикумарин-4-оцтової кислоти (МСА)

6.5.2. Визначення активності тирозинпротеїнфосфатази

Активність тирозинпротеїнфосфатази зазвичай вимірюють, використовуючи як специфічні субстрати пептиди, що містять фосфотирозин (Lorenz, 2011). Серед них поширеними є радіоактивні методи, у яких визначають кількість радіоактивно міченого ^{32}P , що вивільнюється із ^{32}P -мічених субстратів при розщепленні їх тирозинпротеїнфосфатазою. Інший метод визначення активності тирозинпротеїнфосфатази – колориметричний, у якому активність оцінюють за утворенням кольорової комплексної сполуки в реакції між малахітовим зеленим і фосфомолібдатом (рис. 6.58). Метод не є радіоактивним, проте він має низьку чутливість, а також присутність ендogenous фосфату в малоочищених зразках може негативно впливати на результат. Недоліком обох методів є те, що низька активність ферменту у клітинах може бути хибно визначена через вплив на вимірювання фонові радіоактивності зразка або фоновий поглинання. Крім того, радіоізотопний і колориметричний методи дозволяють проводити дискретні вимірювання – у певних часових точках. Тому вони погано придатні для кінетичних досліджень.

Більш ефективними є методи, які дозволяють реєструвати реакцію дефосфорилювання в реальному часі. Це можливо здійснити за допомогою флуорогенних субстратів. Використовується велика кількість штучних субстратів, таких як *p*-нітрофенілфосфат, флуоресцеїндифосфат, 6,8-дифлуоро-4-метилумбеліферил дифос-

фат (Montalibet, 2005). Оскільки такі субстрати є штучними, а не природними, вони мають низьку специфічність щодо тирозинпротеїнфосфатаз. Використання фосфотирозиновмісних пептидів як специфічних субстратів дозволяє безперервно контролювати реакцію дефосфорилування за збільшенням інтенсивності флуоресценції. Єдиним обмеженням цього методу є те, що білки у грубих ферментних препаратах або ті, що додають як ферментні стабілізатори, впливають на результат вимірювання.

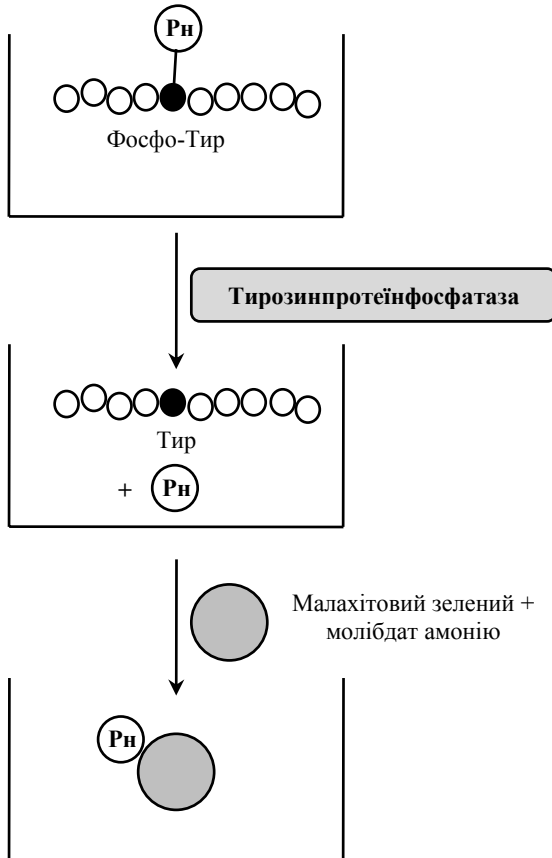


Рис. 6.58. Схема визначення активності тирозинпротеїнфосфатази колориметричним методом за допомогою малахітового зеленого з використанням субстратів – фосфопептидів

Високочутливим методом, сумісним із присутністю фосфатів і білків у зразку, є метод, що базується на флуоресцентно резонансному перенесенні енергії (FRET) і сполученій з ним ферментативній реакції. При цьому як субстрат для тирозинпротеїнфосфатази використовують фосфотирозиновмісний олігопептид.

6.5.2.1. Радіоізотопний метод

Застосування радіоактивно мічених субстратів, які містять ізотопи ^{32}P або ^{33}P , включені до складу фосфатних залишків фосфозину субстрату, є одним із найчутливіших методів визначення активності тирозинпротеїнфосфатази. Як субстрати використовують фосфопротеїни або фосфопептиди. При дефосфорилуванні їх тирозинпротеїнфосфатазою відщеплюється мічений залишок фосфорної кислоти, за звільненою радіоактивністю судять про активність ферменту.

Радіоактивно мічені субстрати отримують, фосфорилуючи білок чи пептид протеїнкіназою, такою як Src або Abl, у присутності $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Інкуючи ці субстрати з тирозинпротеїнфосфатазою, вимірюють вивільнення $^{32}\text{P}_n$ і за цим вмістом визначають фосфатазну активність. Зазвичай використовують фосфорильований за тирозином основний білок мієліну.

Цей метод є високочутливим, однак він потребує декілька етапів розділення (субстрат має бути відокремленим від утвореного продукту). Використання радіоізотопу потребує дотримання цілого ряду вимог. Мічений ^{32}P субстрат зберігається обмежений період часу (період напіврозпаду такого ізотопу становить два тижні). Його використання є небезпечним, тому при роботі з ним необхідні певні запобіжні заходи.

6.5.2.2. Колориметричний метод з малахітовим зеленим

Цей метод дозволяє визначити активність тирозинпротеїнфосфатази, не використовуючи радіоактивно мічені сполуки, і є швидким та зручним. Визначають вміст вільного фосфату, який

відщеплюється від молекули білкового чи пептидного субстрату за дії даного ферменту. Для цього використовують барвник малахітовий зелений, який формує комплекс моблідат-малахітовий зелений-фосфат. Вимірюючи оптичну густину, яка відповідає поглинанню цього комплексу за довжини хвилі 620 нм, судять про вміст неорганічного фосфату, і, відповідно, про активність тирозинпротеїнфосфаз.

Визначення проводять у мікроцентрифужних пробірках чи в мікропланшетах на 96 лунок, вимірюючи оптичну густину на рідері для мікропланшетів (рис. 6.59). Проводять реакцію ферментативного відщеплення фосфатного залишку від субстрату, зупиняють реакцію додаванням молібдату у спеціальній суміші, додають малахітовий зелений та інкубують за кімнатної температури. Після додавання сірчаної кислоти інкубують протягом 1 год та вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 620 нм. Уміст неорганічного фосфату визначають за стандартною кривою, яку отримують, проводячи всі вищевказані операції з різними концентраціями розчину фосфату. Метод дозволяє вимірювати концентрацію фосфату в межах 200–4000 пмоль, проте він є менш чутливим порівняно з радіоактивним методом.

Для підвищення специфічності методу використовують не грубий клітинний екстракт, а проводять часткове очищення тирозинпротеїнфосфаз на колонці з Sephadex G-25.

У колориметричних методиках на основі малахітового зеленого використовується цілий ряд природно фосфорильованих субстратів тирозинпротеїнфосфаз або синтетичних фосфопептидів (рис. 6.58). Наприклад, хімічно синтезовані пептиди END(pY)INASL і DADE(pY)LIPQQG є субстратами для багатьох тирозинпротеїнфосфаз. Якщо як субстрат використовується фосфопептид, спочатку проводять імунопреципітацію ферменту з біологічного зразка за допомогою гранул протеїн А- або протеїн G-Sepharose. Білковими субстратами тирозинпротеїнфосфаз є гістон або казеїн.

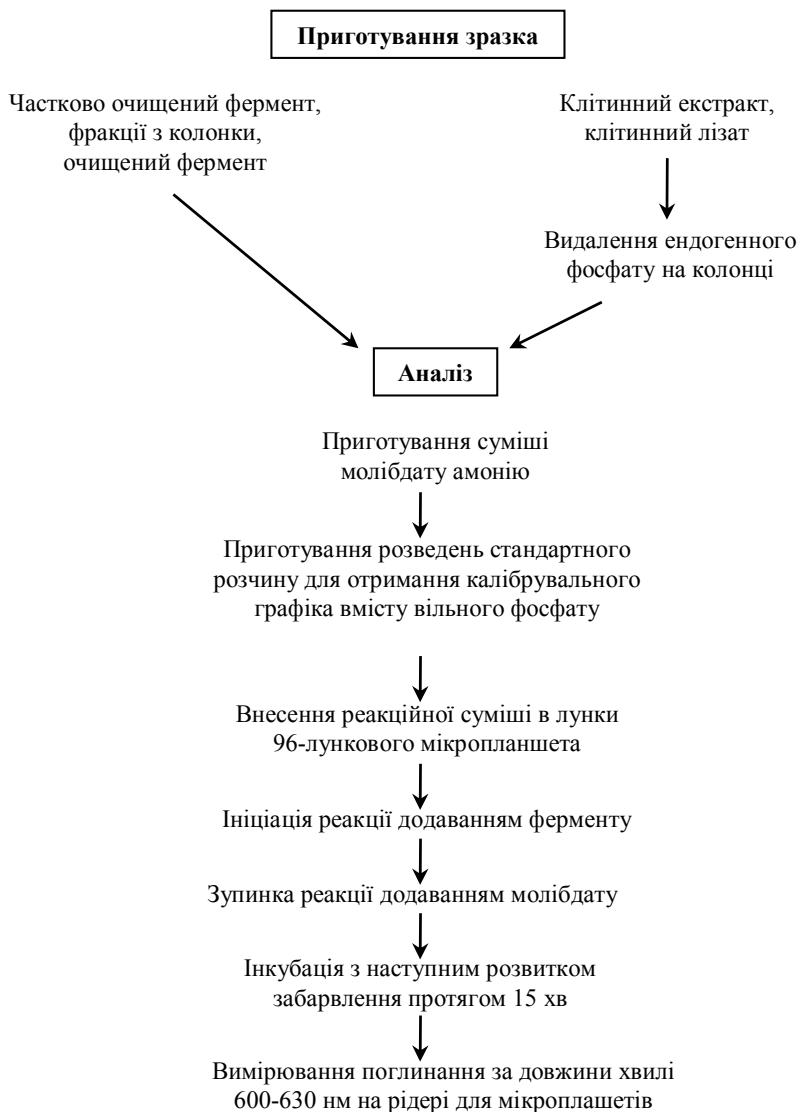


Рис. 6.59. Етапи визначення активності тирозинпротейнфосфатази клориметричним методом за допомогою малахітового зеленого

6.5.2.3. Колориметричний метод з паранітрофенілфосфатом

Паранітрофенілфосфат (pNPP) використовується як неспецифічний небілковоподібний субстрат для протеїнтирозинфосфатази. Метод з його використанням є більш дешевим, але менш специфічним. pNPP є хромогенним субстратом для багатьох фосфатаз (лужні та кислі фосфатази, протеїнтирозинфосфатаза, серин/треонінфосфатази). При його розщепленні при 37 °С утворюється паранітрофенол – забарвлений розчинний продукт жовтого кольору, вміст якого визначають, вимірюючи в лужному середовищі поглинання за довжини хвилі 405 нм (рис. 6.60). За вмістом вивільненого паранітрофенолу судять про активність протеїнтирозинфосфатази (Lorenz, 2011).

Оскільки pNPP є неспецифічним субстратом, при визначенні активності ферменту у грубих клітинних екстрактах спочатку проводять імунопреципітацію. Отриманий імунопреципітат ресуспендують у буфері й визначають активність протеїнтирозинфосфатази.

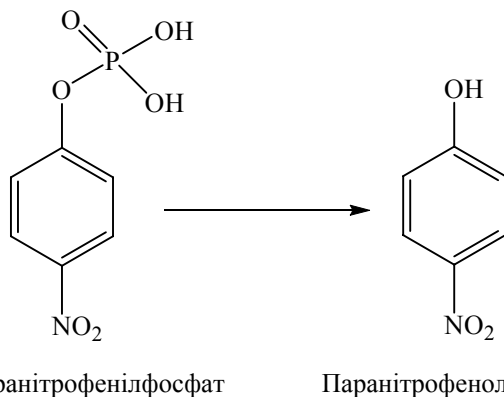


Рис. 6.60. Реакція розщеплення паранітрофенілфосфату за дії фосфатази

Метод простий у виконанні, гомогенний (оскільки додають лише один реагент, після чого вимірюють поглинання на рідері). Реакцію можна проводити в кюветах, пробірках чи лунках мікропланшетів для ELISA.

Метод визначення активності тирозинпротеїнфосфатази з використанням rNPP використовується у багатьох напрямках. Наприклад, з його допомогою вимірюють активність ферменту в біологічних зразках у наукових дослідженнях та при клінічній діагностиці різних захворювань (зокрема, печінки, кісткового мозку, при гіперпаратиреоїдизмі та бактеріальних інфекціях). Також він придатний для проведення високопродуктивного скринінгу (HTS) інгібіторів протеїн-тирозинфосфатази.

6.5.2.4. Метод ProFluor®

Активність тирозинпротеїнфосфатази можна визначати з використанням синтетичних флуорогенних субстратів, при гідролізі арилфосфатного зв'язку яких утворюється флуоресцентний продукт. До таких субстратів належать флуоресцеїндифосфат, 6,8-дифлуоро-4-метилумбеліферилфосфат тощо.

Метод ProFluor® вимірює активність очищеної тирозинпротеїнфосфатази в гомогенному форматі й базується на розщепленні фосфорильованого пептидного субстрату, міченого бісамідродаміном 110. Спочатку проводять фосфатазну реакцію, під час якої дефосфорильовується субстрат, мічений бісамідродаміном 110 (рис. 6.61). Після цього зупиняють реакцію, додаючи протеазний реагент, який послідовно видаляє амінокислотні залишки від нефосфорильованого субстрату, унаслідок чого вивільнюється високофлуоресцентний родамін 110. Фосфорильований субстрат стійкий до дії протеазного реагенту й залишається нефлуоресцентним. Вимірюють інтенсивність флуоресценції, яка прямо пропорційна фосфатазній активності.

Реакції проводять у лунках мікропланшета, що дозволяє проводити високопродуктивний скринінг (HTS) інгібіторів тирозинпротеїнфосфатази.

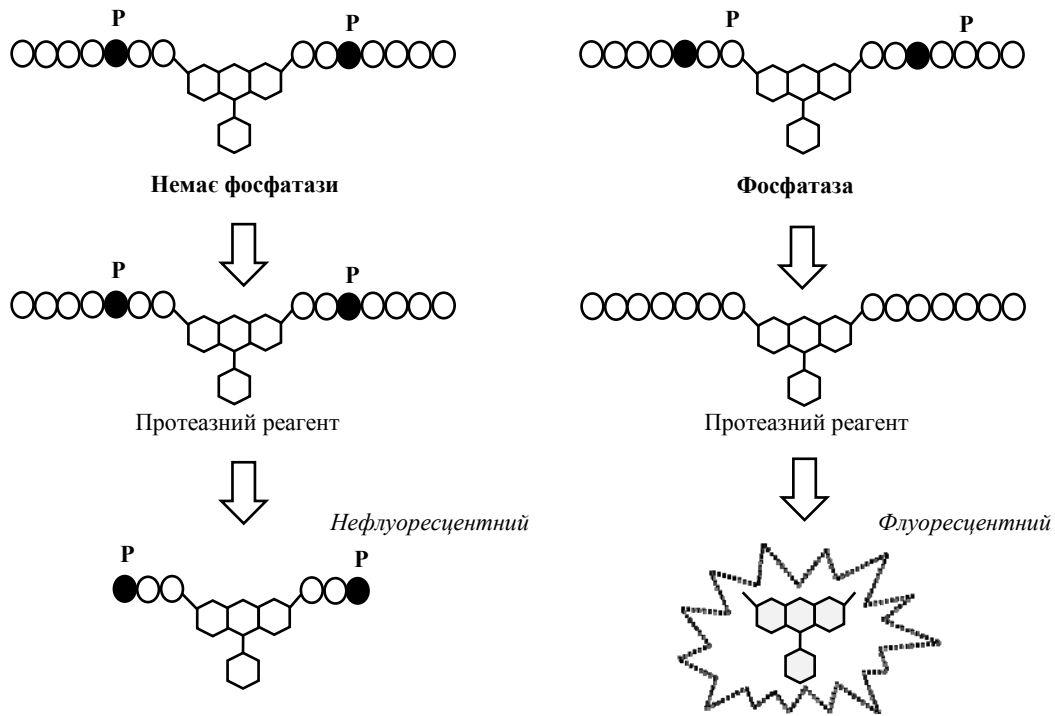


Рис. 6.61. Схема визначення активності тирозинпротеїнфосфатази флуоресцентним методом ProFluor®

6.5.2.5. Метод HTRF (TR-FRET)

Цей метод базується на явищі флуоресцентно-резонансного перенесення енергії (принцип було описано в підрозд. 1.6.5). Він має значну перевагу перед іншими методами визначення активності тирозинпротеїнфосфатази. Радіоізотопні та колориметричні методи дозволяють визначати активність ферменту тільки у фіксовані проміжки часу й непридатні для вимірювань у реальному часі. Тому вони неефективні для кінетичних досліджень. Крім того, вони нездатні зафіксувати дуже низьку ферментативну активність, оскільки фонова радіоактивність або фонове поглинання достатньо високі. На відміну від цих методів, метод FRET дозволяє спостерігати за перебігом реакції дефосфорилування у реальному часі.

Як FRET-донор використовується фосфотирозиновмісний олігопептидний субстрат Мса-Глу-Асп-Ала-Глу-Тир(PO₃H₂)-Ala-Ala-Lys(DNP)-Arg-NH₂, у якому донором є 7-метоксикумаил-4-іл)ацетильна група (англ., 7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl, Мса), а FRET-акцептором є 2,4-динітрофенол (англ., 2,4-dinitrophenol, DNP), які оточують залишок фосфотирозину (Nishikata, 1999). У молекулі субстрату донор і акцептор перебувають на близькій відстані один від одного, тому між ними виникає резонансне перенесення енергії (FRET). Під час виникнення FRET флуоресценція Мса-групи ефективно гаситься DNP-групою.

Розчин тирозинпротеїнфосфатази додають до буферного розчину, що містить FRET-субстрат Мса та хімотрипсин. Хоча реакція дефосфорилування субстрату практично не змінює флуоресценцію, каталізоване ферментом дефосфорилування субстрату Мса й наступне розщеплення дефосфорильованого субстрату хімотрипсином приводить до віддалення FRET-донора (Мса) і FRET-акцептора один від одного. При цьому FRET переривається, а флуоресценція Мса посилюється. Хімотрипсин було обрано, оскільки ця протеаза розщеплює пептидний зв'язок, утворений тирозином, і не діє на зв'язок, утворений фосфотирозином.

Така система дозволяє вимірювати активність тирозинпротеїнфосфатази в реальному часі. Ступінь посилення флуоресценції

чітко відображає ступінь дефосфорилювання субстрату за відповідних концентрацій хімотрипсину. За допомогою такого методу стало можливим вимірювати активність ферменту у грубих препаратах, де вона є дуже низькою. Чутливість методу FRET зіставна з такою для радіоізотопного методу.

6.6. ВИВЧЕННЯ СИГНАЛЬНОГО ШЛЯХУ МАРК/ERK

6.6.1. Визначення активності МАР-кіназ

МАР-кінази – протеїнкінази, специфічні до залишків серину, треоніну і тирозину. Вони беруть участь у регуляції клітинної відповіді на різні стимули, такі як міогени, осмотичний стрес, тепловий шок та прозапальні цитокіни. Вони регулюють численні клітинні функції, включаючи клітинну проліферацію, генну експресію, мітоз, виживання клітин та апоптоз. Сьогодні для визначення активності МАР-кінази широко застосовують нерадіоактивні методи: метод Western-блотингу та ELISA. Також використовують метод AlphaScreen.

6.6.1.1. Метод Western-блотингу

Метод визначення активності МАР-кіназ (МАРК) є аналогічним до методу вимірювання Akt-кінази. Він також базується на імунопреципітації ферменту та визначення фосфорилювання білкового субстрату Western-блотингом. Використовуючи специфічні антитіла, можна оцінити у клітинних екстрактах активність різних форм МАРК

Для визначення р44/42 форми МАРК використовуються іммобілізовані на гранулах сефарози моноклональні антитіла проти фосфорилюваної форми цього білка (фосфо-р44/42 МАРК), які зв'язуються із залишком Трп202/Тир204. Ці антитіла додають до клітинного лізату та інкубують протягом ночі за температури +4 °С. З їхньою допомогою здійснюють імунопреципітацію активної форми МАРК із клітинного екстракту, оскільки

вказані амінокислотні залишки містяться в активаційній петлі МАРК і підлягають фосфорилуванню за участю ферментів МЕК1 (активує р44 форму МАРК) і МЕК2 (активує р42 форму МАРК). Перевагою методу є можливість проведення сайт-специфічного аналізу активності ферменту, оскільки використовуються фосфоспецифічні антитіла.

На наступному етапі визначають кіназну активність *in vitro*. Як субстрат використовують білок Elk-1, який активна МАРК фосфорилує за залишком Сер383 за участю АТФ. Реакцію зупиняють додаванням SDS, зразки нагрівають до температури 95–100 °С, після чого їх завантажують на поліакриламідний гель і проводять електрофорез. Далі методом Western-блотингу установлюють ступінь фосфорилування субстрату Elk-1. Для цього використовують антифосфо-Elk антитіла, які зв'язуються із залишками Сер383 цього білка. Фосфорильований Elk-продукт кіназної реакції інкубують з цими антитілами, після відмивання інкубують антивидовими антитілами (IgG), кон'югованими з пероксидазою хрому. Після відмивання додають пероксид водню (субстрат для пероксидази) і хемілюмінесцентний субстрат LumiGLO® (похідна люмінолу), який окиснюється і випромінює світло. Перевагою такого субстрату є те, що він дозволяє аналізувати кількість білка в межах фентограмів. Блотограму аналізують методом хемілюмінесцентної детекції та обчислюють активність ферменту.

Як позитивний контроль беруть біотинільований білок (фосфор44/42 МАРК) та антибіотинові антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому. Ступінь фосфорилування субстрату Elk порівнюють з негативним контролем, що не містить цього білка і з яким проводять усі операції, як і з дослідними пробами. Описаний метод має високу чутливість і забезпечує потужне посилення сигналу.

