Всероссийский конкурс исследовательских и проектных работ

школьников «Высший пилотаж»

**Поиск агентов, связывающих иботеновую кислоту и нейтрализующих ее влияние на ЦНС**

Исследование

Направление «Биология»

Выполнили

Фетисов Антон Иванович

Быков Михаил Александрович

Учащиеся 11 класса

ГБОУ Школы на Юго-Востоке имени Маршала В.И. Чуйкова

Г. Москва

Научный руководитель

Тутукина Мария Николаевна

К.б.н, Сколтех

2023

**Содержание:**

* **Введение 3**
* **Цель и задача 3**
* **Обзор литературы 3**
* **Материалы и методы 4**
* **Ход работы и результаты 5**
* **Выводы 13**
* **Список источников: 13**

**Введение**

Иботеновая кислота (ИБК) – это химическое соединение, обладающее психоактивным действием, будучи биоизостером глутамата – нейромедиатора центральной нервной системы. ИБК содержится в  *[Amanita muscaria](https://translated.turbopages.org/proxy_u/en-ru.ru.47b2175a-63178bad-bb32d9ee-74722d776562/https/en.wikipedia.org/wiki/Amanita_muscaria" \o "Мухомор мускариевый)* и родственных видах [грибов](https://translated.turbopages.org/proxy_u/en-ru.ru.47b2175a-63178bad-bb32d9ee-74722d776562/https/en.wikipedia.org/wiki/Mushroom), после их употребления ИБК попадает в кровь и проникает через гематоэнцефалический барьер в мозг, вызывая галлюцинации, ретроградную амнезию и гибель нейронов мозга. При слишком высокой дозе возможны отек головного мозга, кома и летальный исход. Современный подход к лечению отравления ИБК представляет собой типичный комплекс мер при пищевом отравлении и симптоматическое лечение, а антагонисты ИБК не применяются в силу их собственной токсичности.

**Цель работы**

Найти агент, который препятствует связыванию иботеновой кислоты с рецепторами и тем самым не допустить ее воздействия на ЦНС или существенно его снизить.

**Задача**

С помощью структурного моделирования найти агент, который препятствует эффективному взаимодействию иботеновой кислоты с рецепторами, и тем самым не допускает ее негативного воздействия на ЦНС или существенно снижает его, разработать эффективный способ получения данного агента и проверить его действие.

**Использованные сокращения**

ИБК – иботеновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ЦНС – центральная нервная система

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

NMDA-рецептор - ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат

ПЦР – полимеразная цепная реакция

УФ - ультрафиолет

**Обзор литературы**

ИБК содержится в основном внутри желтой мякоти [*Amanita muscaria*](https://translated.turbopages.org/proxy_u/en-ru.ru.47b2175a-63178bad-bb32d9ee-74722d776562/https/en.wikipedia.org/wiki/Amanita_muscaria)(мухомора красного). Воздействие грибов, содержащих иботеновую кислоту, происходит чаще всего в трех случаях: употребление мухоморов детьми с минимальными симптомами, взрослыми в развлекательных целях с умеренными симптомами и ошибки при приеме пищи, приводящие тяжелым симптомам. Зачастую красные мухоморы путают с цезарскими мухоморами, являющимися съедобными, и употребляют вместо них. Минимальная эффективная доза ИБК, вызывающая негативный эффект на ЦНС: 30-60 грамм. ИБК и прочие токсины мухомора не чувствительны к термической обработке (1,4).

После попадания в организм ИБК частично декарбоксилируется в ЖКТ до мусцимола, который также действует на ЦНС. Клинические эффекты отравления мухоморами сгруппированы в три категории: желудочно-кишечные симптомы (тошнота, рвота, диарея или боль в животе), возбуждающие эффекты ИБК на ЦНС (возбуждение, галлюцинации или тремор) и угнетение ЦНС при действии мусцимола (спутанность сознания, сонливость/вялость, невнятная речь, угнетение дыхания, кома). Симптомы проявляются 8-24 часа, редко длятся несколько суток. Воздействие ИБК на ЦНС обусловлено связыванием с NMDA-рецепторами, расположенными в основном в гиппокампе (2).

Лечение отравления является полностью симптоматическим, т.к. антидота против ИБК и мусцимола не существует. При первых симптомах применяют промывание желудка, активированный уголь и бензодиазепины, которые понижают возбуждение мышц и нервной системы. Однако они обладают негативным эффектом на дыхательную систему, требующим подключения пациента к ИВЛ. От скорости начала лечения зависит тяжесть протекания отравления (3,4).

Поэтому нашей целью был поиск агента, который мог бы препятствовать связыванию иботеновой кислоты с NMDA-рецепторами, не допуская или существенно снижая ее воздействие на ЦНС.