6.6.1.2. Метод ELISA

Для визначення р38 МАРК методом ELISA використовують антитіла (Phospho-p38 МАРК), іммобілізовані на гранулах сефарози. Антитіла утворюють імунопреципітат з р38 МАРК, після чого *in vitro* проводять кіназну реакцію, використовуючи білок ATF-2 як субстрат. Фосфорилування ATF-2 визначають Western-блотингом

за допомогою первинних Phospho-ATF-2 (Thr71) антитіл і вторинних антитіл (IgG), кон'югованих з пероксидазою хрому.

Розроблено метод визначення активності MAP-кінази (ERK1/2), який базується на колориметричному ІФА (рис. 6.62). Реакцію проводять у мікропланшетах для ELISA. Як субстрат для MAP-кінази використовують біотинільований субстрат MBP, котрий містить множинні сайти фосфорилування і може бути фосфорильований багатьма протеїнкіназами. Дана форма MAP-кінази фосфорилує його за залишком Trp97.

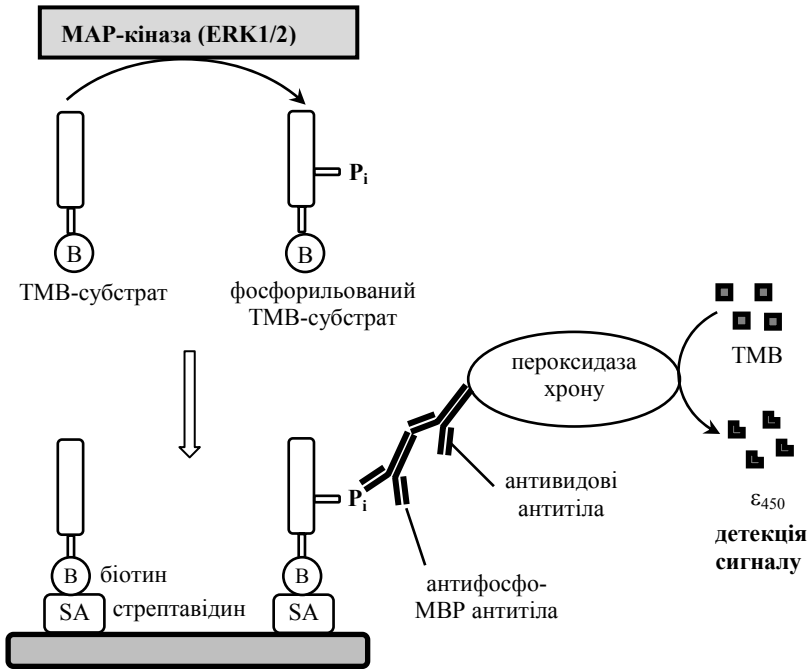


Рис. 6.62. Схема визначення активності MAP-кінази (ERK1/2) методом колориметричного ІФА

При постановці експерименту спочатку проводять імунопреципітацію MAP-кінази із лізату клітин за допомогою анти-MAP-кіназних антитіл. Утворений імунний комплекс інкубують із гранулами сорбенту – протеїн А чи G агарози. Сорбовані на гранулах комплекси MAP-кінази з антитілами відокремлюють

центрифугуванням і проводять кіназну реакцію (kinase assay). Для цього додають біотинільований МВР-субстрат для MAP-кінази та АТФ, за дії ферменту МВР фосфорильється. Реакцію зупиняють додаванням інгібітору. Після цього фосфорильований і нефосфорильований субстрати вносять у лунки мікроплашета, на якому іммобілізовано стрептавідин. Стрептавідин зв'язує біотин, фракцію фосфорильованого МВР-субстрату виявляють методом колориметричного ІФА за допомогою антифосфо-МВР моноклональних антитіл (первинні антитіла). До них додають вторинні (антивидові) антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому. Як хромогенний субстрат для пероксидази використовують ТМВ (див. підрозд. 6.1.2), який утворює жовте забарвлення. Через 5–15 хв інкубації ферментативну реакцію зупиняють додаванням стоп-реагенту та вимірюють поглинання за довжини хвилі 450 нм. Для розрахунку активності MAP-кінази отримані значення порівнюють зі значеннями активності стандартів, наприклад, очищених MAP-кіназ ERK1 або ERK2.

Для цього будують графік залежності оптичної густини від кількості ферменту-стандарту (в одиницях).

6.6.2. Визначення активності MEK1-кінази

MEK-кіназа (також називається кіназою MAP-кінази) є компонентом сигнального шляху MAPK/ERK, який активується рецепторами, спряженими з G-білками. Біля їхньої цитоплазматичної частини збирається сигнальний комплекс білків, які активують ГТФазу Ras. Остання зв'язує й активує кіназу кінази MAP-кіназу (MAPK/ERK) – MEKK-кіназу. MEKK-кіназа фосфорилує та активує MAPK/ERK, яка представлена двома компонентами MEK1 і MEK2. MEK1/2 активує ERK1/2.

MEK-кіназа є унікальною кіназою, вона має дуже вузьку субстратну специфічність – фосфорилує тільки MAP-кіназу за залишками тероніну чи тирозину, які знаходяться у Трп-Глу-Тир мотиві MAP-кінази. Ізоформа глутатіон-S-трансферази (GST) інгібує сигналізацію в MAP-кіназному каскаді, який регулює клітинну проліферацію та загибель.

Активність MEK1-кінази визначають радіоактивним методом в імунопреципітатах і фракціях, отриманих із колонки під час хро-

матографії, тому що у грубих клітинних екстрактах детергенти й компоненти буфера для лізису клітин можуть інгібувати активність MEK1- і MEK2-кіназ. Імунопреципітацію MEK1-кінази здійснюють за допомогою анти-MEK1 антитіл і протеїну А агарози (принцип імунопреципітації описано в підрозд. 6.1.1).

MEK-кіназу можна фосфорилювати *in vitro* декількома протеїнкіназами, наприклад, протеїнкіназами С, р34cdc2 та самою MAP-кіназою. Активність MEK-кінази виявляють *in vitro* за фосфорилуванням неактивної MAP-кінази або за активацією MAP-кінази, спряженою з фосфорилуванням основного білка мієліну (англ., myelin basic protein, МВР), що використовується як субстрат для MAP кінази. Оскільки багато кіназ здатні фосфорилювати MEK-кіназу, при визначенні її активності застосовують активатори цього ферменту, за дії яких і проводять вимірювання.

Для проведення каскаду кіназних реакцій *in vitro* використовують MAPK-GST. Вона являє собою рекомбінантну мишину р42 ізоформу MAP-кінази, яка з'єднана на N-кінці з GST і на С-кінці з 62 kDa білком (fusion protein). Її експресують у *E. coli* та очищають методом хроматографії на глутатіон-Sephарозе (>90% ступінь очищення). MAPK-GST упізнає і фосфорилує послідовність Про-X-(Сер/Трп)-Про і здатна фосфорилувати такі білки, як р90_{rsk}, р70 S6 kinase, р74_{raf1}, рецептор епідермального фактора росту, Мус і Jun.

Каскад кіназних реакцій починається з того, що рекомбінантна MEK1 людини фосфорилує та активує рекомбінантну MAPK-GST. Активована MAPK-GST, у свою чергу, фосфорилує специфічний субстрат – МВР.

Неактивна MAP-кіназа 2 + АТФ $\xrightarrow{\text{активована MEK1, Mg}^{2+}, 30\text{ }^{\circ}\text{C}, 30\text{ хв}}$ активна MAP-кіназа 2 + АДФ.

МВР + [γ -³²Р]АТФ $\xrightarrow{\text{активна MAP кіназа 2, Mg}^{2+}, 30\text{ }^{\circ}\text{C}, 10\text{ хв}}$ [γ -³²Р] МВР + АДФ.

Як другий субстрат для MAPK-GST використовують радіоактивно мічений [γ -³²Р]АТФ і немічений АТФ. У результаті реакції утворюються дві форми фосфорильованого МВР: мічений за [γ -³²Р] та немічений. Фосфорильований мічений за [γ -³²Р]

МВР відокремлюють шляхом диференційного зв'язування з P81 фосфоцелюлозним папером, попередньо відмитим у фосфорній кислоті. Після цього вимірюють радіоактивність у сцинтиляційній рідині. Отримана крива залежності активності ферменту від концентрації АТФ буде лінійна, якщо під час реакції до білкового субстрату включено не більше 20% від усього АТФ у пробі й час інкубації не перевищує 30 хв. Описаний метод швидким, зручний і є достатньо специфічним до МЕК1.

6.7. ВИВЧЕННЯ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ

6.7.1. Визначення активності синтази оксида азоту

Синтази оксиду азоту (англ., nitric oxide synthases, NOSs) є родиною ферментів, що каталізують утворення оксиду азоту з L-аргініну. Існують три ізоформи NO-синтаз: регульовані кальцій/кальмодуліном ендотеліальна eNOS (англ., endothelial NOS) і нейрональна nNOS (англ., neuronal NOS), а також індукцибельна iNOS, яка залучена до імунної відповіді. iNOS та nNOS розчинні й зазвичай містяться у цитозолі, тоді як eNOS асоційована з мембраною. У ссавців ендотеліальна ізоформа залучена до регуляції тонуусу судин, секреції інсуліну, функції серця та ангіогенезу. NO активує гуанілатциклазу, яка індукує розслаблення гладеньких м'язів. Нейрональна ізоформа бере участь у регуляції розвитку нервової системи, процесах довготривалої потенціації та в механізмах навчання і пам'яті. Індукцибельна форма iNOS утворює NO, що бере участь в імунній відповіді на інфекцію, пухлинний ріст, а також у розвитку аутоімунних захворювань.

Активність NO-синтази визначають різними методами. Серед них найчутливішим є радіоактивний метод, який дозволяє детектувати сполуки на пікомольному рівні.

6.7.1.1. Радіоактивний метод

Методи визначення активності NO-синтази базуються на реакції перетворення L-аргініну на L-цитрулін за дії ферменту, під час якої окиснюється атом азоту гуанідинової групи аргініну (рис. 6.63). Для реакції також необхідні 1,5 еквіваленти НАДФН, молекулярний кисень, кальцій і кальмодулін.

В описуваному методі використовується радіоактивно мічені субстрати. Мічений [^3H]аргінін або [^{14}C]аргінін додають до клітинного екстракту чи до очищеної NO-синтази, вносять НАДФН, хлорид кальцію та реакційний буфер.

Суміш поміщують у мікроцентрифужні пробірки й додають кальмодулін. Після інкубації реакцію зупиняють буфером, що містить ЕДТА, який хелатує іони кальцію, необхідні для роботи ферменту, і, відповідно, інактивує його. Потім до зразка додають аргінінзв'язувальну смолу, суміш вносять у ємності зі сцинтиляційною рідиною, які обертаються. Проби центрифугують, утворений під час реакції цитрулін, нейтральний при рН 5,5, надходить в елюат. Його вносять у розчин із сцинтиляційною рідиною і вимірюють радіоактивність на сцинтиляційному лічильнику.

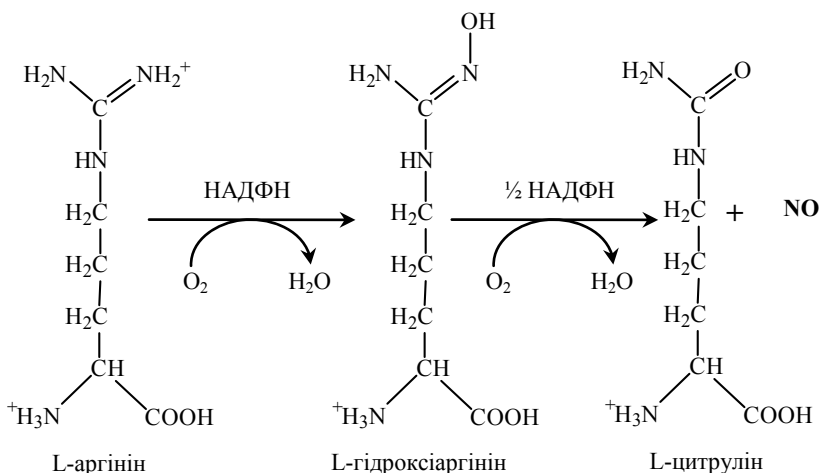


Рис. 6.63. Реакція утворення оксиду азоту під впливом NO-синтази

Перевагою методу є його специфічність завдяки використанню специфічного субстрату аргініну. Нейтрально заряджений цитрулін легко відокремити від позитивно зарядженого аргініну. Тому визначення активності NO-синтази можна проводити як у грубому екстракті, так і для очищеного ферменту. Метод має високу чутливість (порядку пікомолів). Недоліками є висока вартість та потреба у відповідному обладнанні при роботі з радіоактивно міченими сполуками.

6.7.1.2. Ферментативний метод

Метод базується на колориметричному визначенні накопичення стабільних продуктів аеробного окиснення оксиду азоту, який генерується внаслідок роботи ферменту (рис. 6.63).

Реакційна суміш містить аргінін і НАДФН + H^+ та біологічний зразок. Реакцію запускають внесенням біологічного зразка, інкубують при 37 °С. Зупиняють реакцію внесенням розчину азиду натрію і визначають уміст продуктів аеробного окиснення оксиду азоту. Визначення проводять наступним чином. Вносять розчину сульфанілової кислоти у 5% розчин фосфорної кислоти. Залишають на 7 хв у темному місці за кімнатної температури. Додають водний розчин α -нафтилетилендіаміну, перемішують, залишають у темному місці за кімнатної температури й вимірюють екстинкцію на спектрофотометрі за довжини хвилі 539 нм.

6.7.1.3. Флуориметричний метод

Оскільки NO швидко перетворюється у клітині на нітрит-іони (NO^{2-}) та нітрат-іони (NO^{3-}), їхня концентрація дозволяє оцінити продукцію NO. Флуориметричний метод ефективний для визначення концентрації нітрат- та нітрит-іонів і, відповідно, активності NO-синтази.

Визначення здійснюють у два етапи (рис. 6.64). На першому етапі нітрат перетворюється на нітрит під впливом нітратредуктази. На другому етапі нітрит реагує з флуоресцентним барвником DAN (англ., 2,3-diaminonaphthalene, укр. 2,3-діамінонафталін), який випромінює світло (рис. 6.65). Довжини хвиль збудження (Ex) і випромінювання (Em) становлять відповідно 380 та 461 нм.

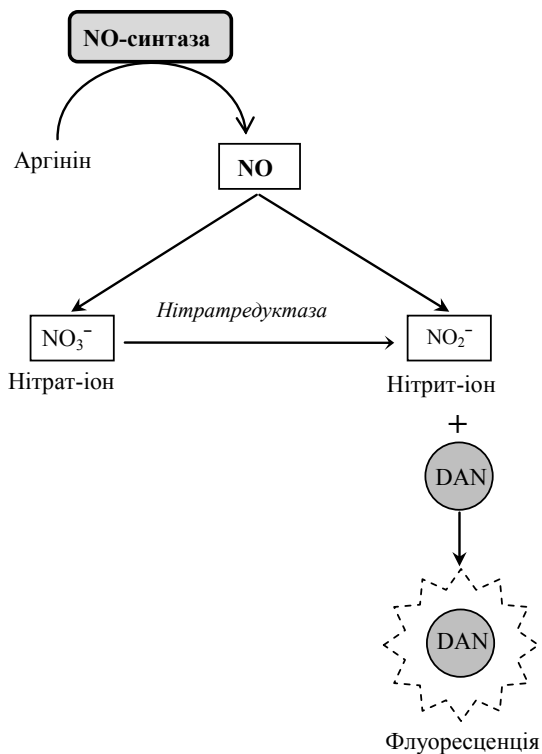


Рис. 6.64. Принцип флуориметричного методу визначення вмісту нітрит-іонів та активності NO-синтази

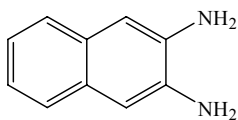


Рис. 6.65. Структура формула флуоресцентного барвника 2,3-діамінонафталіну (DAN)

Додавання NaOH посилює вихід флуоресценції. Інтенсивність флуоресценції пропорційна тотальній концентрації утвореного NO. Цим методом можна вимірювати концентрацію NO у культуральному середовищі, плазмі крові та гомогенатах тканин. Визначення проводять у мікропланшетах, завдяки чому можна проаналізувати велику кількість зразків.

6.7.2. Визначення оксиду азоту

Оксид азоту (NO) є важливим вторинним посередником. Він відіграє вагомую роль у нейропередачі, регуляції тонуусу судин, імунній відповіді та апоптозі. NO вивільнюється із нейтрофілів та активованих макрофагів і забезпечує їхню цитотоксичність, він також активує фермент гуанілатциклазу.

У клітині NO швидко окиснюється до нітрит- та нітрат-іонів, за вмістом цих стабільних метаболітів можна оцінити його продукцію. Одним із найпростіших методів визначення концентрації у зразку є колориметричний метод Грісса. Новий метод OxiSelect™ дає можливість установити вміст NO у клітинах з використанням флуоресцентного барвника.

6.7.2.1. Колориметричний метод

Колориметричний метод дозволяє визначити концентрацію тотальних нітратів і нітритів у клітині. Він є зручним у виконанні й виконується у два етапи. Спочатку нітрат перетворюють на нітрит за дії нітратредуктази. Потім нітрит за допомогою реактиву Грісса, що містить сульфаніламід і нафтилметилендіамін, перетворюють на густо-червоний азохромофор. Його вміст відображає вміст оксиду азоту у зразку. Цим методом можна визначити 10–100 мкМ концентрації NO₂.

До гомогенату тканини або клітинного екстракту додають сульфанілову кислоту в розчині фосфорної кислоти. Інкують у темному місці за кімнатної температури. Додають α-нафтилетилендіамін та інкують у темному місці за тієї самої температури. Після цього вимірюють екстинкцію на спектрофотометрі за довжини хвилі 539 нм. Уміст NO₂⁻ визначають за калібрувальним графіком, який будують при використанні різних концентрацій стандартів NO₂ та NO₃.

6.7.2.2. Метод OxiSelect™

Метод OxiSelect™ належить до категорії cell-based assay (дослідження у клітинах), оскільки дає можливість швидко визначити внутрішньоклітинний вміст NO та активність NO-синтази саме у клітинах, на відміну від плазми крові чи гомогенату тка-

нини. Клітини обробляють NO-зондом, який легко проникає в них шляхом дифузії (рис. 6.66). Там він деацетилюється під впливом клітинних естераз з утворенням нефлуоресцентного інтермедиату. Коли ендогенний (внутрішньоклітинний) оксид азоту зустрічається з цим інтермедиатом, останній швидко перетворюється на триазолофлуоресцеїновий аналог, здатний до потужної флуоресценції, інтенсивність якої пропорційна рівню NO у цитозолі клітини, поріг визначення становить ~ 3 нМ.

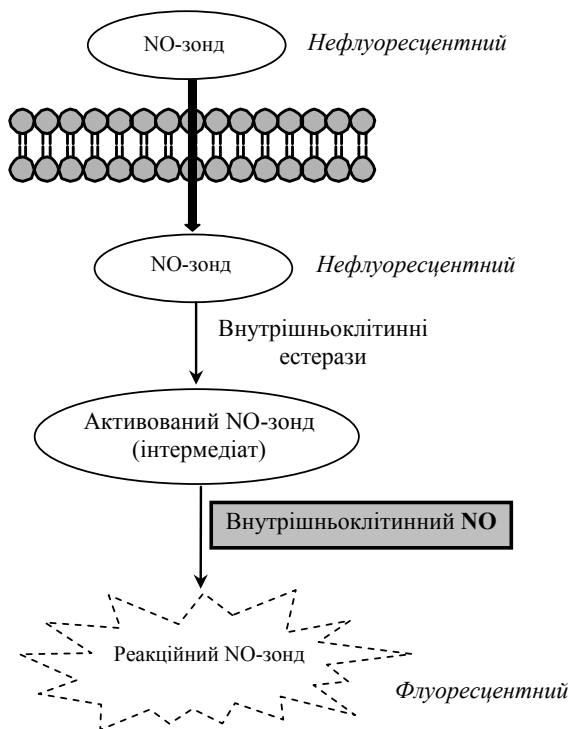


Рис. 6.66. Принцип методу OxiSelect™ для визначення вмісту NO та активності NO-синтази

Використаний барвник є специфічним, фото- та рН-стабільним, вимірювання можна проводити з використанням стандартних флуоресцеїнових фільтрів.

6.8. ВИВЧЕННЯ СИСТЕМ ТРАНСДУКЦІЇ СИГНАЛУ ЦИТОКІНІВ

6.8.1. Визначення TNF- α

6.8.1.1. Метод ELISA

Цей метод є найуживанішим, він дозволяє визначити вміст цитокіну в сироватці крові, у плазмі, обробленій ЕДТА, та супернатантах клітинних культур. На пластику мікропланшета іммобілізують антикролячі анти-TNF- α антитіла, до них додають стандарт TNF- α і зразок (у якому визначають TNF- α). Після відмивання мікропланшета інкубують за температури 20–25 °С протягом 1 год. При цьому TNF- α зразка конкурує із стандартом за зв'язування зі специфічними анти-TNF- α антитілами. Для посилення сигналу використовують систему біотин-стрептавідин, для чого у лунки додають вторинні біотинільовані антитіла, а після інкубації – стрептавідин, кон'югований з пероксидазою хрому. Відмивають та інкубують за кімнатної температури, після чого відмивають і залишають планшет у тих самих умовах. Далі додають субстрат ТМВ, при розщепленні якого за дії ферменту розвивається забарвлення. Зупиняють реакцію додаванням 1% сірчаної кислоти. Інтенсивність забарвлення вимірюють за довжини хвилі 450 нм, від його значення віднімають такий же показник, виміряний за довжини хвилі 500 нм. Для обчислення вмісту TNF- α у зразку будують стандартну криву, яка являє собою залежність оптичної густини розчину від концентрації стандарту TNF- α (пг/мл).

Описаний метод є високочутливим, його поріг визначення становить 15 пг/мл, він дозволяє проводити вимірювання у межах 31–2500 пг/мл.

6.8.1.2. Метод HTRF (TR-FRET)

Новим високочутливим методом визначення TNF- α у біологічних зразках є "сендвіч"-метод TR-FRET (HTRF), який базується на явищі FRET (принцип цього методу викладено в підрозд. 1.6.4). У ньому використовують два типи моноклональних

антитіл проти TNF- α , які впізнають його різні епітопи. Одні антитіла мітять HTRF-донором (криплатом Eu^{3+}), другі – HTRF-акцептором (поперечно зшитим алофікоціаніном XL665). Якщо TNF- α присутній у зразку, обидва типи моноклональних антитіл зв'язуються з ним, у результаті вони опиняються у безпосередній близькості один від одного й виникає FRET (рис. 6.67).

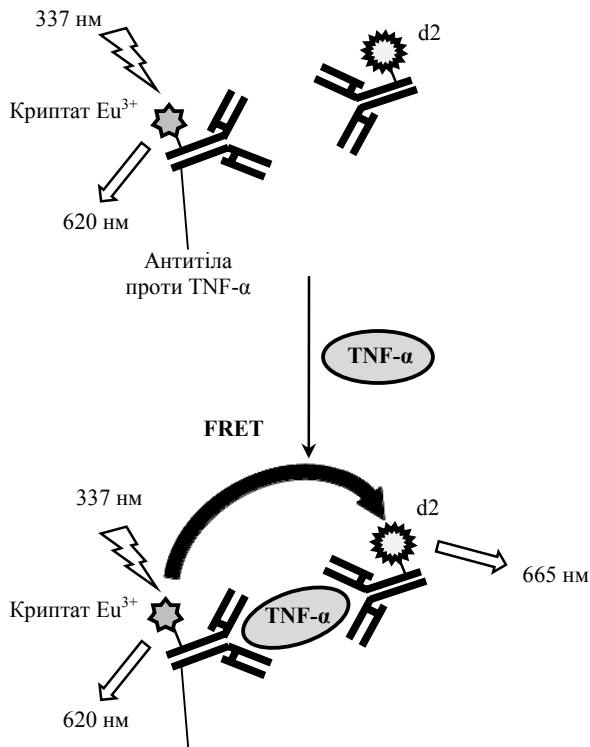


Рис. 6.67. Схема визначення концентрації TNF- α "сендвіч"-методом TR-FRET (HTRF)

Енергія збудження від кон'югату криптату Eu^{3+} переноситься на кон'югат XL665. При збільшенні концентрації TNF- α у зразку утворюється більша кількість донорно-акцепторних пар, і сигнал FRET посилюється. Це виявляється в посиленні флуоресценції за довжини хвилі 665 нм. Між інтенсивністю сигналу FRET і концентрацією TNF- α існує лінійна залежність.

6.8.2. Визначення фосфорилування JAK-STAT

6.8.2.1. Метод phosphoELISA™

Як відомо, фосфорилування цитоплазматичних доменів рецепторів цитокінів JAK-кіназами рекрутує білки STAT (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b і 6), які у свою чергу фосфорилуються, димеризуються і транслокуються в ядро. Залежно від типу клітин білки STAT індують транскрипцію різних генів. Дослідження механізмів дії цих білків ще й досі актуальні, тому розробляються і вдосконалюються методи визначення їхнього рівня та активності. Оскільки активність STAT залежить від ступеня фосфорилування, було створено метод визначення рівня саме їхніх фосфорильованих форм.

Системи BioSource™ phosphoELISA™ специфічно вимірюють рівень загальною й сайт-специфічного фосфорилування білків STAT у клітинних лізатах. Визначення базується на конкурентному ІФА. Клітинні лізати інкубують з іммобілізованими на гранулах мікропланшета антитілами проти STAT. Позитивним контролем є рекомбінантні антитіла проти відповідної форми STAT, яку визначають, негативним – гранули з іммобілізованими на них IgG. Такі системи розроблені для визначення STAT1, STAT3, STAT5a, STAT6.

Метод високоспецифічний і високочутливий (чутливість удвічі більша, ніж у Western-блотингу). Його результати узгоджуються з даними Western-блотингу: чим більший рівень фосфорильованих форм STAT у зразку, визначений методом phosphoELISA™ (більша оптична густина розчину), тим інтенсивнішими є смуги на блотограмі.

6.8.2.2. Метод "сендвіч"-ELISA

Рівень білків STAT у клітинах людини визначають також методом "сендвіч"-ELISA. Наприклад, рівень STAT6, фосфорильованого за Tyr641, вимірюють за допомогою системи PathScan®-Phospho-STAT6 (Tyr641)-Sandwich ELISA. Мишині моноклональні антитіла проти STAT6 фіксують на лунках мікропланшета і проводять імунопреципітацію досліджуваного білка зі зразка. Після інкубації клітинного лізату фосфорильована і нефосфорильована форми STAT6 зв'язується із цими антитілами. Після відмивання додають детекторні антитіла проти фосфорильова-

ної форми STAT6. Для впізнання зв'язаних детекторних антитіл використовують антикролячі вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому. Додають хромогенний субстрат для пероксидази – ТМВ (див. підрозд. 6.1.2), при розщепленні якого розвивається забарвлення. Величина оптичної густини пропорційна кількості у зразку STAT6, фосфорильованого за Тир641.

Ще одним ефективним методом визначення рівня білків STAT у клітинах є підхід, котрий ґрунтується на HTRF-технології (див. підрозд. 1.6.4). Вони дозволяють прямим чином визначати рівень фосфорильованих STAT у цілих клітинах.

Зручний і швидкий підхід до визначення рівня білків STAT запропоновано фірмою Meso Scale Discovery. Він дозволяє визначати білки в дуже малому об'ємі зразка й базується на "сенд-віч"-ІФА та явищі електрохемілюмінесценції.

Електрохемілюмінесценція – це хемілюмінесценція, яка генерується дією електричного поля. Вона являє собою вид люмінесценції, що виникає під час електрохімічних реакцій у розчинах. Електрохімічно генеровані проміжні продукти реакцій підлягають екзергонічним реакціям і переходять в електронозбуджений стан, після чого випромінюють світло, переходячи в основний стан. Довжина хвилі світла, що випромінюється, відповідає зміні енергії між цими двома станами (Forster, 2009). Електрохемілюмінесценцію можна викликати реакціями між електрогенеруючими сполуками, які утворюються електрохімічним шляхом на електродах. При збудженні такої сполуки – люмінофору – змінним електричним полем випромінюється світло, причому свічення зосереджено поблизу електрода.

Визначення білків STAT за допомогою електрохемілюмінесценції проводять наступним чином (рис. 6.68).

У лунках планшета, які являють собою поверхню робочого електрода, фіксовано антитіла проти досліджуваного білка (рис. 6.68). Додають зразок, а після інкубації – детекторні антитіла, кон'юговані з електрохемілюмінесцентними мітками (наприклад, MSD SULFO-TAG™), вони зв'язуються з аналізованим білком. Далі вносять MSD буфер, що створює відповідне хімічне оточення для електрохемілюмінесценції. Планшет завантажують у спеціальний прилад, який прикладає напругу на його електроди, що змушує зв'язані з антитілами мітки випромінювати світло.

У кожній лунці можуть проявитися максимум чотири плями, які відповідають різним білкам STAT. Вимірюють інтенсивність світла, що випромінюється, вона має бути пропорційна кількості досліджуваного білка у зразку.

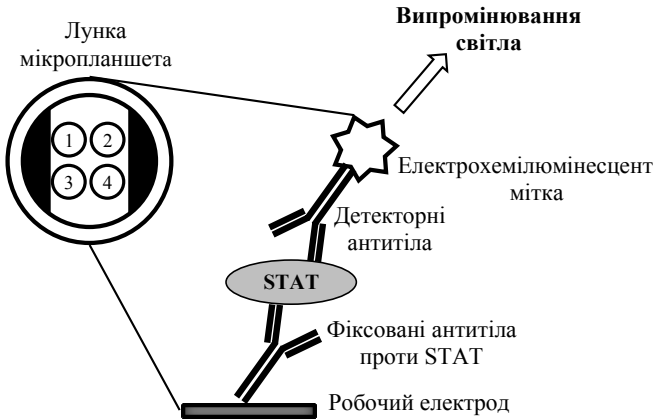


Рис. 6.68. Схема визначення білків STAT методом електрохемілюмінесценції. У лунках планшета (MSD MULTI-SPOT 96-Well Spot Plate) виявляють плями, що відповідають різним білкам STAT, цифрами в колах позначено такі проби: 1 – проба містить фосфо-STAT3 (Тир705), 2 – проба містить фосфо-STAT4 (Тир693), 2 – проба містить фосфо-STAT5a, b (Тир694), 3 – проводили блокування бичачим сироватковим альбуміном (БСА)

6.8.2.3. Метод HTRF

Визначити рівень активованого STAT, наприклад STAT3, який фосфорилується за Тир705, безпосередньо в цілих клітинах дозволяє метод HTRF. Він базується на "сендвіч"-методі HTRF (принцип викладено в підрозд. 1.6.4), у якому використовуються два типи моноклональних антитіл: антифосфо-антитіла, мічені криптатом Eu^{3+} (HTRF-донор) та антитіла проти STAT3, мічені d2 (HTRF-акцептор). Процедури проводять за алгоритмом, аналогічним до такого, який використовується для визначення активності Akt-кінази (див. підрозд. 6.4.5.3).

За присутності у зразку фосфорильованого STAT3 (антигену) він одночасно зв'язується з обома типами кон'югатів антитіл, унаслідок чого відбувається флуоресцентне резонансне перене-

сення енергії від донора (Eu^{3+}) до акцептора (d2), і виникає сигнал FRET (рис. 6.69). Проводять флуоресцентну детекцію сигналу, вимірюючи інтенсивність флуоресценції за довжини хвилі 620 нм. Інтенсивність сигналу пропорційна кількості STAT3.

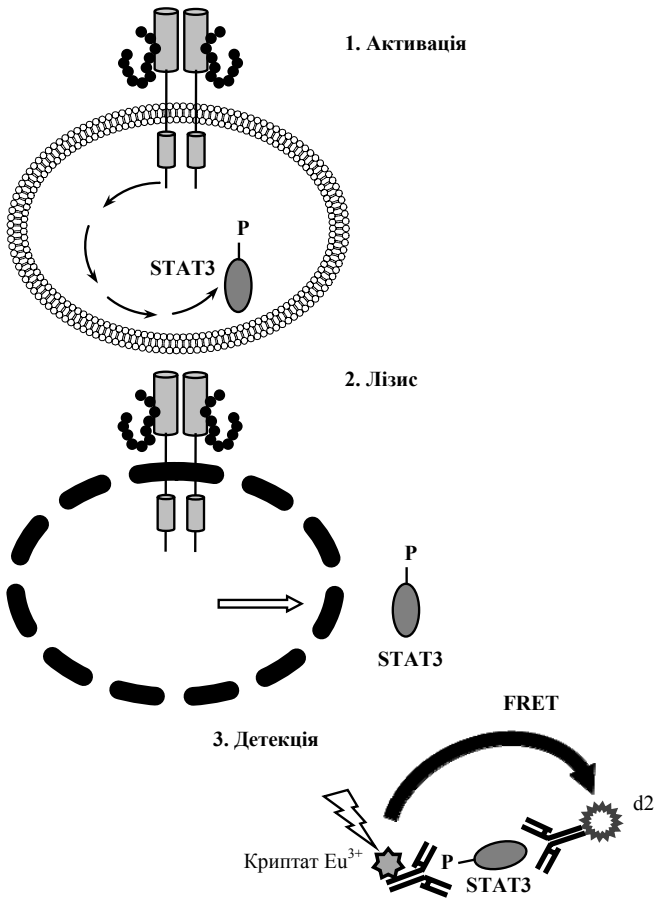


Рис. 6.69. Схема визначення фосфорильованого STAT3 методом HTRF

Клітини культивують у планшетах, стимулюють для активації STAT3, після чого лізують і лізат переносять у планшет для ELISA, у якому проводять визначення вмісту фосфорильованого STAT3 методом HTRF.

6.9. ВИВЧЕННЯ СИСТЕМИ ІНТЕРФЕРОНУ

Інтерферони (IFN) є цитокінами, які забезпечують, зокрема, захист клітин і тканин від вірусної інфекції та необмеженої проліферації. Тип I інтерферону (переважно IFN- α та IFN- β) продукується та секретується вірус-інфікованими клітинами. Зв'язуючись із специфічними клітинними поверхневими рецепторами, вони активують JAK-STAT сигнальну систему, а також індують певні ланки генної експресії. Білки, які кодуються IFN-стимульованими генами, відповідають за прояв різних біологічних активностей інтерферону, включаючи антивірусний захист, інгібування росту клітин (антипроліферативна активність) та широкий ряд ефектів імунної системи.

Інтерферон-індукована система 2',5'-олігоаденілату запускає масовану деградацію вірусної або клітинної РНК (рис. 6.70). Завдяки цьому блокується біосинтез білків і таким чином пригнічується розмноження вірусу або інгібується клітинна проліферація.

6.9.1. Визначення вмісту та біологічної активності інтерферону

Методи визначення IFN різнопланові. Одні з них дають можливість визначити його вміст у біологічному зразку (метод ELISA), інші – оцінити його вивільнення з окремої активованої імунної клітини (метод ELISPOT). Традиційним є метод вивчення біологічної активності IFN, яку оцінюють за його антивірусною активністю в культурі клітин.

6.9.1.1. Метод ELISA

Широко застосовуваним методом оцінки кількості IFN різних типів (IFN- α , - β , - γ) у сироватці та плазмі крові, супернатантах клітинних культур та інших біологічних зразках є імуноферментний аналіз (ELISA). Так, для визначення IFN- γ розроблено метод "сендвіч"-ELISA, у якому використовують мікропланшети, у лунках яких іммобілізовано специфічні антитіла. Після внесення до лунок IFN- γ зв'язується з цими антитілами, після чого

проводять відмивання і додають детекторні біотинільовані анти-тіла (рис. 6.71). Далі інкубують з пероксидазою хрому, кон'югованою із стрептавідином. Як було вказано раніше (див. підрозд. 6.1.2), при зв'язуванні біотину із стрептавідином до реакції залучається більша кількість ферментних міток і забезпечується багаторазове посилення сигналу. Внесений хромогенний субстрат (ТМВ) розщеплюється пероксидазою хрому, унаслідок чого розвивається забарвлення. Зупиняють реакцію додаванням сірчаної кислоти. Оптичну густина вимірюють на спектрофотометрі для мікропланшетів за довжини хвилі від 450 до 550 нм.

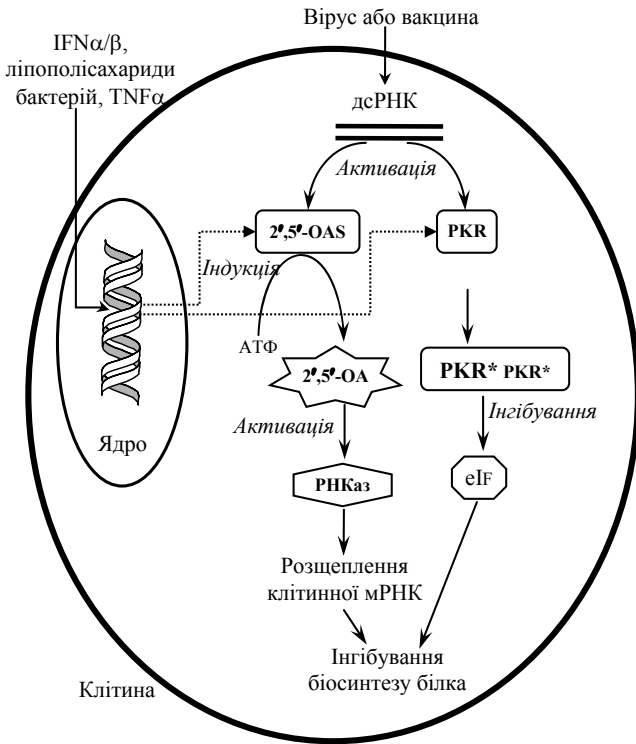


Рис. 6.70. Схема трансдукції сигналу інтерферону.

IFN – інтерферон, дсРНК – двоспіральна РНК вірусного походження, 2',5'-OAS – 2',5'-олігоаденілатсинтетаза, 2',5'-OA – 2',5'-олігоаденілат, РНКаз L – ендорибонуклеаза L, PKR – протеїнкіназа R, eIF2 α – еукаріотичний фактор ініціації трансляції

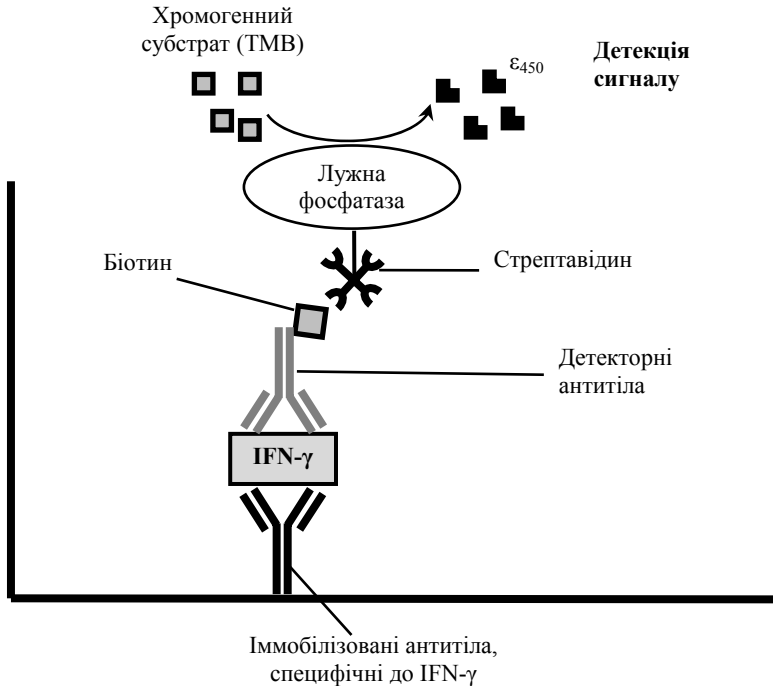


Рис. 6.71. Схема визначення IFN- γ методом "сендвіч"-ELISA

6.9.1.2. Метод ELISPOT

Метод ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot, англ., spot – пляма) є широко використовуваним методом моніторингу клітинної ланки імунної відповіді. Він дозволяє не тільки визначити кількість антиген-специфічних Т- і В-клітин, але й оцінити здатність окремих клітин секретувати цитокіни. Метод базується на використанні культури клітин і є модифікацією пасткового "сендвіч"-ELISA. Він має унікально високу чутливість, оскільки цитокін, що визначають, розташований на поверхні досліджуваної клітини. Крім того, стимуляцію вивільнення цитокіну проводять *in vitro* безпосередньо перед детекцією. Тому метод ELISPOT дає можливість визначити одну клітину, що секретує цитокін, на 100 000 клітин, що у 20–200 разів більше за чутливість стандартного ELISA.

У цьому методі використовують мікропланшет на 96 лунок, PVDF-мембрана (англ., polyvinylidene fluoride) у яких вкрита іммобілізованими антитілами, специфічними до досліджуваного цитокіну. Клітини додають до лунок мікропланшета разом з активатором (антигеном) та інкубують в умовах, оптимальних для живих клітин (CO₂-інкубатор, поживне середовище). Як контроль використовують нестимульовані клітини, їх вносять у лунки без активатора. Під час інкубації клітини формують моношар на поверхні мембрани, активуються і починають виробляти цитокіни, які зв'язуються з іммобілізованими специфічними антитілами. Тому цитокін "затримується" на площині, що оточує клітину, яка його секретує, і не дифундує в супернатант. Клітини відмивають, додають вторинні антитіла, які можуть бути біотинільованими або кон'югованими з ферментом. Якщо використовується біотин, також додають стрептавідиновий кон'югат. При додаванні субстрату він розщеплюється ферментом і утворюється забарвлена пляма, яка відповідає локалізації однієї клітини, що секретує цитокін. Підраховують плями в дослідних зразках і контролі (без активатора) за допомогою спеціального приладу, наприклад автоматизованого ELISpot Reader, і таким чином визначають кількість клітин, яка продукує певний цитокін. За допомогою мікровідеокамери отримують зображення кожної лунки, яке в цифровому форматі передається у комп'ютер. Підраховувати плями можна також візуально, використовуючи стереомікроскоп, але такий спосіб найменш точний.

Метод ELISPOT застосовується для визначення інтерферонів різних типів. У випадку IFN- γ на PVDF-мембрані іммобілізують специфічні моноклональні антитіла до цього цитокіну (рис. 6.72).

Стимульовані клітини додають у лунки мікропланшета та інкубують. Клітини секретують IFN- γ , який фіксується антитілами. Після відмивання додають біотинільовані детекторні антитіла й лужну фосфатазу, кон'юговану із стрептавідином. Незв'язаний фермент видаляють відмиванням і додають субстратний розчин. Синій преципітат утворює плями в місцях, які відповідають локалізації окремих клітин, що секретують IFN- γ .

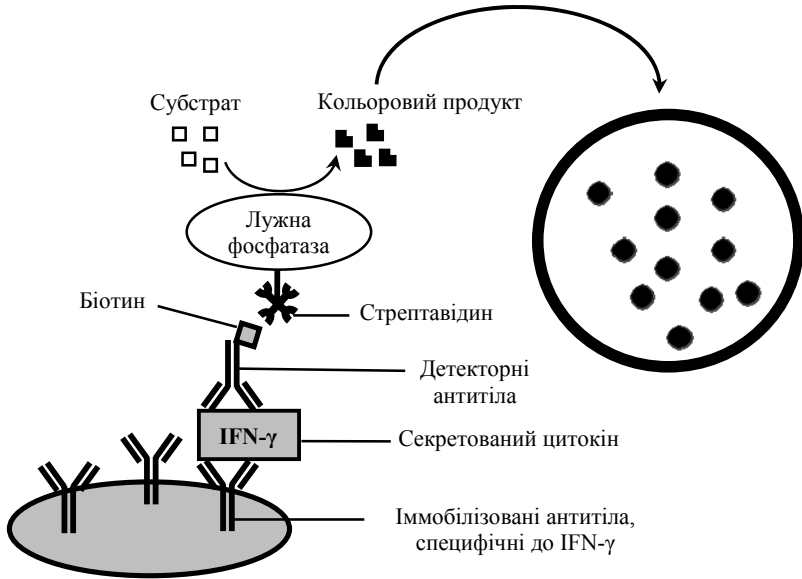


Рис. 6.72. Схема визначення секретованих цитокінів (IFN- γ) методом ELISPOT

6.9.1.3. Вивчення біологічної активності інтерферону

Оскільки IFN I типу мають потужні антивірусні ефекти, одним із методів вивчення біологічної активності цих цитокінів є оцінка їхньої здатності пригнічувати дію вірусу на відповідну культуру клітин. Вивчення базується на індукції клітинної відповіді, що перешкоджає прояву цитопатичного ефекту інфекційного вірусу. Активність IFN оцінюють, порівнюючи захисний ефект проти цитопатичної дії вірусу з таким ефектом відповідного контрольного препарату. Для цього беруть культури клітин, чутливих до дії IFN, такі як первинно трипсинізовані фібробласти миші або людини, перевивну культуру диплоїдних фібробластів людини й пухлинну лінію фібробластів миші L-929. Застосовують віруси з коротким циклом розмноження та високою чутливістю до дії IFN (вірус енцефаломієліту мишей, везикулярного стоматиту мишей та ін.)