**Материалы и методы**

1. **Поиск и чтение научных статей:** [PubMed (nih.gov)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/)
2. **Моделирование и докинг.**

Последовательности аминокислот и нуклеотидов брались из [Home - PMC - NCBI (nih.gov)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/). Для того, чтобы смоделировать субъединицы NMDA-рецептора и их фрагменты, аминокислотные последовательности загружались на сайт [SWISS-MODEL (expasy.org)](https://swissmodel.expasy.org/), который через некоторое время выдавал готовую модель. Затем модели сохранялись в формате pdbqt, также были установлены с сайта [PubChem (nih.gov)](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) модели глутамата, ИБК, мусцимола и мусказона (сначала в формате SDF, затем переведены в pdbqt c помощью Autodock tools (11)). Эти файлы вместе с ранее установленными программами и специальными файлами для проведения докинга были добавлены в одну папку “docking”. После этого были подготовлены и собраны в один Word-файл формы файла config для всех четырех доменов. Предварительно в Autodock подбирались координаты «квадрата» для дальнейшего докинга, который бы вмещал в себя всю исследуемую структуру. Затем координаты были добавлены в формы для каждого домена. По очереди эти формы помещались в файл конфигурации докинга, и запускался процесс докинга с помощью команды start-dock. Результаты докинга были получены для каждого домена в формате файла с перечнем энергий связывания для 9 вариантов сайтов и файла с местонахождениями молекул в pdbqt.

1. **Подбор плазмид и праймеров**.

Анализ плазмид и поиск подходящих сайтов рестрикции для вставки наших генов проходил с помощью сайта [Addgene: Homepage](https://www.addgene.org/), опираясь на конструкцию из статьи (14). К выбранным по результатам моделирования последовательностям были добавлены аминокислоты по краям, чтобы оставить место для подбора праймеров. После этого на сайте [EMBOSS Backtranseq < Sequence Translation Sites < EMBL-EBI](https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/) обе последовательности были переведены в нуклеотиды, причем в варианте для человека и в варианте для кишечной палочки. Далее было выполнено выравнивание этих фрагментов с помощью ресурса [MUSCLE < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI](https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/), которое дало понять, что праймеры можно сделать одинаковые для обоих последовательностей, т.к. они очень схожи. Мы удостоверились, что сайтов рестрикции XhoI и BamHI в генах нет. С помощью программы Primer Blast [Primer designing tool (nih.gov)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) были подобраны термодинамически оптимальные прямой и обратный праймеры, в которые затем были добавлены сайты рестрикции. После создания праймеров, они были заказаны у компании [Евроген (evrogen.ru)](https://evrogen.ru/?ysclid=lddgfm4j46271793990).

1. **Выделение ДНК из слюны.**

Для выделения ДНК был использован набор Promega Wizard (США). Краткий протокол:   
а) Собрать слюну (около 300 мкл) в стерильную пробирку  
б) Добавить 900 мкл Cell Lysis Solution, инкубировать 10 минут при комнатной температуре, центрифугировать при 13000 оборотах в минуту в течение 1 минуты.  
в) К осадку добавить 300 мкл Nuclei Lysis Solution, хорошо перемешать на вортексе   
г) Добавить 100 мкл Protein Precipitation Solution. Вортексировать 20 секунд.  
д) Центрифугировать 3 минуты при комнатной температуре на максимальной скорости (у нас 14000 об/мин).