Приклад процедури визначення. Клітини культивують у плоскодонних планшетах на 96 лунок у CO₂-інкубаторі. Для титрування активності IFN роблять серію двократних розведень на моношарі фібробластів. Поряд із зразками (джерело IFN) у лунки вносять вірус енцефаломієліту мишей у дозі, яка викликає 100% ураження клітин через 48 год після зараження. Після інкубації оцінюють інгібування цитопатичного ефекту. Рівень активності IFN визначають як величину, зворотну значенню максимального розведення зразка, що затримує цитопатичну дію вірусу на 50%, і виражають її в одиницях активності на 1 мл. Контролем є незаражені клітини. Також використовують препарати IFN з відомою активністю, яку виражають у міжнародних одиницях (англ., IU – International Units). Згідно з рекомендаціями Всесвітньої організації охорони здоров'я (World Health Organisation) створено стандарти IFN- α , IFN- β та IFN- γ людини, придатні для високочутливого та відтвореного визначення різних типів IFN.

Таким чином можна визначити не тільки титр IFN у біологічному зразку, а й оцінити його біологічну активність. Якщо використовувати антисироватку для певного типу IFN (наприклад, IFN- α , - β , - γ), можна визначити, який саме тип проявляє активність. Для цього зразки інкубують з антисироваткою, яка блокує дію відповідного типу IFN.

6.9.2. Визначення активності 2',5'-олігоаденілатсинтетази

2',5'-олігоаденілатсинтетаза (англ., 2',5'-oligoadenylate synthetase, 2',5'-OAS) є інтерферон-індукованим ферментом, який активується клітинною або вірусною двоспінальною РНК і каталізує реакцію утворення з АТФ 2',5'-олігоаденілату за наступною схемою:



2',5'-OAS, як ключовий фермент системи 2',5'-олігоаденілату, була докладно вивчена, у зв'язку з чим розроблено велику кількість методів оцінки її активності. Активність ферменту може бути виміряна з використанням радіоактивно мічених субстратів – нуклеозидтрифосфатів з подальшим аналізом утворених про-

дуктів, наприклад міченого за фосфором АТР (Chebath, 1987). Фермент, інкубований з АТР, [α - P^{32} АТР та poly(I)·poly(C) і оброблений лужною фосфатазою, підлягав електрофорезу, і плями олігомерів (A2'p)_nA сканувалися методом радіографії. Недоліком цього методу є важке відокремлення 2',5'-олігоаденілатів від АТР. Активність 2',5'-OAS у грубих клітинних екстрактах визначають також за вмістом утворених 2',5'-олігоаденілатів: зразок інкубують з АТР та poly(I)·poly(C), а концентрацію синтезованого ppp(A2'p)_nA аналізують методом радіозв'язування. Вміст утворених мічених 2',5'-олігоаденілатів можна також визначити з використанням радіоімунних і функціональних методів (Sarkar, 2005, Bruchelt, 1992).

Альтернативним методом визначення активності 2',5'-OAS є спектрофотометричний метод, який не потребує радіоактивних нуклеозидтрифосфатів. У ньому фіксують вміст НАДФН, що утворюється у результаті зчеплених реакцій.

6.9.2.1. Радіоізотопний ферментативний метод

Першими методами визначення активності 2',5'-OAS були радіоізотопні методи, у яких використовували радіоактивно мічені субстрати для цього ферменту: [α^{32} P]АТФ, [3 H]АТФ, а також мічені аналоги продуктів його дії – 2',5'-олігоаденілати, такі як тетрамер ppp5'A2'p5'A2'p5'A2'p5'A[α^{32} P]p5C3p.

Ферментативний метод (enzyme assay) визначення активності 2',5'-OAS за допомогою [α^{32} P]АТФ розроблено в 1981 р. (Revel, 1981), проте його використовують і сьогодні. Було спрощено процедуру виділення 2',5'-OAS з біологічного зразка шляхом фіксації її на сорбенті (агарозі), до якого приєднана полііозиново-поліцитидилова кислота (англ., poly(I)·poly(C)). Ця сполука є аналогом двоспіральної РНК – інтермедіату, що утворюється під час життєвого циклу вірусу і є природними активатором ферменту 2',5'-OAS. У разі вірусної інфекції така РНК забезпечує стимуляцію системи IFN і прояв його антивірусного ефекту.

Для фіксації 2',5'-OAS на гранулах poly(I)·poly(C)-агарози її інкубують з клітинним лізатом (рис. 6.73). Після цього проводять синтетазну реакцію, додаючи буфер, що містить [α^{32} P]АТФ

і немічений АТФ, та інкубуючи протягом 18 год. Гранули видаляють центрифугуванням, супернатант обробляють лужною фосфатазою для відщеплення фосфатних залишків від утворених 2',5'-олігоаденілатів. Неорганічний фосфат відокремлюють від корових (позбавлених кінцевих фосфатних залишків) мічених $[\alpha^{32}\text{P}]2',5'\text{-OA}$ шляхом адсорбційної хроматографії на колонці з оксидом алюмінію. Вміст $[\alpha^{32}\text{P}]2',5'\text{-OA}$ вираховують шляхом зчитування радіоактивності у сцинтиляційній рідині.

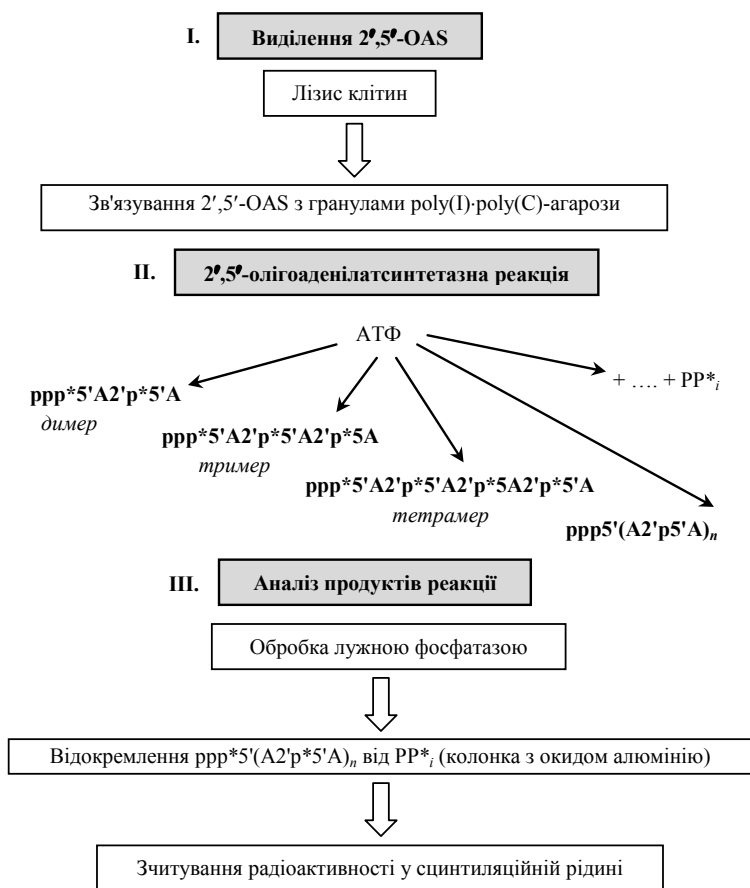


Рис. 6.73. Схема визначення активності 2',5'-олігоаденілатсинтези радіоізотопним методом

6.9.2.2. Радіоімунний аналіз

Цей метод активно використовувався на початку досліджень системи IFN. Через високу точність і чутливість його застосовують і досі, хоча в менших масштабах порівняно з "нерадіоактивними" методами. У ньому використовують мічені ^{125}I 2',5'-олігоаденілати (2',5'-ОА). Під час ферментативної реакції 2',5'-ОАС синтезує з АТФ немічені 2',5'-олігоаденілати, які конкурують з міченими аналогами за зв'язування зі специфічною антисироваткою. При цьому зменшується співвідношення мічених аналогів, зв'язаних з антитілами, до вільних мічених аналогів, тому інтенсивність радіоактивного випромінювання зменшується (принцип RIA наведено в підрозд. 6.1.3). Активність ферменту оцінюють за зміною радіоактивності.

Як і в попередньому методі, 2',5'-ОАС виділяють із біологічного зразка шляхом зв'язування з poly(I)-poly(C). Клітинні екстракти або лізати, що є джерелом 2',5'-ОАС, інкубують з агарозними гранулами, зв'язаними з poly(I)-poly(C). Фермент, що не зв'язався, відмивають та інкубують гранули в буфері, що містить субстрат – АТФ (рис. 6.74).

У результаті реакційна суміш містить немічені 2',5'-ОА, які виявляють методом радіоімунного аналізу. Для цього суміш інкубують за температури 37 °С з міченим ^{125}I 2',5'-ОА та антисироваткою проти 2',5'-ОА. Зразки центрифугують за швидкості 6000 g для видалення незв'язаної "мітки", і в отриманому супернатанті вимірюють радіоактивність за допомогою сцинтиляційного лічильника. Калібрувальну криву будують, використовуючи відомі концентрації мічених 2',5'-ОА. Активність 2',5'-ОАС виражають у пікомолях утвореного 2',5'-ОА за 1 хв інкубації.

Крім мічених ^{125}I 2',5'-олігоаденілатів також використовують мічені за ^{32}P аналоги різної довжини, наприклад $(\text{A}2'\text{p})_2\text{A}-[^{32}\text{P}]\text{C}_p$. Немічені 2',5'-ОА $(\text{A}2'\text{p}5'\text{A}$, $(\text{A}2'\text{p})_2\text{A}$, $(\text{A}3'\text{p})_2\text{A}$) конкурують з міченими за зв'язування з відповідною антисироваткою. При цьому радіоактивність зменшується, за її зміною судять про вміст 2',5'-ОА (як і в попередньому методі) (Hersh, 1984).

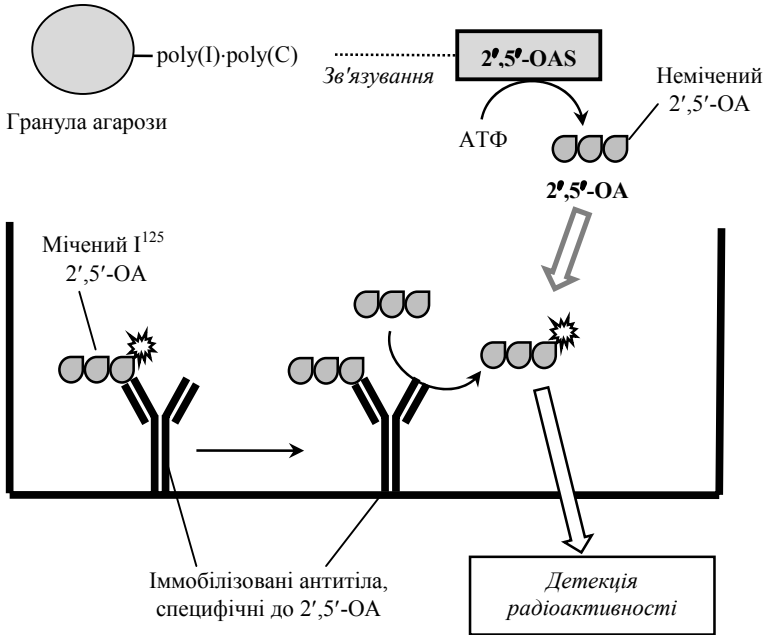


Рис. 6.74. Схема визначення активності 2',5'-олігоаденілат-синтетази методом радіоімунного аналізу. 2',5'-OAS – 2',5'-олігоаденілат-синтетаза, 2',5'-OA – 2',5'-олігоаденілат

6.9.2.3. Метод тонкошарової хроматографії на PEI-целюлозі

Цей метод застосовують як для аналізу вмісту 2',5'-OA різної довжини в біологічному зразку, так і для визначення активності ферменту 2',5'-OAS, який їх синтезує. Для цього застосовують метод тонкошарової хроматографії на PEI-целюлозі (англ., polyethylenimine, укр. – поліетиленімін). Утворені 2',5'-OA відокремлюють від залишкового АТФ за допомогою хроматографічних пластинок PEI-целюлози, при цьому олігомери з трьома фосфатними залишками можуть бути відокремлені від молекул з меншою кількістю таких залишків (Tong, 1998).

Спочатку залишковий АТФ, що не перетворився на 2',5'-OA, розщеплюють до АДФ за дії ферменту гексокінази, він містить

два фосфатні залишки й тому його можна відокремити від 2',5'-ОА. На хроматограмі утворюються смуги, які аналізують за допомогою ультрафіолетової лампи.

Реакцію синтезу 2',5'-ОА проводять, спочатку фіксуючи фермент на гранулах poly(I)·poly(C)-агарози (див. підрозд. 6.9.2). Ці гранули в буферному середовищі додають до клітинного екстракту (наприклад, екстракту мононуклеарних клітин периферійної крові чи лізату ретикулоцитів) та інкубують протягом 1–4 год (рис. 6.75).

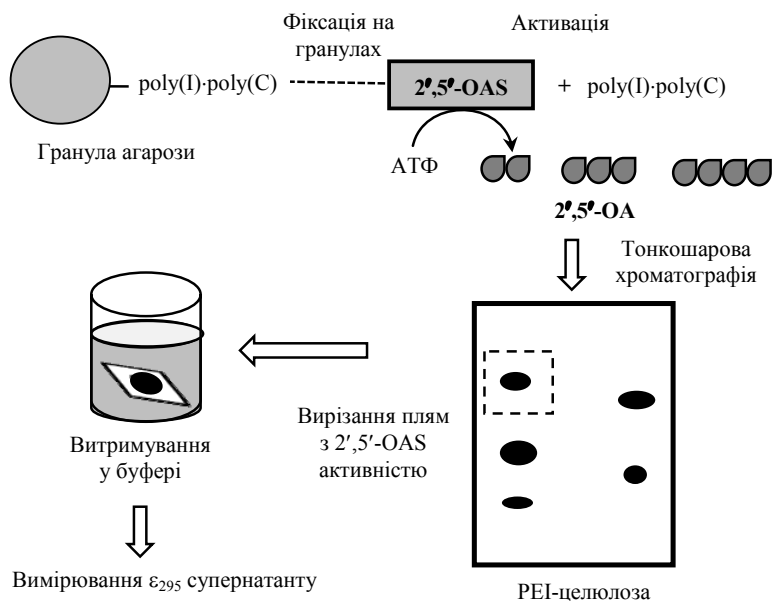


Рис. 6.75. Схема визначення активності 2',5'-олігоаденілат-синтетази методом тонкошарової хроматографії на PEI-целюлозі

Після цього гранули відмивають центрифугуванням. Реакцію починають, додаючи АТФ, poly(I)·poly(C), креатинфосфокиназу та креатинфосфат, та інкубують протягом ночі. Зупиняють реакцію, прогріваючи суміш при 95 °С, і центрифугують. Супернатант додають у лунки мікропланшета та розщеплюють залишко-

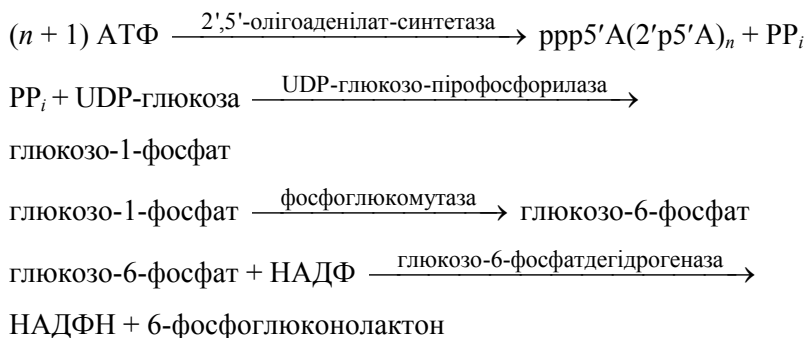
вий АТФ, а після цього наносять на пластинки з тонким шаром PEI-целюлози, висушують і проводять хроматографію. Після цього знову висушують та аналізують під ультрафіолетовим світлом. Плями, які містять тільки АДФ, відповідають пробам без 2',5'-OAS активності. Плями, що відповідають пробам з різним вмістом 2',5'-OA (де присутня 2',5'-OAS активність), вирізають ножицями, просякають буфером протягом ночі. В отриманій рідині вимірюють оптичну густина за довжини хвилі 259 нм.

Активність 2',5'-OAS виражають як відсоток перетвореного АТФ і розраховують за формулою:

$$A = \frac{\epsilon_{2,5-OA}}{\epsilon_{2,5-OA} - \epsilon_{ATP}} \cdot 100\%$$

6.9.2.4. Спектрофотометричний метод

Існує й інший метод визначення активності 2',5'-OAS – спектрофотометричний, що базується на вимірюванні кількості неорганічного пірофосфату, який утворюється під час синтезу олігоаденілату з АТФ (Justensen, 1992). Для цього використовуються зчеплені ферментативні реакції, у результаті яких відновлюється НАДФ, який може бути визначений спектрофотометрично за довжині хвилі 340 нм:



У результаті описаних реакцій, які ініціюються PP_i , утвореним за дії 2',5'-OAS, відновлюється НАДФН. Кількість НАДФН визначають спектрофотометрично за довжини хвилі 340 нм. Оскільки PP_i

утворюється відносно НАДФН з розрахунку 1 моль : 1 моль, кількість утвореного НАДФН дорівнює кількості PP_i , за якою оцінювали активність 2',5'-ОАС.

Метод має більшу чутливість, ніж визначення активності 2,5А-синтетази з використанням мічених нуклеозидтрифосфатів унаслідок внеску флуоресценції НАДФН.

6.9.3. Визначення вмісту 2',5'-олігоаденілатів

2',5'-олігоаденілат (2',5'-ОА) є внутрішньоклітинним медіатором антивірусної дії інтерферону, доведено його участь у процесах контролю росту, проліферації та диференціації клітин (рис. 6.76). При обробленні клітин інтерфероном рівень олігоаденілатів значно підвищується, що корелює з проявом антивірусних і антипроліферативних ефектів.

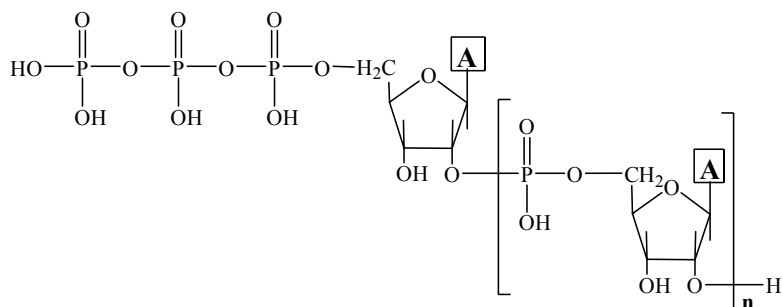


Рис. 6.76. Структурна формула 2',5'-олігоаденілату

2',5'-олігоаденілат опосередковує свою біологічну дію через активацію 2',5'-олігоаденілатзалежної ендорибонуклеази – РНКазі L, яка забезпечує проведення сигналу індукції розщеплення РНК, а отже, і контроль транскрипції та генної експресії. Вона димеризується з утворенням каталітично активного ферменту, не потребуючи для активації жодних інших поліпептидів.

Для з'ясування біологічної ролі 2',5'-олігоаденілатів є необхідним застосування методів визначення, чутливих до наномольного рівня цих речовин. Вимірювання їхньої кількості у клі-

тині та їхні ідентифікація лежить в основі визначення активності 2',5'-олігоаденілатсинтетази. Вміст 2',5'-олігоаденілатів корелює з фізіологічним станом клітин і тканин. Найчастіше вони присутні у вигляді суміші з різних молекул-олігомерів, які можуть бути розділені за допомогою методу HPLC та аналізовані методами радіозв'язування, радіоімунними методами з використанням антитіл та функціональними тестами.

Високу чутливість мають специфічні функціональні методи, за допомогою яких аналізується здатність 2',5'-ОА стимулювати деградацію mRNA або rRNA *in vitro*. Постмітохондріальний клітинний екстракт інкубується з P^{32} -міченою RNA, виділеною з інтактних клітин або з екстракту (Reid, 1984). Кількість нерозщепленої (залишкової) RNA, нерозчинної у трихлороцтовій кислоті, вимірюється на фільтрах Whatman, які зчитуються у сцинтиляційній рідині. Розщеплена РНК аналізується методом електрофорезу в агарозному гелі в денатуруючих умовах. Подібні функціональні методи дозволяють визначити частину активного матеріалу клітинних олігоаденілатів, здатних активувати 2',5'-олігоаденілатзалежні нуклеази, зокрема РНКазу L, *in vitro*.

Фракції олігомерів-олігоаденілатів, отриманих при HPLC, можуть бути охарактеризовані також іншими методами. Так, поряд з радіоімунними тестами склад хроматографічних піків був визначений методом мас-спектрометрії, а наявність 2',5'-фосфодієфірних зв'язків виявлена методом ЯМР (Kuuskalu, 1998). Новий, ефективніший за хроматографічні, метод був застосований для аналізу олігоаденілатів у суспензії ядер печінки щурів (Miele, 1991). Ди-, три- і тетрамерні форми 2',5'-ОА (5'-, три- та дифосфати), мічені за P^{32} , були електрофоретично розділені у 20% поліакриламідному гелі, який містив 7 М сечовину, та охарактеризовані за допомогою специфічних нуклеаз.

З використанням хроматографічних, радіоімунних та функціональних методів був ідентифікований цілий ряд 2',5'-олігоаденілатів у різноманітних лініях клітин при різних фізіологічних станах: дії інтерферону, вірусній інфекції, мітогенній стимуляції та ін.

6.9.3.1. Метод HPLC

Метод HPLC (англ., High-performance liquid chromatography) або високоєфективна рідинна хроматографія – це технологія, яка дозволяє відокремлювати компоненти складної суміші та ідентифікувати кожний із них. Розділення відбувається на межі поділу фаз (нерухомої та рухомої – елюенту) за рахунок вандерваальсових взаємодій. Методом HPLC численні олігомери 2',5'-ОА з різною довжиною ланцюга та різним ступенем фосфорилування (від A2'pA до ppp(A2'pA)₂A) із екстрагованих трихлорооцтовою кислотою клітин отримано та охарактеризовано на обернено-фазовій колонці C18 з елюцією градієнтом метанолу (Knight, 1980). Уміст олігоаденілатів визначають за оптичною густиною за довжини хвилі 257 нм. Отримані піки порівнюються за положенням на хроматограмі відносно стандартів (АТФ, A2'pA, НАДpp(A2'p)₂A та ін.). До хроматографічних процедур клітинний екстракт доцільно обробляти ферментами. Якщо в результаті цього зміниться положення елюйованих піків при HPLC порівняно зі стандартами, це свідчить про наявність: 1) експонованих 5'-фосфатних груп при обробленні бактеріальною лужною фосфатазою; 2) 2'-5'-фосфодієфірних зв'язків за дії фосфодієстерази зміїної отрути; 3) 3'-5'-фосфодієфірних зв'язків РНКазою T₂. Кожна фракція аналізується щодо імунореактивності радіоіммунними й радіозв'язувальними методами, а також функціональними тестами щодо здатності стимулювати деградацію мРНК і рРНК. Для визначення розміру отриманих при HPLC олігомерів 2',5'-ОА використовують гель-фільтрацію. Методом HPLC олігоаденілати отримано з різних клітин: оброблених інтерфероном клітин мавпи, інфікованих вірусом SV40, клітин нейробластоми людини після припинення росту, мітоген-стимульованих Т-лімфоцитів тощо.

6.9.3.2. Метод радіозв'язування та радіоіммунний аналіз

Радіоіммунні методи та методи радіозв'язування, які дозволяють визначити наномольні кількості присутніх у клітині олігоаденілатів, ґрунтуються на високій афінності "корових" і фосфорильованих 2',5'-ОА до специфічних антитіл або 2',5'-ОА за-

лежної нуклеази. Концентрація 2',5'-ОА визначається за заміщенням зв'язаного з антитілом або РНКазою L P³²-міченого 2',5'-ОА аналізованим 2',5'-ОА (Knight, 1980). В обох випадках кількість зв'язаного P³²-міченого 2',5'-ОА вимірюється на нітроцелюлозних фільтрах під час зчитування їх у сцинтиляційній рідині. Концентрація аналізованого 2',5'-ОА-конкурента, необхідна для заміщення 50% зв'язаного P³²-міченого 2',5'-ОА, визначається при порівнянні з відомою концентрацією очищеного 2',5'-ОА, яка здійснює подібне заміщення.

Метод радіозв'язування використовується для визначення 2',5'-ОА у грубих клітинних екстрактах, які є джерелом 2',5'-ОА-зв'язувального білка (РНКазин L) (Thakur, 2005). При інкубації постмітохондріального супернатанту з радіоактивним rpp(A2'p)₃A[P³²]pCp останній ковалентно зв'язується з нуклеазою, і кількість зв'язаного з білком P³² визначається скануванням нітроцелюлозних фільтрів у сцинтиляційній рідині.

Альтернативним до методу радіозв'язування є радіоімунний метод з використанням антитіл як 2',5'-ОА-зв'язувальних білків (Sawai, 1985). Принцип радіоімунного аналізу наведено в підрозд. 6.1.3. Для його проведення необхідно отримати, по-перше, антитіла до 2',5'-олігоаденілатів, по-друге, радіоактивно мічені аналоги цих сполук. Мічені ¹²⁵I 2',5'-ОА різної довжини синтезують таким чином. Окиснені періодатом 2',5'-ОА три- та тетрамери (A2'p)_n зв'язують з метиловим ефіром β-аланітирози, після чого фосфорилують і піддають йодуванню ¹²⁵I. Крім мічених ¹²⁵I 2',5'-ОА, у радіоімунному аналізі використовують також P³²-мічені похідні, які синтезують за допомогою RNA-лігази T₄ та очищують методом HPLC.

Для отримання антитіл окиснені періодатом 2',5'-ОА, наприклад rpp(A2'p)₃, кон'югують з ацилгідрозидними похідними бичачого сироваткового альбуміну (білок-носії) і використовують як антиген. Отримані при імунізації кролів антитіла інкубують і зв'язують з радіоактивно міченими 2',5'-ОА, наприклад rpp(A2'p)₃A3'[P³²]pCp.

При проведенні визначення зразок інкубують з антитілами та міченими 2',5'-ОА. Досліджувані (немічені) 2',5'-ОА зразка конкурують із своїми міченими аналогами за зв'язування з антиті-

лами, у результаті чого радіоактивність зменшується. Визначають концентрацію невідомого 2',5'-ОА, необхідну для заміщення половини P^{32} - або ^{125}I -міченої проби з антитіл. При цьому вміст комплексу антитіло-радіоактивний 2',5'-ОА вимірюється після зв'язування з нітроцелюлозним фільтром або полістироловими гранулами шляхом зчитування радіоактивності у сцинтиляційній рідині (Hersh, 1984). Для аналізу використовують антитіла не тільки до фосфорильованих, а й до "корових" 2,5А, позбавлених кінцевих фосфатних груп, зокрема (A2'p)₂A та A2'pA (Reid, 1984). Радіоімунні методи із застосуванням моноклональних антитіл до 2',5'-ОА або поліклональної антисироватки дозволяють ідентифікувати переважну частину компонентів суміші олігоаденілатів.

Радіоімунний аналіз 2',5'-ОА здійснюють також методом "подвійних антитіл", коли використовують вторинні антитіла (антикролячі або антикозині), що зв'язуються з первинними (специфічними до 2',5'-ОА) антитілами. Вміст мічених 2',5'-ОА аналогів, зв'язаних з анти-2',5'-ОА антитілами, визначають після преципітації їхнього комплексу із вторинними антитілами (Sawai, 1985).

6.9.4. Визначення активності РНКаз L

РНКаз L (2',5'-олігоаденілатзалежна ендорибонуклеаза) – фермент, який активується 2',5'-ОА і гідролізує одноланцюгову РНК (rRNA або tRNA) на 3'-кінці. У результаті інгібується трансляція вірусного білка. 2',5'-ОА є алостеричним ефектором, який на субнаномолярному рівні зв'язується з цим ферментом.

6.9.4.1. Метод радіозв'язування

Специфічність та афінність РНКаз L до 2',5'-ОА дуже високі, тому її активність залежить від її активації за дії 2',5'-ОА. Визначення 2',5'-ОА з РНКазою L є чутливим індикатором присутності цього ферменту в клітинних екстрактах.

Метод радіозв'язування був розроблений Knight і співав. (Knight, 1980), він простий і швидкий, його модифікації застосовуються в сучасних дослідженнях. Він базується на зв'язуванні радіоактивно міченого 2',5'-ОА з РНКазою L, присутньою в клітинному екстракті. При додаванні неміченого 2',5'-ОА він конкурує

з міченим аналогом за зв'язування з цим ферментом, витісняючи його. Після цього вимірюють радіоактивність міченого 2',5'-ОА, зв'язаного з РНКазою L. Таким чином можна з'ясувати, що РНКаза L у зразку є активною і здатна зв'язувати 2',5'-ОА. Цей метод схожий з методом аналізу 2',5'-ОА у біологічних зразках, де використовується очищена РНКаза L (див. підрозд. 6.9.3.2). У підході, що описується, навпаки, мічений 2',5'-ОА аналог і очищений немічений 2',5'-ОА додають до зразка, що містить РНКазу L.

Визначення проводять наступним чином (рис. 6.77). Зразок (джерело РНКазу L) додають у пробірки з буфером, який містить мічений $\text{ppp}(\text{A}2'\text{p})_3\text{A}3'-[\text{P}^{32}]\text{pCp}$. Реакцію зв'язування проводять за відсутності та за присутності у системі конкурента – неміченого $\text{ppp}(\text{A}2'\text{p})_3\text{A}$. Як зразок використовують клітинний екстракт або частково очищену на гранулах агарози РНКазу L.

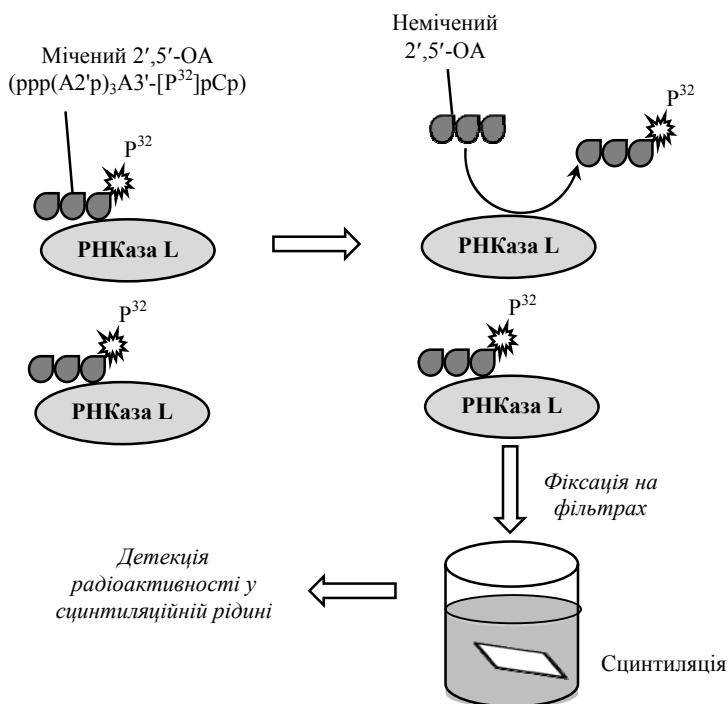


Рис. 6.77. Схема визначення активності РНКазу L методом радіозв'язування

Інкубують 5 год за температури 4 °С, наносять реакційну суміш на нітроцелюлозні фільтри й відмивають. Фільтри, що містять 2',5'-олігоаденілатзв'язувальні білки, поміщають у флакони із сцинтиляційною рідиною і зчитують радіоактивність на лічильнику.

6.9.4.2. Ковалентний метод

Метод полягає у ковалентному зв'язуванні радіоактивно міченого 2',5'-ОА з РНКазою L з наступним електрофоретичним аналізом. Як і метод радіозв'язування, цей метод також базується на високій афінності 2',5'-ОА до РНКазы L. Відмінністю є те, що мічений $\text{ppp}(\text{A}2'\text{p})_3\text{A}3'-[\text{P}^{32}]\text{pCp}$ окиснюють на 3'-кінці, що дозволяє йому ковалентно зв'язуватися з аміногрупами амінокислотних залишків РНКазы L. Після цього такі комплекси можна аналізувати шляхом електрофорезу в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах (з додаванням додецилсульфату натрію).

Окиснений $\text{ppp}(\text{A}2'\text{p})_3\text{A}3'-[\text{P}^{32}]\text{pCp}$ інкубують із клітинним екстрактом (джерело РНКазы L) на холоді, а згодом за кімнатної температури у присутності ціаноборгідриду. Реакційну суміш прогрівають за температури 100 °С, вносять у поліакриламідний гель і проводять електрофорез. Гель висушують, смуги, що відповідають $[\text{P}^{32}]$ -міченим білкам, візуалізують методом авторадіографії. Їхня наявність свідчить про присутність РНКазы L у біологічному зразку.

6.9.4.3. Метод Western-блотингу

Описані вище метод радіозв'язування та ковалентний метод, які базуються на зв'язуванні $\text{ppp}(\text{A}2'\text{p})_3\text{A}3'-[\text{P}^{32}]\text{pCp}$ з РНКазою L, мають досить значний недолік. Внутрішньоклітинні 2',5'-ОА можуть конкурувати з цими міченими аналогами за зв'язування з ферментом і тим самим зменшувати точність результатів його визначення. Рівень 2',5'-ОА у клітинах зростає за різних умов, навіть коли клітини не оброблені екзогенним інтерфероном: при вірусній інфекції, клітинному рості та диференціації тощо. Тому для детекції РНКазы L було розроблено новий метод на основі Western-блотингу, який не залежить від змін внутрішньоклітинного рівня 2',5'-ОАВ (рис. 6.78).

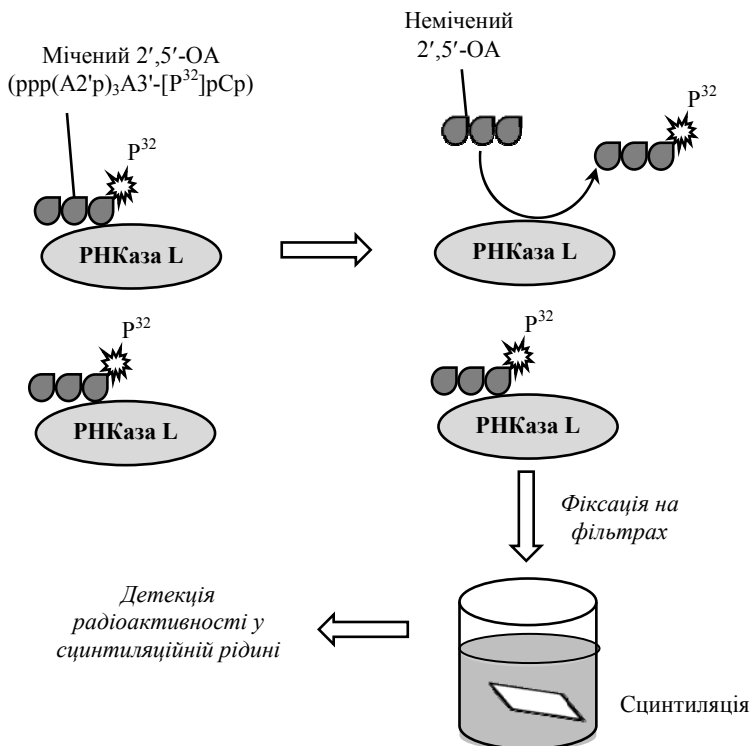


Рис. 6.78. Схема визначення активності РНКази L методом Western-блотингу

Визначення проводять у клітинному екстракті, який отримують центрифугуванням лізату клітин за швидкості 10 000 g. Спочатку цей екстракт піддають електрофорезові в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах. Після цього здійснюють електроперенесення білків з гелю на смужки нітроцелюлозного паперу (принцип методу Western-блотингу викладено в підрозд. 6.1.4). Смужки інкубують у знежиреному молоці, після чого відмивають, потім їх інкубують протягом ночі при 4 °С з радіоактивно міченим ppp(A2'p)₃A3'-[P³²]pCp. Смужки відмивають, висушують та експонують на рентгенівську плівку. Смужки, які мають радіоактивність, відповідають зразкам, у яких присутня РНКаза L, що зв'язалася з міченими аналогами 2',5'-ОА.

6.9.4.4. Методи вивчення РНКаз L-залежного розщеплення РНК

Присутність РНКаз L у зразку та її біологічну активність можна оцінити не тільки за здатністю зв'язувати 2',5'-ОА, а також за нуклеазною активністю. Для цього як субстрати використовують штучні аналоги РНК (поліуридилову кислоту, англ., poly(U)) або клітинні рибосомальні РНК (рРНК). Для уникнення неспецифічного розщеплення poly(U)· РНКазу L очищають на 2',5'-ОА-агарозі. Як негативний контроль беруть сполуку, що не є субстратом для РНКаз L, а саме poly(C)·(поліцитидилову кислоту).

Радіоактивно мічений субстрат РНКаз L (poly(U)-3'-[P³²]pCp) отримують, інкубуючи poly(U) у буфері з АТФ, РНК лігазою фагу Т4 та міченим [P³²]pCp. Аналогічно отримують poly(C)-3'-[P³²]pCp.

РНКазу L виділяють із клітинного екстракту на 2',5'-ОА-агарозі. Після цього проводять реакцію розщеплення міченого poly(U)-3'-[P³²]pCp за дії очищеного ферменту. Продукти розщеплення цього аналога РНК аналізують електрофорезом в агарозному гелі, після чого проводять авторадіографію.

Розщеплення РНК за дії РНКаз L також вивчають без застосування радіоактивно мічених субстратів [Wreschner, 1981]. Для цього використовують очищену рРНК, яку піддають дії РНКаз L, а продукти розщеплення аналізують шляхом електрофорезу в агарозному гелі. Гель забарвлюють етидіум бромідом і візуалізують смуги РНК під ультрафіолетовим світлом за довжини хвилі 302 нм.

6.9.5. Визначення активності dsRNA-залежної протеїнкінази

дсРНК-залежна протеїнкіназа, або протеїнкіназа R, є ключовим компонентом сигнальної системи, яка індукується інтерфероном (Pindel, 2011). Вона опосередковує антивірусну дію інтерферонів типу I через інгібування фактора ініціації трансляції eIF2. Крім своїх антивірусних властивостей, протеїнкіназа R бере участь у регуляції багатьох інших клітинних

функцій, зокрема у трансдукції сигналу, апоптозі, клітинному рості та диференціації. Вважають, що вона є медіатором клітинної відповіді на стрес (на дефіцит факторів росту, вірусну інфекцію, тепловий шок тощо). Є припущення, що протеїнкіназа R може опосередковувати патогенез вірусів шляхом індукції апоптозу у клітинах, і, як наслідок, модифікація функцій цього ферменту *in vivo* може бути реальним шляхом впливу на розвиток патологічного процесу.

Активність протеїнкінази R визначають радіоактивним методом з використанням міченого $[\gamma^{32}\text{P}]\text{АТФ}$, що є одним із її субстратів. Також розроблено високочутливий метод LanthaScreen™ на основі технології TR-FRET, який є високочутливим і дозволяє аналізувати велику кількість зразків одночасно.

6.9.5.1. Радіоактивний метод

Традиційним методом визначення активності протеїнкінази R, як і інших протеїнкіназ (див., напр., підрозд. 6.2.4.1), є радіоактивний метод з використанням міченого субстрату – $[\gamma^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ (рис. 6.79).

Як інший (білковий) субстрат застосовують гістон. Спочатку проводять кіназну реакцію, для чого інкубують очищену протеїнкіназу R (або клітинний екстракт) з міченим $[\gamma^{32}\text{P}]\text{АТФ}$, неміченим АТФ, сумарною фракцією гістонів та відновним агентом дитіотреїтолом.

Під час реакції протеїнкіназа R фосфорильє гістони, які тепер містять мічені за $[\gamma^{32}\text{P}]$ фосфатні залишки. При цьому мічений $[\gamma^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ конкурує з неміченим за зв'язування з ферментом. Реакцію зупиняють на холоді, фосфорильовані гістони сорбують на диски з фільтрувального паперу. Фільтри висушують і відмивають у ТХО з неміченим АТФ та в ацетоні. Після цього фільтри поміщують у флакони з толуольною скінтіляційною рідиною і вимірюють радіоактивність на лічильнику. Активність ферменту виражали в пікомолях ^{32}Pn за 1 хв на 1 мг білка.

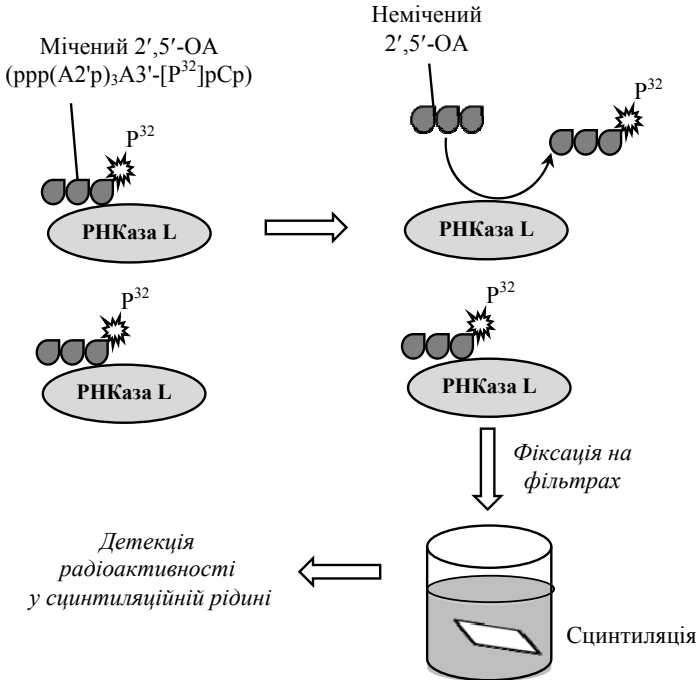


Рис. 6.79. Схема визначення активності протеїнкінази R радіоактивним методом

6.9.5.2. Метод LanthaScreen™ Activity Assay

Сучасним високоефективним методом визначення активності протеїнкінази R є метод LanthaScreen™, що базується на явищі флуоресцентного резонансного перенесення енергії, розділеного в часі (TR-FRET) (принцип описано в підрозд. 1.6.4). FRET-акцептором у цій технології є флуоресцеїн, зв'язаний з пептидним субстратом протеїнкінази R, FRET-донором – лантанод тербій (Tb³⁺), яким мітять антитіла проти фосфорильованої форми цього субстрату.

Спочатку проводять кіназну реакцію: додають протеїнкіназу R, пептидний субстрат та АТФ (рис. 6.80). Кіназа фосфорилує субстрат, після чого зупиняють реакцію додаванням ЕДТА. Вміст фосфорильованого продукту визначають за допомогою антитіл, специфічних саме до фосфорильованого пептиду, і мічених крип-

татом тербію. За наявності фосфорильованого пептиду – продукту кінзної реакції – ці антитіла зв'язуються з ним. Між атомом тербію і флуоресцеїном виникає FRET, його величину розраховують як співвідношення сигналу (інтенсивності флуоресценції) від акцептора (флуоресцеїну) до сигналу від донора (тербію).

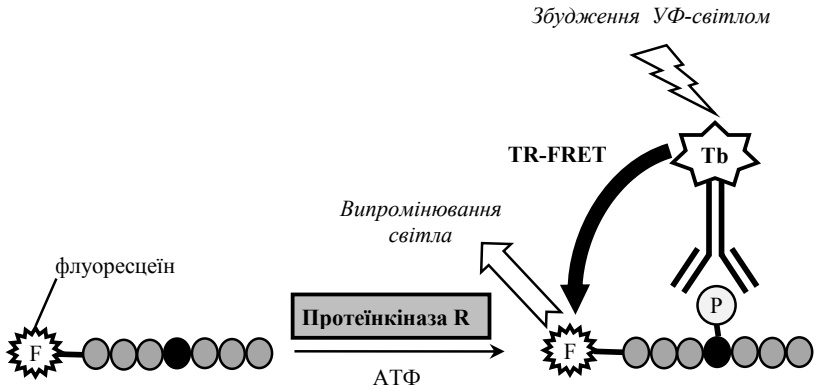


Рис. 6.80. Схема визначення активності протеїнкінази R методом LanthaScreen™

Вміст антитіл, зв'язаних з міткою, прямо пропорційний вмісту утвореного фосфорильованого субстрату. Тому протеїнкіназну активність можна визначити за збільшенням величини TR-FRET.

6.9.6. Визначення активності 2'-фосфодіестерази

Ефекти 2',5'-олігоаденілатів у клітинах є короткотривалими. 2'-фосфодіестераза – це екзорибонуклеаза, яка розщеплює 2',5'-фосфодіестерні зв'язки у 2',5'-олігоаденілатах з утворенням 5'-АМФ із 2'-кінця та 5'-АТФ із 5'-кінця олігонуклеотидного ланцюга. Загальна схема гідролізу олігоаденілату на прикладі "корового" (позбавленого кінцевих фосфатних залишків) тримеру A2'pA2'pA виглядає таким чином:



Як було вказано раніше, 2',5'-ОА активує РНКазу L, яка руйнує вірусну або клітинну РНК і тим самим пригнічує формування нових вірусних часток та інгібує клітинну проліферацію. Оскільки 2'-фосфодіестераза, розщеплюючи 2',5'-ОА, припиняє його дію, це приводить до інактивації РНКазу L. Тому 2'-фосфодіестераза може регулювати локальну концентрацію 2',5'-ОА та запобігати масовому розпаду клітинної РНК за дії РНКазу L. Надекспресія 2'-фосфодіестерази у клітинах людини пригнічує антипроліферативну активність інтерферонів та двоспіральної РНК. І навпаки, її інгібування посилює противірусну активність інтерферонів. Тому 2'-фосфодіестеразу вважають новою потенційною мішенню для препаратів, які б пригнічували розмноження вірусів або сповільнювали розвиток пухлин.

Активність 2'-фосфодіестерази може бути визначена радіоізотопним методом з використанням хімічно або ферментативно синтезованих олігоаденілатів, мічених за радіоактивним фосфором [^{32}P]2',5'-ОА або вуглецем [^{14}C]2',5'-ОА (Revel, 1981). Ферментативна активність оцінюється за зменшенням вмісту 2',5'-ОА або за вивільненням 5'-АМФ. Утворені продукти розділяють шляхом тонкошарової хроматографії на поліетиленімін-целюлозі, а плями олігомерів візуалізуються авторадіографією. Радіоактивність плям, що відповідають міченим олігоаденілатам або 5'-АМФ, вимірюється при зчитуванні їх у сцинтиляційній рідині. Значення активності ферменту можна також оцінити за зникненням неміченого 2',5'-ОА за допомогою двох підходів:

1. Після інкубації 2'-фосфодіестерази та 2',5'-ОА суміш утворених продуктів аналізують методом HPLC, вміст 2',5'-ОА визначають, вимірюючи поглинання при 260 нм.

2. Продукти гідролізу підлягають хроматографії на PEI-целюлозі, і в елюатах вимірюють поглинання ϵ_{260} .

Визначення активності 2'-фосфодіестерази проводять у клітинному екстракті, а також з використанням очищеного ферменту. Останній підхід застосовується для оцінки чистоти ферментативного препарату при його виділенні із клітин.

Розроблено також нерадіоактивні методи визначення активності 2'-фосфодіестерази за ступенем розщеплення її субстратів

2',5'-ОА: за вмістом аміаку (NH_3 assay) та методом HPLC. Крім цього, для визначення активності ферменту використовують метод аналітичного капілярного ізотахофорезу, що є більш точним, ніж радіоактивні, оскільки дозволяє виміряти нижчі концентрації 2',5'-ОА (Bruchelt, 1994).

6.9.6.1. NH_3 -тест

Ступінь гідролізу 2',5'-олігоаденілату (A2'pA) за дії 2'-фосфодіестерази в методі NH_3 -тест оцінюють за утворенням аміаку, що вивільнюється при перетворенні аденозину (Kubota, 2004). Для цього інкубують 2'-фосфодіестеразу з A2'pA у буфері з бичачим сироватковим альбуміном, фермент розщеплює A2'pA з утворенням аденозину (рис. 6.81).

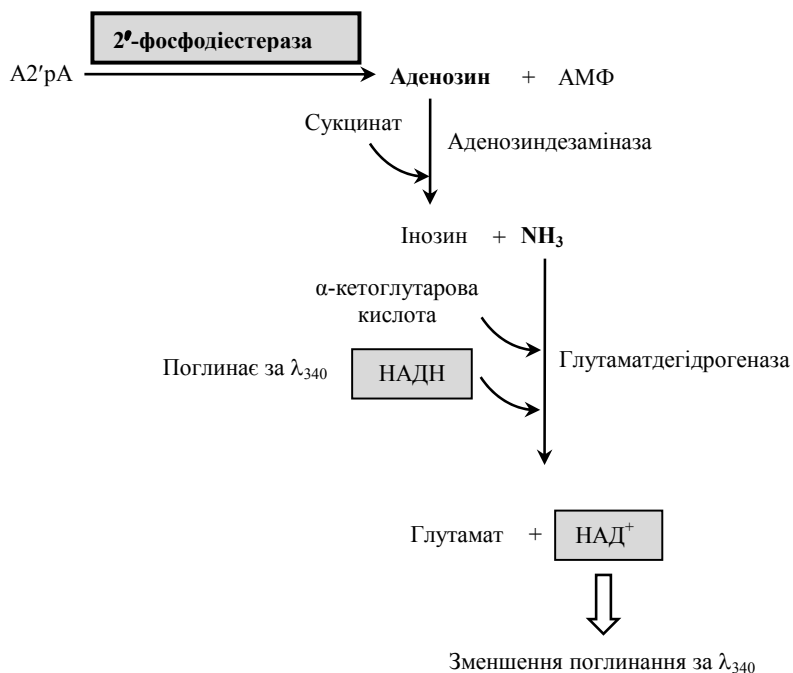


Рис. 6.81. Схема визначення активності 2'-фосфодіестерази за допомогою NH_3 -тесту

При додаванні бурштинової кислоти (сукцинат) за дії аденозиндезамінази утворений аденозин перетворюється на інозин і NH_3 . Кількість утвореного NH_3 оцінюють за допомогою амонієвого тесту (ammonia test). Він полягає в тому, що за присутності NH_3 та α -кетоглутарової кислоти НАДН за дії глутаматдегідрогенази окиснюється до НАД^+ . При цьому оптична густина за довжини 340 нм (поглинання НАДН) або інтенсивність флуоресценції за довжин хвиль $\lambda_{\text{збудж}} / \lambda_{\text{випром}} = 450/360$ нм зменшуються. Це зменшення прямо пропорційне концентрації NH_3 у зразку і, відповідно, активності 2'-фосфодіестерази.

1 Од./мл 2'-фосфодіестеразної активності відповідає концентрації, необхідній для утворення 1 ммоль/л аденозину.

6.9.6.2. Метод HPLC

Активність 2'-фосфодіестерази можна визначити за ступенем гідролізу 2',5'-олігоаденілатів, які ідентифікують методом HPLC (див. підрозд. 6.9.3.1). Для цього паралельно проводять реакцію розщеплення тримеру pppA2'pA2'pA , інкубуючи його з дитіотреїтолом, бичачим сироватковим альбуміном та частково очищеною 2'-фосфодіестеразою (Kubota, 2004). Для інактивації ферменту зразки прогрівають за температури 95 °С, центрифугують і наносять супернатант на колонку С18. Нуклеотиди елюють лінійним градієнтом 0–10% ацетонітрилу. Збирають фракції, у кожній вимірюють оптичну гуστину за довжини хвилі 260 нм. Кожний елюований пік фракціонують та аналізують методом мас-спектрометрії. Піки, що відповідають АМФ і АТФ (продуктам розпаду pppA2'pA2'pA), ідентифікують, порівнюючи зі стандартами (рис. 6.82). Активність 2'-фосфодіестерази визначають, вимірюючи зменшення площини піка, що відповідає pppA2'pA2'pA .

Тример pppA2'pA2'pA інкубували з 2'-фосфодіестеразою за різних проміжків часу (В-Е) і за відсутності ферменту (А). Піки, що відповідають pppA2'pA2'pA , pppA2'pA , АТФ та АМФ, ідентифікували методом мас-спектрометрії, порівнюючи зі стандартами.

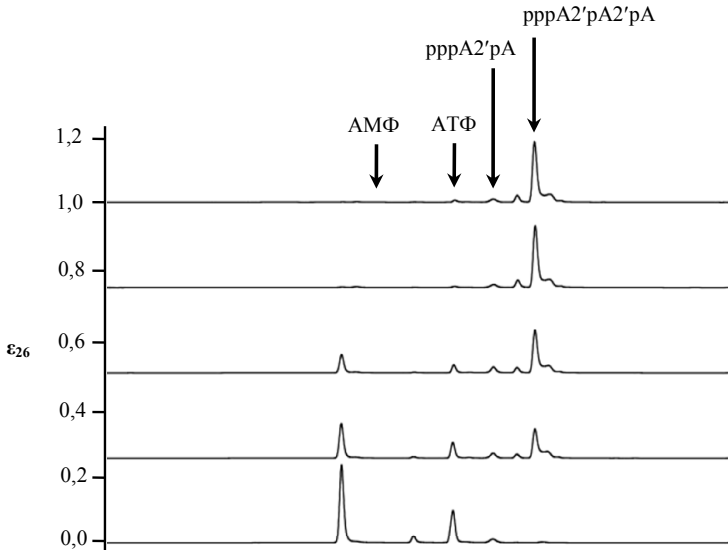


Рис. 6.82. Профіль елюції продуктів деградації тримеру 2',5'-олігоаденілату (pppA2'pA2'pA) за дії 2'-фосфодіестерази з колонки C18 (метод обернено фазової HPLC) (Kubota, 2004)

Контрольні запитання

1. З якою метою при вивченні ферментів сигнальних систем використовується метод імунопреципітації?
2. Чим відрізняється гомогенний імуноферментний аналіз від гетерогенного?
3. Які методи детекції сигналу використовуються в імуноферментному аналізі?
4. Який принцип "сендвіч"-методу радіоімуного аналізу?
5. Які радіоактивні ізотопи використовуються для визначення вмісту цАМФ методом радіорецепторного зв'язування?
6. Наведіть принцип визначення вмісту цАМФ і цГМФ методом AlphaScreen™.
7. Назвіть компоненти систем сигнальної трансдукції, які визначають методом LANCE.

8. Які переваги має метод FlashPlate перед традиційними радіоізотопними методами?
9. Перерахуйте методи, які використовують для визначення аденілатциклази.
10. На чому базується метод SPA та для визначення активності яких ферментів сигнальних систем він використовується?
11. Які методи застосовують для визначення активності протеїнкіназ?
12. Яким чином здійснюють детекцію сигналу в методі SignaTECT?
13. Який фізичний показник вимірюють біолюмінесцентним методом Glo™?
16. Назвіть донори й акцептори, що використовуються при дослідженні компонентів сигнальних систем методом HTRF.
17. Укажіть методи, які використовуються для вивчення концентрації внутрішньоклітинного кальцію.
18. Які переваги має метод Cell-Based ELISA порівняно з іншими методами?

Список літератури

Bailey G. S. Radioimmunoassay of peptides and proteins / G. S. Bailey // *Methods Mol. Biol.* – 1994. – Vol. 32. – P. 449–459.

Bredt D. S. A simple, sensitive, and specific radioreceptor assay for inositol 1,4,5-trisphosphate in biological tissues / D. S. Bredt, R. J. Mourey, S. H. Snyder // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1989. – Vol. 159, № 3. – P. 976–982.

Brune M. A fluorescent sensor of the phosphorylation state of nucleoside diphosphate kinase and its use to monitor nucleoside diphosphate concentrations in real time / M. Brune, J. E. Corrie, M. R. Webb // *Biochemistry.* – 2001. – Vol. 40, № 16. – P. 5087–5094.

Chan P. S. Isolation of cyclic AMP by inorganic salt coprecipitation / P. S. Chan, M. C. Lin // *Methods Enzymol.* – 1974. – Vol. 38. – P. 38–41.

Volker T. T. Radioimmunoassay of cyclic AMP can provide a highly sensitive assay for adenylate cyclase, even at very high ATP concentrations / T. T. Volker, O. M. Viratelle, M. A. Delaage // *Anal. Biochem.* – 1985. – Vol. 144, № 2. – P. 347–355.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ ДЛЯ НАПИСАННЯ ДИПЛОМНИХ РОБІТ

Биологические мембраны. Методы / Под ред. Дж. Б. Финдлея, У. Г. Эванза. – М. : Мир, 1990. – 424 с.

Болдырев А. А. Биомембранология : учеб. пособ. / А. А. Болдырев, Е. И. Кяйвярайнен, В. А. Илюха. – Петрозаводск : Изд-во Кар. НЦ РАН, 2006. – 226 с.

Власова С. Н. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С. Н. Власова, Е. И. Шабунина, И. А. Перслегина // Лаб. дело. – 1990. – № 8. – С. 19–22.

Геннис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции / Р. Геннис. – М. : Мир, 1997. – 624 с.

Иванов А. Б. Растровый метод локализации нанометровых областей активности в фазовых изображениях клеток / А. Б. Иванов, А. В. Кретушев, П. С. Игнатьев // Российские нанотехнологии. – 2007. – Вып. 2, № 5–6 (июнь). – С. 120–125.

Кагава Я. Биомембраны / Я. Кагава ; под ред. В. Е. Кагана. – М. : Высш. шк., 1985. – 303 с.

Оковитый С. В. Клиническая фармакология антиоксидантов / С. В. Оковитый // Клиническая фармакология. Избранные лекции. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 602 с.

Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

Костюк В. А. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Е. Ф. Лунец // Вопр. мед. химии. – 1984. – № 4. – С. 125–127.

Кравцов А. В. Механизмы регуляции векторных ферментов биомембран / А. В. Кравцов, И. Р. Алексеенко. – К. : Наук. думка, 1990. – 174 с.

Курський М. Д. Біомембранологія : навч. посіб. / М. Д. Курський, С. М. Кучеренко. – К. : Вища шк., 1993. – 260 с.

Остапченко Л. І. Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій : навч. посіб. / Л. І. Остапченко, І. В. Михайлик. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2006. – 215 с.

Рыбальченко В. К. Структура и функции мембран. Практикум / В. К. Рыбальченко, М. М. Коганов. – К. : Вища шк., 1988. – 312 с.

Сирота Т. В. Новый поход в исследовании процесса аутоокиснения адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы / Т. В. Сирота // Вопросы мед. хим. – 1999. – № 3. – С. 36–42.

Тычинский В. П. Когерентная фазовая микроскопия внутриклеточных процессов / В. П. Тычинский // Успехи физических наук. – 2001. – Т. 171, № 6. – С. 649–662.

Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 578–681.

Akbarzadeh A. Liposome: classification, preparation, and applications / A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran // Nanoscale Res. Lett. – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 102.

Alvarez R. A single column method for the assay of adenylate cyclase. / R. Alvarez, D. V. Daniels // Anal Biochem. – 1990. – Vol 187(1) – P. 98–103.

Anholt R. Stabilization of acetylcholine receptor channels by lipids in cholate solution and during reconstitution in vesicles / R. Anholt, J. Lindstrom, M. Montal // J. Biol. Chem. – 1981. – Vol. 256. – P. 4377–4387.

Arnold T. Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins / T. Arnold, D. Linke // BioTechniques. – 2007. – Vol. 43. – P. 427–440.

Babiychuk E. B. Regulation of ecto-5'-nucleotidase activity via Ca²⁺-dependent, annexin 2-mediated membrane rearrangement? / E. B. Babiychuk, A. Draeger // Biochem. Soc. Trans. – 2006. – Vol. 34, Pt. 3. – P. 374–376.

Bangham A. D. Negative staining of phospholipids and their structured modification by surface agents as observed in the electron microscope / Bangham A. D., Home R. W. // *J. Molec. Biol.* – 1964. – Vol. 8. – P. 660–668.

Bayburt T. H. Self-assembly of single integral membrane proteins into soluble nanoscale phospholipid bilayers / T. H. Bayburt, S. G. Sligar // *Protein Sci.* – 2003. – Vol. 12 (11). – P. 2476–2481.

Bhairi S. M. Detergents. A guide to the properties and uses of detergents in biological systems / S. M. Bhairi. – New York, 2001. – 41 p.

Blackie E. J. Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy of nonresonant molecules / E. J. Blackie, E. C. Le Ru, P. G. Etchegoin // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 131, № 40. – P. 14466–14472.

Blount M. A. Binding of tritiated sildenafil, tadalafil, or vardenafil to the phosphodiesterase-5 catalytic site displays potency, specificity, heterogeneity, and cGMP stimulation / M. A. Blount, A. Beasley, R. Zoraghi // *Mol. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 66 (1). – P. 144–152.

Breusing N. An inter-laboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples / N. Breusing, T. Grune, L. Andrisic // *Free Radic Res.* – 2010. – Vol. 44, № 10. – P. 1203–1215.

Brooker G. Radioimmunoassay of cyclic AMP and cyclic GMP / G. Brooker, J. F. Harper, W. L. Terasaki // *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* – 1979. – Vol. 10. – P. 1–33.

Bruchelt G. Determination of 2-5A synthetase and 2-5A phosphodiesterase in neuroblastoma cells by analytical capillary isotachopheresis: effects of cytokines and comparison with radio-enzymatic methods / G. Bruchelt, M. Budenbender, K. H. Schmidt // *Electrophoresis.* – 1994. – Vol. 15 (1). – P. 40–45

Bruchelt G. Determination of 2'-5'-oligoadenylate synthetase in serum and peripheral blood mononuclear cells before and after subcutaneous application of recombinant interferon beta and gamma / G. Bruchelt, G. Fierlbeck, U. Schiebel // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* – 1992, Sep. – Vol. 30 (9). – P. 521–528.

Cailla H. L. Adenosine 3',5' cyclic monophosphate assay at 10–15 mole level. / H. L. Cailla, M. S. Racine-Weisbuch, M. A. Delaage // *Anal. Biochem.* – 1973. – Vol. 56 (2). – 394–407.

Carafoli E. The calcium pumping ATPase of the plasma membrane / E. Carafoli // *Annu. Rev. Physiol.* – 1991. – Vol. 53. – P. 531–547.

Casnellie J. E. Assay of protein kinases using peptides with basic residues for phosphocellulose binding. / J. E. Casnellie. // *Meth. Enzymol.* – 1991. – Vol. 200. – 115–120.

Catalá A. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the "Fluid Mosaic Model" to the "Lipid Whisker Model" / A. Catalá // *Biochimie.* – 2012. – Vol. 94, № 1. – P. 101–109.

Challiss R. A. Mass measurements of inositol(1,4,5)trisphosphate in rat cerebral cortex slices using a radioreceptor assay: effects of neurotransmitters and depolarization / R. A. Challiss, I. H. Batty, S. R. Nahorski // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1988. – Vol. 157 (2). – 684–691.

Chang H. I. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy / H. I. Chang, M. K. Yeh // *Int. J. Nanomed.* – 2012. – Vol. 7. – P. 49–60.

Chebath J. Four different forms of interferon-induced 2',5'-oligo(A) synthetase identified by immunoblotting in human cells / J. Chebath, P. Benech, A. Hovanessian // *J. Biol. Chem.* – 1987. – Vol. 262, № 8. – P. 3852–3857.

Chen S. J. Studies with synthetic peptide substrates derived from the neuronal protein neurogranin reveal structural determinants of potency and selectivity for protein kinase C. / S. J. Chen, E. Klann, M. C. Gower // *Biochemistry.* – 1993. – Vol. 32. – P. 1032–1039.

Cherezov V. Lipidic cubic phase technologies for membrane protein structural studies / // *Curr Opin Struct. Biol.* – 2011, Aug. – Vol. 21 (4) – P. 559–566.

Czerski L. Functionality of a membrane protein in bicelles / L. Czerski, C. R. Sanders // *Anal. Biochem.* – 2000. – Vol. 284, № 2. – P. 327–333.

Christian D. A. Particle-mediated delivery of cytokines for immunotherapy / D. A. Christian, C. A. Hunter // *Immunotherapy.* – 2012 – Vol. 4, № 4. – P. 425–441.

Clausen T. Na⁺-K⁺ pump regulation and skeletal muscle contractility / T. Clausen // *Physiol. Rev.* – 2003. – Vol. 83. – P. 1269–1324.

Cogan E. B. A robotics-based automated assay for inorganic and organic phosphates / E. B. Cogan, G. B. Birrell, O. H. Griffith // *Anal Biochem.* – 1999, Jun 15/ – Vol. 271 (1). – P. 29–35.

Demetzos C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability / C. Demetzos // *J. Liposome Res.* – 2008. – Vol. 18, № 3. – P. 159–173.

Di Leva F. The plasma membrane Ca^{2+} ATPase of animal cells: structure, function and regulation / F. Di Leva, T. Domi, L. Fedrizzi // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2008. – Vol. 476, № 1. – P. 65–74.

Downes A. Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine / A. Downes, A. Elfick // *Sensors (Basel)*. – 2010. – Vol. 10 (3). – 1871–1889.

Eapen M. S. Evaluation of nonradioactive cell-free cAMP assays for measuring in vitro phosphodiesterase activity / M. S. Eapen, R. Sodhi, G. Balakrishnan // *Pharmacology*. – 2010. – Vol. 85 (5). – 280–285.

Fang J. Y. Nano- or submicron-sized liposomes as carriers for drug delivery / J. Y. Fang // *Chang Gung Med. J.* – 2006. – Vol. 29, № 4. – P. 358–362.

Fiske, Y. The colorimetric determination of phosphorous / Fiske, Y. Subbarow // *J. Biol. Chem.* – 1925. – Vol. 66. – P. 375–400.

Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. Folch, M. Lees, Stanley G. H. Sloane // *J. Biol. Chem.* – 1957. – Vol. 226. – P. 497–509.

Fonseca M. J. Liposome-mediated targeting of enzymes to cancer cells for site-specific activation of prodrugs: comparison with the corresponding antibody-enzyme conjugate / M. J. Fonseca, J. C. Jagtenberg, H. J. Haisma // *Pharm. Res.* – 2003. – Vol. 20, № 3. – P. 423–428.

Forster R. J. Electrogenerated chemiluminescence / R. J. Forster, P. Bertocello, T. E. Keyes // *Annu Rev. Anal. Chem.* – 2009. – Vol. 2. – P. 359–385.

Fotiadis D. Atomic force microscopy for the study of membrane proteins / D. Fotiadis // *Curr. Opin. Biotechnol.* – Vol. 67. – P. 481–507.

Gabizon A. A. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin / A. A. Gabizon, H. Shmeeda, Y. Barenholz // *Clin. Pharmacokinet.* – 2003. – Vol. 42. – P. 419–436.

Gaines G. L. Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces / G. L. Gaines. – New York, 1966.

Gardner K. H. The use of 2H , ^{13}C , ^{15}N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins / K. H. Gardner,

L. E. Kay // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 1998. – Vol. 27. – P. 357–406.

Gaspar M. M. Biological characterization of L-asparaginase liposomal formulations / M. M. Gaspar, R. Perez-Soler, M. E. Cruz // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 1996. – Vol. 38, № 4. – P. 373–377.

Gawrisch K. Novel NMR tools to study structure and dynamics of biomembranes / K. Gawrisch, N. V. Eldho, I. V. Polozov // *Chem. Phys. Lipids.* – 2002. – Vol. 116. – P. 135–151.

Gilman A. G. A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate / A. G. Gilman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1970. – 67 (1). – P. 305–312.

Glück J. M. Nanodiscs allow the use of integral membrane proteins as analytes in surface plasmon resonance studies / J. M. Glück, B. W. Koenig, D. Willbold // *Anal. Biochem.* – 2011. – Vol. 408 (1) – P. 46–52.

Goswami B. B. A simplified method for the production of recombinant baculovirus / B. B. Goswami, R. I. Glazer // *Bio-techniques.* – 1991. – Vol. 10 (5). – P. 626–630.

Goueli B. S. A novel and simple method to assay the activity of individual protein kinases in a crude tissue extract / B. S. Goueli, K. Hsiao, S.A. Goueli // *Methods Mol. Med.* – 2001. – Vol. 39. – P. 633–644.

Goueli B. S. A novel and simple method to assay the activity of individual protein kinases in a crude tissue extract / B. S. Goueli, K. Hsiao, A. Tereba // *Anal. Biochem.* – 1995. – Vol. 225. – P. 10–17.

Gutteridge J. M. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems / J. M. Gutteridge, B. Halliwell // *Trends Biochem. Sci.* – 1990. – Vol. 15. – P. 129–135.

Grange R. D. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays / R. D. Grange, J. P. Thompson, D. G. Lambert // *Br. J. Anaesth.* – 2014, Feb. – Vol. 112 (2). – P. 213–216.

Hagerhall C. Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme / C. Hagerhall // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – Vol. 1320, № 2. – P. 107–141.

Hammes A. Differentiation-specific isoform mRNA expression of the calmodulin-dependent plasma membrane Ca(2⁺)-ATPase / A. Hammes, S. Oberdorf, E. E. Strehler // *FASEB J.* – 1994. – Vol. 8. – P. 428–435.

Harder T. Selective accumulation of raft-associated membrane protein LAT in T cell receptor signaling assemblies / T. Harder, M. Kuhn // *J. Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 151 (2). – P. 199–208.

Hauschild S. Direct preparation and loading of lipid and polymer vesicles using inkjets / S. Hauschild, U. Lipprandt, A. Rumplecker // *Small.* – 2005. – Vol. 1, № 12. – P. 1177–1180.

Hawes B. E. Protein tyrosine kinase activity assays / B. E. Hawes, T. Biesen, van. *Curr. Protoc. Pharmacol.* – 2001. – Chapter 3, Unit 3.5. – P. 3.5.1–3.5.18.

Heberle F. A. Model-based approaches for the determination of lipid bilayer structure from small-angle neutron and X-ray scattering data / F. A. Heberle, J. Pan, R. F. Standaert // *Eur. Biophys J.* – 2012. – Vol. 41 (10). – P. 875–890.

Heinz W. F. Relative surface charge mapping with the atomic force microscopy / W. F. Heinz, J. H. Hoh // *Biophys. J.* – 1999. – Vol. 76. – P. 528–538.

Heinz W. F. Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope / W. F. Heinz, J. H. Hoh // *Trends Biotechnol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 143–150.

Hemmila I. LANCE™: Homogeneous Assay Platform for HTS. / I. Hemmila // *J. Biomol. Screen.* – 1999. – Vol. 4 (6). – P. 303–308.

Henderson R. M. Lipid rafts: feeling is believing / R. M. Henderson, J. M. Edwardson, N. A. Geisse // *News Physiol. Sci.* – 2004. – Vol. 19 – P. 39–43.

Hersh C. L. Preparation, characterization and use of an antiserum specific for 2',5'-oligoadenylates / C. L. Hersh, T. R. Reid, R. Freidman // *J. Biol. Chem.* – 1984. – Vol. 259, № 3. – P. 1727–1730.

Hidaka Y. 5'-nucleotidase / Y. Hidaka // *Nihon Rinsho.* – 2003. – Vol. 61, Suppl. 1. – P. 81–84.

Hodges M. D. Combining immunolabeling and surface-enhanced Raman spectroscopy on cell membranes / M. D. Hodges, J. G. Kelly, A. J. Bentley // *ACS Nano.* – 2011. – Vol. 5, № 12. – P. 9535–9541.

Holley A. Measuring free radical reactions in vivo / A. Holley, K. Cheeseman // *Br. Med. Bull.* – 1993. – Vol. 49. – P. 494–505.

Hubbell W. L. Identifying conformational changes with site-directed spin labeling / W. L. Hubbell, D. S. Cafiso, C. Altenbach // *Nat. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 7. – P. 735–739.

Hussain S. A. An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) [*Online*] / S. A. Hussain // *Sci. J. of Physics*. – 2012. – Available from: <http://www.sjpub.org/sjp.html>

Immordino M. L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential / M. L. Immordino, F. Dosio, L. Cattal // *Int. J. Nanomed.* – 2006. – Vol. 1, № 3. – P. 297–315.

Jahn A. Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size / A. Jahn, W. N. Vreeland, D. L. DeVoe // *Langmuir*. – 2007. – Vol. 23. – № 11. – P. 6289–6293.

Jessup W. Iodometric determination of hydroperoxides in lipids and proteins m / W. Jessup, R. Dean, J. Gebicki // *Meth. Enzymol.* – 1994. – Vol. 233. – P. 289–303.

Johansson L. C. Membrane protein crystallization from lipidic phases / L. C. Johansson, A. B. Wöhri, G. Katona // *Curr Opin Struct. Biol.* – 2009. – Vol. 19 (4). – P. 372–378.

Jorgensen P. L. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions / P. L. Jorgensen, K. O. Hakansson, S. J. Karlish // *Annu. Rev. Physiol.* – 2003. – Vol. 65. – P. 817–849.

Joseph J. S. Characterization of lipid matrices for membrane protein crystallization by high-throughput small angle X-ray scattering / J. S. Joseph, W. Liu, J. Kunken // *Methods*. – 2011, Dec. – Vol. 55 (4). – P. 342–349.

Jung S. H. Molecular imaging of membrane proteins and microfilaments using atomic force microscopy / S. H. Jung, D. Park, J. H. Park // *Exp. Mol. Med.* – 2010. – Vol. 42, № 9. – P. 597–605.

Justensen J. Spectrophotometric pyrophosphate assay of 2',5'-oligoadenylate synthetase / J. Justensen, N. O. Kjeldgaard // *Anal. Biochem.* – 1992. – Vol. 207, № 1. – P. 90–93.

Kamps J. A. Uptake of long-circulating immunoliposomes, directed against colon adenocarcinoma cells, by liver metastases of colon cancer / J. A. Kamps, G. A. Koning, M. J. Velinova // *J. Drug. Targ.* – 2000. – Vol. 8, № 4. – P. 235–245.

Kaneda Y. Virosomes: evolution of the liposome as a targeted drug delivery system / Y. Kaneda // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2000. – Vol. 43. – P. 197–205.

Karczewski P. A sensitive method for the assay of guanylate cyclase activity / P. Karczewski, E. G. Krause // *Acta Biol. Med. Ger.* – 1978. – Vol. 37. – P. 961–967.

Karege F. A non-radioactive assay for the cAMP-dependent protein kinase activity in rat brain homogenates and age-related changes in hippocampus and cortex / F. Karege, M. Schwald, C. Lambercy // *Brain Res.* – 2001, Jun. 8. – Vol. 903(1-2). – P. 86–93.

Kim H. J. Recent advances in the application of solution NMR spectroscopy to multi-span integral membrane proteins / H. J. Kim, S. C. Howell, W. D. Horn, van // *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* – 2009. – Vol. 55, № 4. – P. 335–360.

Kynde S. A. Small-angle scattering gives direct structural information about a membrane protein inside a lipid environment / S. A. Kynde, N. Skar-Gislinge, M. C. Pedersen // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2014. – Vol. 70 (Pt. 2). – P. 371–383.

Kohn H. I. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione / H. I. Kohn, M. Liversedge // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1944. – Vol. 82. – P. 292 – 300.

Kubota K. Identification of 2'-phosphodiesterase, which plays a role in the 2-5A system regulated by interferon / K. Kubota, K. Nakahara, T. Ohtsuka // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279 (36). – P. 37832–37841.

Kuo J. F. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. 8. An assay method for the measurement of adenosine 3',5'-monophosphate in various tissues and a study of agents influencing its level in adipose cells. / J. F. Kuo, P. Greengard // *J. Biol. Chem.* – 1970. – Vol. 245(16). – P. 4067–4073.

Kuusksalu A. Identification of the reaction products of (2'-5')oligoadenylate synthetase in the marine sponge / A. Kuusksalu, J. Subbi, T. Pehk // *Eur. J. Biochem.* – 1998. – Vol. 257, № 2. – P. 420–426.

Lasic D. D. Sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery / D. D. Lasic, J. J. Vallner, P. K. Working // *Curr. Opin. Mol. Ther.* – 1999. – Vol. 1. – P. 177–185.

Le Du M. H. Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution / M. H. Du, le T. Stigbrand, M. J. Taussig // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 9158–9165.

Lequin R. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) / R. Lequin // *Clin. Chem.* – 2005. – Vol. 51 (12). – P. 2415–8.

Li C. A novel method for the preparation of liposomes: freeze drying of monophasic solutions / C. Li, Y. Deng // *J. Pharm. Sci.* – 2004. – Vol. 93, № 6. – P. 1403–1414.

Lipfert J. Size and shape of detergent micelles determined by small-angle X-ray scattering / J. Lipfert, L. Columbus, V. B. Chu // *J. Phys. Chem. B.* – 2007. – Vol. 111, № 43. – P. 12427–12438.

Liu W. Quantification of F2-isoprostanes as a reliable index of oxidative stress in vivo using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method / W. Liu, J. D. Morrow, H. Yin // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 47, № 8. – P. 1101–1107.

Liu Z. Q. Western blot: technique, theory and trouble shooting / Z. Q. Liu, T. Mahmood, P. C. Yang // *N. Am. J. Med. Sci.* – 2014. – Vol. 6 (3). – P. 160.

Lorenz U. Protein tyrosine phosphatase assays. / U. Lorenz // *Curr. Protoc. Immunol.* – 2011. – Chap. 11. – P. Unit 11.7.

MacNeil S. Evidence that calmodulin may be involved in phytohaemagglutinin-stimulated lymphocyte division / S. MacNeil, S. Walker, B. L. Brown // *Biosci. Rep.* – 1982. – Vol. 2. – P. 891–897.

Mahmood T. Western blot: technique, theory, and trouble shooting / T. Mahmood, P. C. Yang // *N. Am. J. Med. Sci.* – 2012, Sep. – Vol. 4 (9). – P. 429–434.

Mamikunian G. Modern laboratory evaluation of peptide and amines: a continuing role for radioimmunoassay? / G. Mamikunian // *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* – 2011. – Vol. 40 (1). – P. 135–151.

Martins S. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery—liposomes versus lipid nanoparticles / S. Martins, B. Sarmento, D. C. Ferreira // *Int. J. Nanomedic.* – 2007. – Vol. 2, № 4. – P. 595–607.

Matsuura M. Polycation liposome-mediated gene transfer in vivo / M. Matsuura, Y. Yamazaki, M. Sugiyama // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2003. – Vol. – P. 1612, № 2. – P. 136–143.

Meure L. A. Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review / L. A. Meure, N. R. Foster, F. Dehghani // *AAPS PharmSciTech.* – 2008. – Vol. 9, № 3. – P. 798–809.

Miao D. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage / D. Miao, A. Scutt // *J. Histochem. Cytochem.* – 2002. – Vol. 50. – P. 333–340.

Miele M. B. Fractionation and characterization of 2',5'-oligoadenylates by polyacrylamide gel electrophoresis: an alternative method for assaying 2',5'-oligoadenylate synthetase / M. B. Miele, D. K. Liu, N. C. Kan // *J. Interferon Res.* – 1991. – Vol. 11, № 1. – P. 33–40.

Milne G. L. Quantification of F2-isoprostanes as a biomarker of oxidative stress / G. L. Milne, S. C. Sanchez, E. S. Musiek // *Nat. Protoc.* – 2007. – Vol. 2, № 1. – P. 221–226.

Mitra N. Nanodiscs: Membrane protein research in near-native conditions / Mitra N. // *Mater. Methods.* – 2013. – Vol. 3. – P. 177

Miyawaki A. Development of probes for cellular functions using fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer / A. Miyawaki // *Annu. Rev. Biochem.* – 2011. – Vol. 80. – P. 357–373.

Miyazawa T. Determination of phospholipid hydroperoxides using luminol chemiluminescence – high-performance liquid chromatography / T. Miyazawa, K. Fujimoto, T. Suzuki // *Methods Enzymol.* – 1994. – Vol. 233. – P. 324–332.

Möbius K. High-field EPR on membrane proteins – crossing the gap to NMR / K. Möbius, W. Lubitz, A. Savitsky // *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* – 2013. – Vol. 75. – P. 1–49.

Montalibet J. Protein tyrosine phosphatase: enzymatic assays / J. Montalibet, K. I. Skorey, B. P. Kennedy // *Methods.* – 2005, Jan. – Vol. 35 (1). P. 2–8.

Moore K. 2 nd. Measurement of lipid peroxidation / K. Moore, L. J. Roberts // *Free Radic. Res.* – 1998. – Vol. 28. – P. 659–671.

Morrow J. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism / J. Morrow, K. Hill, Roberts L.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – Vol. 87(23). – P. 9383–9387.

Morth J. P. Crystal structure of the sodium-potassium pump / J. P. Morth, B. P. Pedersen, M. S. Toustrup-Jensen // *Nature.* – 2007. – Vol. 450. – P. 1043–1049.

Nath A. Allosteric effects on substrate dissociation from cytochrome P450 3A4 in nanodiscs observed by ensemble and

single-molecule fluorescence spectroscopy / A. Nath, P. K. Koo, E. Rhoades // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – Vol. 130 (47). – P. 15746–15747.

Nishikata M. A phosphotyrosine-containing quenched fluorogenic peptide as a novel substrate for protein tyrosine phosphatases / M. Nishikata, K. Suzuki, Y. Yoshimura // *Biochem J.* – 1999. – Vol. 343, № 2. – P. 385–391.

Nwaneshiudu A. Introduction to confocal microscopy / A. Nwaneshiudu, C. Kuschal, F. H. Sakamoto // *J. Invest. Dermatol.* – 2012, Dec. – Vol. 132 (12). – P. e3.

Okamoto C. T. Vesicular trafficking machinery, the actin cytoskeleton, and H⁺-K⁺-ATPase recycling in the gastric parietal cell / C. T. Okamoto, G. John // *J. Physiol.* – 2001. – Vol. 532, № 2. – P. 287–296.

Ong C. N. The in vitro and in vivo effects of lead on delta-aminolevulinic acid dehydratase and pyrimidine 5'-nucleotidase / C. N. Ong, Y. M. Kong, H. Y. Ong // *Pharmacol. Toxicol.* – 1990. – Vol. 66, № 1. – P. 23–26.

Oreopoulos J. Spinning-disk confocal microscopy: present technology and future trends / J. Oreopoulos, R. Berman, M. Browne // *Methods Cell Biol.* – 2014. – Vol. 123. – P. 153–175.

Osborn K. D. Single-molecule dynamics of the calcium-dependent activation of plasma-membrane Ca²⁺-ATPase by calmodulin / K. D. Osborn, A. Zaidi, A. Mandal // *Biophys. J.* – 2004. – Vol. 87, № 3. – P. 1892–1899.

Ostrom R. S. The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology / R. S. Ostrom, P. A. Insel // *Br. J. Pharmacol.* 2004. – Vol. 143 (2). – P. 235–245.

Padh H. Organelle isolation and marker enzyme assay / H. Padh // *Proceedings of the 13th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE).* – 1992. – Vol. 13. – P. 129–146.

Pan X. Q. Antitumor activity of folate receptor-targeted liposomal doxorubicin in a KB oral carcinoma murine xenograft model / X. Q. Pan, H. Wang, R. J. Lee // *Pharmacol. Res.* – 2003. – Vol. 20. – P. 417–422.

Panchuk-Voloshina N. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates / N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, J. Bishop-Stewart // *J. Histochem. Cytochem.* – 1999, Sep. – Vol. 47 (9). – P. 1179–1188.

Patel D. V. Quantitative analysis of in vivo confocal microscopy images: a review / D. V. Patel, C. N. McGhee // *Surv. Ophthalmol.* – 2013, Sep.-Oct. – Vol. 58 (5). – P. 466–475.

Pietta P. G. Assay of soluble guanylate cyclase activity by isocratic high-performance liquid chromatography / P. G. Pietta, P. L. Mauri, C. Gardana // *J. Chromatograf. B. Biomed. Sci. Appl.* – 1997. – Vol. 690. – P. 343–347.

Picas L. Atomic force microscopy: a versatile tool to probe the physical and chemical properties of supported membranes at the nanoscale / L. Picas, P. E. Milhiet, J. Hernández-Borrell // *Chem. Phys. Lipids.* – 2012. – Vol. 165, № 8. – P. 845–860.

Pike L. J. Lipid rafts: bringing order to chaos / L. J. Pike // *J. Lipid Res.* – 2003. – Vol. 44(4). – P. 655–667.

Pindel A. The role of protein kinase R in the interferon response / A. Pindel, A. Sadler // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2011, Jan. – Vol. 31 (1). – P. 59–70.

Poget S. F. Isotropic bicelles stabilize the functional form of a small multidrug-resistance pump for NMR structural studies / Poget S. F., Cahill S. M., Girvin M. E. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – Vol. 129, № 9. – P. 2432–2433.

Poole C. F. *Gas Chromatography* / C. F. Poole. – Elsevier, 2012. – 743 p.

Post S. R. Biochemical methods for detection and measurement of cyclic AMP and adenylyl cyclase activity / S. R. Post, R. S. Ostrom, P. A. Insel // *Methods Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 126. – P. 363–374.

Quinn P. J. A lipid matrix model of membrane raft structure / P. J. Quinn // *Progress in Lipid Res.* – 2010. – Vol. 49. – P. 390–406.

Ram P. Magnetic field induced ordering of bile salt/phospholipid micelles: new media for NMR structural investigations / P. Ram, J. H. Prestegard // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1988. – Vol. 940, № 2. – P. 289–294.

Reid T. R. Analysis of 2',5'-oligoadenylates in cells and tissues / T. R. Reid, C. L. Hersh, J. N. Kerr // *Anal. Biochem.* – 1984. – Vol. 136. – P. 136–141.

Revel M. Interferon-induced enzymes: microassays and their applications: purification and assay of (2'-5')-oligoadenylate synthetase and assay of 2'-phosphodiesterase / M. Revel, D. Wallach, G. Merlin // *Methods Enzymol.* – 1981. – Vol. 79, Pt. B. – P. 149–161.

Riviere K. Antitumor effect of folate-targeted liposomal doxorubicin in KB tumor-bearing mice after intravenous administration / K. Riviere, Z. Huang, K. Jerger // *J. Drug Target.* – 2011. – Vol. 19, № 1. – P. 14–24.

Rustin P. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme / P. Rustin, A. Munnich, A. Rötig // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2002. – Vol. 10, № 5. – P. 289–291.

Rutter J. Succinate dehydrogenase – assembly, regulation and role in human disease / J. Rutter, D. R. Winge, J. D. Schiffman // *Mitochondrion.* – 2010. – Vol. 10, № 4. – P. 393–401.

Sachs G. The gastric H,K ATPase as a drug target: past, present, and future / G. Sachs, J. M. Shin, O. Vagin // *J. Clin. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 41 (2). – P. S226–242.

Saga K. Virosome presents multimodel cancer therapy without viral replication / K. Saga, Y. Kaneda // *Biomed. Res. Int.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 764706.

Sahu I. D. Use of electron paramagnetic resonance to solve biochemical problems / I. D. Sahu, R. M. McCarrick, G. A. Lorigan // *Biochemistry.* – 2013. – Vol. 52 (35). – P. 5967–5984.

Salomon Y. A highly sensitive adenylate cyclase assay / Y. Salomon, C. Londos, M. Rodbell // *Anal. Biochem.* – 1974, Apr. – Vol. 58 (2). – P. 541–548.

Sapra P. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs / P. Sapra, T. M. Allen // *Prog. Lipid Res.* – 2003. – Vol. 42. – P. 439–462.

Sarkar D. P. Targeted gene delivery by virosomes / D. P. Sarkar, K. Ramani, S. K. Tyagi // *Methods Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 199. – P. 163–173.

Sarkar S. N. Assays for the interferon-induced enzyme 2',5' oligoadenylate synthetases / S. N. Sarkar, M. Pandey, G. C. Sen // *Methods Mol. Med.* – 2005. – Vol. 116. – P. 81–101.

Sarpietro M. G. Differential scanning calorimetry as a tool to investigate the transfer of anticancer drugs to biomembrane model / M. G. Sarpietro, M. L. Accolla, C. Celia // *Curr Drug Targets*. – 2013. – Vol. 14, № 9. – P. 1053–1060.

Sawai H. Sensitive radioimmuno assay for 2',5'-oligoadenylates using a novel 125I-labeled derivative of 2',5'-tradenylate 5'-triphosphate / H. Sawai, K. Ishibashi, M. Itoh // *J. Biochem.* – 1985, Oct. – Vol. 98 (4). – P. 999–1005.

Schilling R. J. A high-throughput assay for cyclic nucleotide phosphodiesterases. / R. J. Schilling, D. R. Morgan, B. F. Kilpatrick // *Anal Biochem.* – 1994. – Vol. 216 (1). – P. 154–158.

Schmid J. A. Fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer (FRET) as tools in signaling research. / J. A. Schmid, A. Birbach // *Thromb Haemost.* – 2007. – Vol. 97 (3). – P. 378–384.

Scotto A.W. Reconstitution of Membrane Proteins. Spontaneous incorporation of integral membrane proteins into preformed bilayers of pure phospholipid / A. W. Scotto, D. Zakim // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1988. – Vol. 263, № 34. – P. 185W–18506.

Segota S. Spontaneous formation of vesicles / S. Segota, D. Tezak // *Adv. Colloid. Interface Sci.* – 2006. – Vol. 121, № 1–3. – P. 51–75.

Shen H.-H. Reconstitution of Membrane Proteins into Model Membranes: Seeking Better Ways to Retain Protein Activities / H. H. Shen, T. Lithgow, L. L. Martin // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14 (1). – P. 1589–1607.

Shi X. Living cell study at the single-molecule and single-cell levels by atomic force microscopy / X. Shi, X. Zhang, T. Xia // *Nanomedicine*. – 2012. – Vol. 7, № 10. – P. 1625–1637.

Shih A. Y. Disassembly of nanodiscs with cholate / A. Y. Shih, Freddolino P. L., Sligar S. G. // *Nano Lett.* – 2007. – Vol. 7 (6). – P. 1692–1696.

Shin J. M. The gastric HK-ATPase: structure, function, and inhibition / J. M. Shin, K. Munson, O. Vagin // *Pflugers Arch.* – 2009. – Vol. 457, № 3. – P. 609–622.

Spickett C. M. Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products / C. M. Spickett, I. Wiswedel, W. Siems // *Free Radic. Res.* – 2010. – Vol. 44, № 10. – P. 1172–1202.

Spink C. H. Differential scanning calorimetry / Spink C. H. // *Methods Cell. Biol.* – 2008. – Vol. 84. – P. 115–141.

Sreerama N. On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra / N. Sreerama, R. W. Woody // *Protein Sci.* – 2004. – Vol. 13, № 1. – P. 100–112.

Steiner A. L. Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. / A. L. Steiner C. W. Parker, D. M. Kipnis // *J. Biol. Chem.* – 1972. – Vol. 247 (4). – P. 1106–1113.

Steiner M. G. Quantitation of the hydroxyl radical by reaction with dimethyl sulfoxide / M. G. Steiner, C. F. Babbs // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1990. – Vol. 278, № 2. – P. 478–481.

Tagami T. Anti-angiogenic therapy via cationic liposome-mediated systemic siRNA delivery / T. Tagami, T. Suzuki, M. Matsunaga // *Int. J. Pharm.* – 2012. – Vol. 422, № 1–2. – P. 280–289.

Takeuchi A. Visualizing the mapped ion pathway through the Na,K-ATPase pump / A. Takeuchi, N. Reyes, P. Artigas // *Channels (Austin)*. – 2009. – Vol. 3, № 6. – P. 383–386.

Tarver A. P. Inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,2-cyclic 4,5-trisphosphate are minor components of total mass of inositol trisphosphate in thrombin-stimulated platelets. Rapid formation of inositol 1,3,4-trisphosphate / A. P. Tarver, W.G. King, S. E. Rittenhouse // *J. Biol. Chem.* – 1987. – Vol. 262 (36). – P. 7268–7271.

Taylor S. C. The design of a quantitative western blot experiment [Online] / S. C. Taylor, A. Posch // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/361590>

Thakur C. S. A convenient and sensitive fluorescence resonance energy transfer assay for RNase L and 2',5' oligoadenylates / C. S. Thakur, Z. Xu, Z. Wang // *Methods Mol. Med.* – 2005. – Vol. 116. – P. 103–113.

Thompson W. J. Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterase and resolution of multiple molecular forms of the enzyme / W. J. Thompson, W. L. Terasaki, P. M. Epstein // *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* – 1979. – Vol. 10. – P. 69–92.

Toomik R. A potential pitfall in protein kinase assay: phosphocellulose paper as an unreliable adsorbent of produced phosphopeptides / R. Toomik, P. Ekman, L. Engstrom // *Anal. Biochem.* – 1992. – Vol. 204. – P. 311–314.

Tong W. B. Establishment of a nonradioactive assay for 2'-5'-oligoadenylate synthetase and its application in chronic hepatitis C patients receiving interferon-alpha / W. B. Tong, C. Y. Zhang, B. F. Feng // *World. J. Gastroenterol.* – 1998. – Vol. 4. – P. 70–73.

Torchilin V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers / V. P. Torchilin // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2005. – Vol. 4, № 2. – P. 145–160.

Tran M. A. Use of liposomes as drug delivery vehicles for treatment of melanoma / M. A. Tran, R. J. Watts, G. P. Robertson // *Pigment cell melanoma Research.* – 2009. – Vol. 22, № 4. – P. 388–399.

Tzitzilonis C. Detergent/nanodisc screening for high-resolution NMR studies of an integral membrane protein containing a cytoplasmic domain / C. Tzitzilonis, C. Eichmann, I. Maslennikov // *PLoS One.* – 2013/ – Vol. 8 (1). – P. e54378.

Verardi R. Isotope labeling for solution and solid-state NMR spectroscopy of membrane proteins / R. Verardi, N. J. Traaseth, L. R. Masterson // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2012. – Vol. 992. – P. 35–62.

Walde P. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications / P. Walde, S. Ichikawa // *Biomol. Eng.* – 2001. – Vol. 18, № 4. – P. 143–177.

Wallace B. A. Analyses of circular dichroism spectra of membrane proteins / B. A. Wallace, J. G. Lees, A. J. Orry // *Protein Sci.* – 2003. – Vol. 12, № 4. – P. 875–884.

Wang X. Advances of Cancer Therapy by Nanotechnology /, Y. Wang, Z. Chen, D. M. Shin // *Cancer Research Treatment.* – 2009. – Vol. 41, № 1. – P. 1–11.

Xiao W. Templeton Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II inhibition by heparin in mesangial cells / W. Xiao, Y. Liu, M. Douglas // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2005. – Vol. 288. – P. F142–F149.

Wewer V. Analysis and quantification of plant membrane lipids by thin-layer chromatography and gas chromatography / V. Wewer, P. Dörmann, G. Hölzl // *Methods in Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 1009. – P. 69–78.

Wiegn P. An enzymatic fluorometric assay for adenylate cyclase activity / P. Wiegn, J. Dutton, K. G. Lurie // *Anal. Biochem.* – 1993. – Vol. 208 (2). – P. 217–222.

Wreschner D. H. Ribosomal RNA cleavage, nuclease activation and 2-5A(ppp(A2'p)nA) in interferon-treated cells / D. H. Wreschner, T. C. James, R. H. Silverman // *Nucleic Acids Res.* – 1981. – Vol. 9 (7). – P. 1571–1581.

Yankovskaya V. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation / V. Yankovskaya, R. Horsefield, S. Törnroth // *Science.* – 2003. – Vol. 299, № 5607. – P. 700–704.

Yin H. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis / H. Yin, L. Xu, N. A. Porter // *Chem. Rev.* – 2011. – Vol. 111, № 10. – P. 5944–5972.

Zadran S. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: visualizing cellular dynamics and bioenergetics / S. Zadran, S. Standley, K. Wong // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 96 (4). – P. 895–902.

Zaluzec N. J. Scanning confocal electron microscopy. / Zaluzec NJ // *Microscop. Microanal.* – 2007. – Vol. 13. – P. 1560–1561.

Zheng J. Spectroscopy-based quantitative fluorescence resonance energy transfer analysis / J. Zheng // *Methods Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 337. – P. 65–77.

Zocher M. Single-molecule force spectroscopy from nanodiscs: an assay to quantify folding, stability, and interactions of native membrane proteins / M. Zocher, C. Roos, S. Wegmann // *ACS Nano.* – 2012. – Vol. 6 (1). – P. 961–971.

Zylińska L. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase in excitable and nonexcitable cells / Zylińska L., Soszyński M. // *Acta Biochim. Pol.* – 2000. – Vol. 47, № 3. – P. 529–539.

Yamamoto Y. Chemiluminescence-based high-performance liquid chromatography assay of lipid hydroperoxides / Y. Yamamoto // *Methods Enzymol.* – 1994. – Vol. 233. – P. 319–324.

Yin H. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis / H. L. Yin Xu, N. A. Porter // *Chem. Rev.* – 2011.– Vol. 111, № 10. – P. 5944–5972.

Wissing S. A. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery / S. A. Wissing, O. Kayser, R. H. Müller // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2004. – Vol. 56, № 9. – P. 1257–1272.

ЗМІСТ

Умовні скорочення україномовних термінів	3
Умовні скорочення англомовних термінів з поясненнями	4
Вступ	4
Розділ 1. Біофізичні методи дослідження мембран і сигнальних шляхів	21
1.1. Електронна мікроскопія.....	21
1.2. Динамічна фазова мікроскопія.....	24
1.3. Лазерна сканувальна конфокальна мікроскопія.....	27
1.4. Мікроспектроскопія комбінаційного розсіювання (раманівська спектроскопія).....	32
1.5. Атомно-силова мікроскопія.....	36
1.6. Флуоресцентна спектроскопія і метод флуоресцентних зондів.....	40
1.6.1. Властивості флуоресцентних зондів та їхнє застосування.....	40
1.6.1.1. Флуоресцентні зонди для вивчення клітинних мембран.....	42
1.6.1.2. Застосування флуоресцентних зондів для дослідження процесів внутрішньоклітинної сигналізації.....	54
1.6.2. Метод AlphaScreen.....	60
1.6.3. Флуоресцентне резонансне перенесення енергії (FRET).....	63
1.6.4. Метод HTRF.....	70
1.6.5. Метод LANCE® Ultra (TR-FRET).....	77
1.7. ЕПР-спектроскопія.....	82
1.8. ЯМР-спектроскопія.....	88
1.9. Рентгенівська і нейтронна спектроскопія.....	97
1.10. Диференційна сканувальна калориметрія.....	103
1.11. Коловий дихроїзм.....	106

Розділ 2. Методи отримання та характеристика мембран клітинних органел.....	112
2.1. Виділення клітинних органел	112
2.2. Маркерні ферменти мембран	115
2.2.1. Na^+, K^+ -АТФаза плазматичних мембран	119
2.2.2. Mg^{2+} -залежна Ca^{2+} -АТФаза плазматичних мембран.....	125
2.2.3. H^+, K^+ -АТФаза плазматичних мембран	131
2.2.4. 5'-Нуклеотидаза плазматичних мембран	134
2.2.5. Лужна фосфатаза плазматичних мембран	137
2.2.6. Сукцинатдегідрогеназа мітохондрій	139
Розділ 3. Методи дослідження мембранних ліпідів.....	145
3.1. Хроматографічні методи	145
3.1.1. Тонкошарова хроматографія.....	145
3.1.2. Газова хроматографія	152
3.2. Імунологічні методи	154
3.3. Методи дослідження мембранних рафтів.....	155
3.4. Методи дослідження процесів пероксидного окиснення ліпідів біологічних мембран	158
3.4.1. Визначення вмісту гідроксильного радикала.....	163
3.4.2. Виявлення пероксильних радикалів і гідропероксидів	164
3.4.3. Виявлення вільних альдегідів (ТБК-активних продуктів).....	165
3.4.4. Визначення основ Шиффа та дієнових кон'югатів	166
3.4.5. Визначення F(2)-ізопростанів	167
3.4.6. Визначення активності антиоксидантних ферментів	168
3.4.6.1. Визначення активності супероксиддисмутази	170
3.4.6.2. Визначення активності каталази	171
3.4.6.3. Визначення активності глутатіонпероксидази	172
3.4.6.4. Визначення активності глутатіон-S-трансферази	172

Розділ 4. Методи дослідження мембранних білків	175
4.1. Солюбілізація мембранних білків за допомогою детергентів	175
4.2. Хроматографічне розділення мембранних білків	187
4.3. Реконструкція мембранних білків	195
Розділ 5. Модельні мембранні системи	213
5.1. Моношари та плоскі бішарові мембрани.....	214
5.2. Ліпосоми	217
5.2.1. Методи отримання ліпосом	221
5.2.2. Використання ліпосом.....	225
5.2.2.1. Довгоіснуючі ліпосоми – ліпосоми- невидимки (stealth liposomes)	227
5.2.2.2. Використання ліпосом для лікування раку ...	229
5.2.2.3. Застосування ліпосом для доставки генів	233
5.2.3. Ліпосоми нового покоління	234
5.2.3.1. Віросоми	234
5.2.3.2. Ліпідні наночастинки	236
5.2.4. Ліпосомальні білки й пептиди	238
5.3. Нанодиски	240
Розділ 6. Методи вивчення ключових компонентів внутрішньоклітинних сигнальних систем	248
6.1. Основні біохімічні методи, що використовуються для дослідження систем трансдукції сигналу	248
6.1.1. Імунопреципітація білків із клітинних екстрактів	248
6.1.2. Імуноферментний аналіз	251
6.1.3. Радіоімунний аналіз	260
6.1.4. Western-блотинг	264
6.2. Вивчення цАМФ-залежної сигнальної системи	268
6.2.1. Визначення вмісту цАМФ.....	268
6.2.1.1. Метод радіорецепторного зв'язування (Radioreceptor Binding Assay)	268
6.2.1.2. Радіоімунний аналіз.....	269
6.2.1.3. Метод колориметричного ELISA	270
6.2.1.4. Метод люмінесцентного ELISA	272
6.2.1.5. Метод AlphaScreen™	272

6.2.1.6. Метод cAMP-Glo™	275
6.2.1.7. Метод HTRF (TR-FRET)	277
6.2.1.8. Метод LANCE	279
6.2.2. Визначення активності аденілатциклази	280
6.2.2.1. Радіоізотопні методи	281
6.2.2.2. Метод FlashPlate	282
6.2.2.3. Ензиматичний флуориметричний метод	284
6.2.2.4. Метод ELISA	286
6.2.3. Визначення активності фосфодіестерази циклічних нуклеотидів	288
6.2.3.1. Метод SPA	289
6.2.3.2. Метод FlashPlate®	291
6.2.3.3. Метод поляризації флуоресценції	293
6.2.3.4. Метод PDE-Glo™	294
6.2.3.5. Метод фосфатного сенсора	296
6.2.3.6. Метод Biomol Green	298
6.2.4. Визначення активності цАМФ-залежної протеїнкінази	299
6.2.4.1. Радіоактивний метод	300
6.2.4.2. Флуориметричний метод PepTag®	303
6.2.4.3. Метод ELISA	305
6.2.4.4. Метод ADP-Glo™	305
6.2.4.5. Метод ProFluor®	307
6.3. Вивчення цГМФ-залежної сигнальної системи	310
6.3.1. Визначення вмісту цГМФ	310
6.3.1.1. Радіоімунний аналіз	310
6.3.1.2. Метод колориметричного ELISA	312
6.3.1.3. Метод люмінесцентного ELISA	312
6.3.1.4. Метод HTRF (TR-FRET)	312
6.3.1.5. Метод AlphaScreen®	313
6.3.2. Визначення активності гуанілатциклази	315
6.3.2.1. Спектрофотометричний метод	316
6.3.2.2. Люмінесцентний метод	318
6.3.2.3. Ензиматичний флуориметричний метод	319
6.3.3. Визначення активності цГМФ-специфічної фосфодіестерази	321
6.3.4. Визначення цГМФ-залежної протеїнкінази	323

6.4. Вивчення інозитолфосфатної сигнальної системи	324
6.4.1. Визначення активності фосфоліпази C.....	324
6.4.1.1. Метод FlashPlate.....	325
6.4.1.2. Ферментативний колориметричний і флуориметричний методи.....	326
6.4.2. Вивчення флуктуацій внутрішньоклітинного кальцію (Ca^{2+}).....	327
6.4.2.1. Колориметричні методи.....	328
6.4.2.2. Флуоресцентні методи.....	329
6.4.2.3. Методи AequoScreen [®] та AequoZen TM frozen cells.....	333
6.4.3. Визначення кальмодуліну.....	336
6.4.3.1. Радіоімунний аналіз.....	336
6.4.3.2. Метод ELISA.....	337
6.4.3.3. Метод визначення біологічної активності кальмодуліну.....	339
6.4.4. Визначення активності Ca^{2+} /кальмодулінзалежної протеїнкінази.....	340
6.4.4.1. Метод SignaTECT [®]	341
6.4.4.2. Метод ELISA (CycLex [®]).....	343
6.4.5. Визначення інозитол-1,4,5-трифосфату та інозитол-1-фосфату.....	344
6.4.5.1. [³ H]-радіорецепторний метод.....	345
6.4.5.2. Метод SPA.....	346
6.4.5.3. Метод ELISA.....	347
6.4.5.4. Метод HTRF (TR-FRET).....	348
6.4.6. Визначення активності фосфатидилінозитол-3-кінази.....	350
6.4.6.1. Радіоактивний метод.....	350
6.4.6.2. Метод HTRF.....	351
6.4.7. Визначення активності Akt-кінази.....	352
6.4.7.1. Метод ELISA.....	354
6.4.7.2. Метод Western-блотингу.....	354
6.4.7.3. Метод HTRF.....	356
6.4.8. Визначення активності протеїнкінази C.....	356
6.4.8.1. Радіоактивні методи.....	358
6.4.8.2. Метод ELISA.....	359
6.4.8.3. Флуориметричний метод PerTag [®]	359

6.5. Вивчення системи тирозинового фосфорилування	361
6.5.1. Визначення активності тирозинпротеїнкінази.....	361
6.5.1.1. Метод SignaTECT®	362
6.5.1.2. Метод ELISA	363
6.5.1.3. Метод Antibody Beacon™	365
6.5.1.4. Метод HTRF® KinEASE™	366
6.5.2. Визначення активності	
тирозинпротеїнфосфатази	368
6.5.2.1. Радіоізотопний метод	370
6.5.2.2. Колориметричний метод	
з малахітовим зеленим	370
6.5.2.3. Колориметричний метод	
з паранітрофенілфосфатом.....	373
6.5.2.4. Метод ProFluor®	374
6.5.2.5. Метод HTRF (TR-FRET)	376
6.6. Вивчення сигнального шляху MAPK/ERK	377
6.6.1. Визначення активності MAP-кіназ.....	377
6.6.1.1. Метод Western-блотингу	377
6.6.1.2. Метод ELISA	378
6.6.2. Визначення активності MEK1-кінази	380
6.7. Вивчення системи оксиду азоту	382
6.7.1. Визначення активності синтази оксиду азоту.....	382
6.7.1.1. Радіоактивний метод	383
6.7.1.2. Ферментативний метод	384
6.7.1.3. Флуориметричний метод	384
6.7.2. Визначення оксиду азоту	386
6.7.2.1. Колориметричний метод.....	386
6.7.2.2. Метод OxiSelect™	386
6.8. Вивчення систем трансдукції сигналу цитокінів.....	388
6.8.1. Визначення TNF-α	388
6.8.1.1. Метод ELISA	388
6.8.1.2. Метод HTRF (TR-FRET)	388
6.8.2. Визначення фосфорилування JAK-STAT	390
6.8.2.1. Метод phosphoELISA™	390
6.8.2.2. Метод "сендвіч"-ELISA.....	390
6.8.2.3. Метод HTRF	392

6.9. Вивчення системи інтерферону	394
6.9.1. Визначення вмісту та біологічної активності інтерферону	394
6.9.1.1. Метод ELISA	394
6.9.1.2. Метод ELISPOT	396
6.9.1.3. Вивчення біологічної активності інтерферону	398
6.9.2. Визначення активності 2',5'-олігоаденілат- синтетази	399
6.9.2.1. Радіоізотопний ферментативний метод	400
6.9.2.2. Радіоімунний аналіз	402
6.9.2.3. Метод тонкошарової хроматографії на PEI-целюлозі	403
6.9.2.4. Спектрофотометричний метод	405
6.9.3. Визначення вмісту 2',5'-олігоаденілатів	406
6.9.3.1. Метод HPLC	408
6.9.3.2. Метод радіозв'язування та радіоімунний аналіз	408
6.9.4. Визначення активності РНКазы L	410
6.9.4.1. Метод радіозв'язування	410
6.9.4.2. Ковалентний метод	412
6.9.4.3. Метод Western-блотингу	412
6.9.4.4. Методи вивчення РНКазы L-залежного розщеплення РНК	414
6.9.5. Визначення активності dsRNA-залежної протеїнкінази	414
6.9.5.1. Радіоактивний метод	415
6.9.5.2. Метод LanthaScreen™ Activity Assay	416
6.9.6. Визначення активності 2',5'-фосфодіестерази	417
6.9.6.1. NH ₃ -тест	419
6.9.6.2. Метод HPLC	420

Список рекомендованої літератури для написання дипломних робіт	423
---	------------

Навчальне видання

ОСТАПЧЕНКО Людмила Іванівна
КОМПАНЕЦЬ Ірина Володимирівна
СИНЕЛЬНИК Тетяна Борисівна

БІОЛОГІЧНІ МЕМБРАНИ І ВНУТРІШНЬОКЛІТИННА СИГНАЛІЗАЦІЯ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Навчальний посібник

Редактор *В. Р. Філь*

Оригінал-макет виготовлено Видавничо-поліграфічним центром "Київський університет"

Виконавець Т. С. Яшкова



Формат 60x84^{1/16}. Ум. друк. арк. **26,0**. Наклад 150. Зам. № **214-7227**.
Гарнітура Times New Roman. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б12*.
Підписано до друку **22.04.15**

Видавець і виготовлювач
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет",
Б-р Т. Шевченка 14, м. Київ, 01601
☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; тел./факс (38044) 239 31 28
e-mail: vpc@univ.kiev.ua
<http://vpc.univ.kiev.ua>

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02