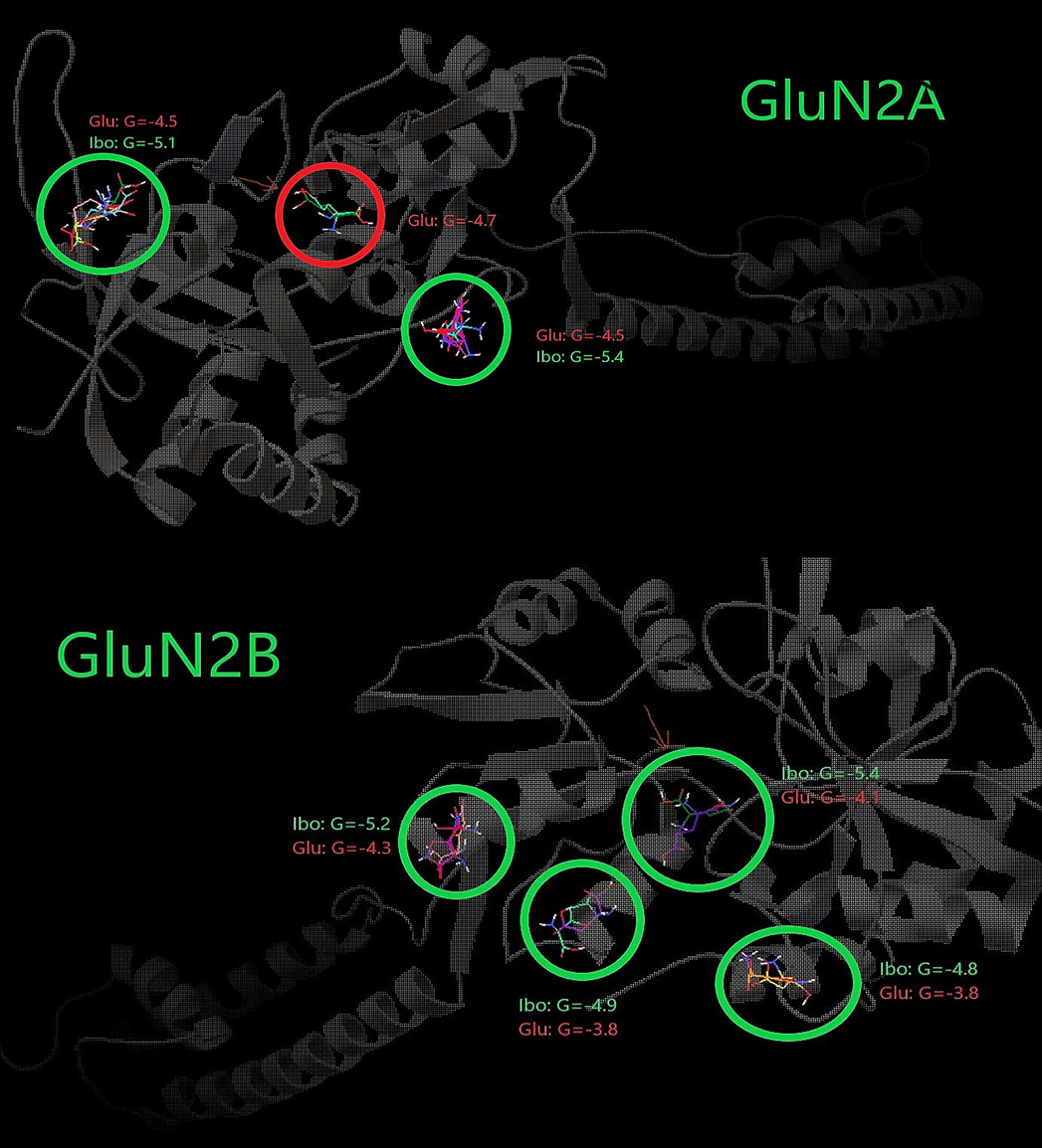
е) Перенести супернатант в новую стерильную пробирку, добавить равный объем изопропанола. Инкубировать ночь при -20С.   
ж) Центрифугировать 10 минут на максимальной скорости. Супернатант убрать

з) осадок дважды промыть 70% этанолом, высушить, растворить в 50 мкл DNA rehydrataion solution.

1. **Полимеразная цепная реакция.**  Реакцию ПЦР проводили на амплификаторе Thermocycler T-Gradient ThermoBlock (Biometra, Германия). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 5 мкл 5ХPCR mix HS (Евроген, Россия), 2 мкл выделенной из слюны ДНК, 1 мкл прямого праймера, разведенного до 10 мкМ, 1 мкл обратного праймера, разведенного до 10 мкМ, 21 мкл стерильной воды. Программа амплификации была следующей: предварительная денатурация при 94°C, 2 мин; далее 35 циклов: 94°C – 30 сек, 54°C – 30 сек, 72°C – 40 сек, затем достройка концов 3 минуты при 72°C.
2. **Электрофорез.**  Для оценки качества и размера полученных ампликонов использовали электрофорез в 2% агарозном геле. Электрофорез проводили в 1Х буфере TBE (89 mM Tris, 89mM H3BO3, 2mM EDTA) при напряжении 100В с использованием камеры Хеликон (Хеликон, Россия) и источника питания Эльф-4 (ДНК-Технология, Россия). В качестве красителя использовали бромистый этидий. Гель визуализировали на трансиллюминаторе в проходящем УФ-свете.
3. **Выделение фрагмента ПЦР из агарозного геля.** ДНК выделяли из геля с помощью набораMonarch DNA Gel Extraction Kit (NEB, США). После вырезания фрагмента из геля к нему был добавлен Dissolving Buffer в соотношении 1:3. Перемешивали и инкубировали смесь 10 минут при 55°C, каждые 2 минуты встряхивая на вортексе. Расплавленную смесь помещали к колонку, центрифугировали на максимальной скорости 1 минуту, дважды промывали 200 мкл промывочного раствора, затем дополнительно центрифугировали 1 минуту на максимальной скорости для избавления от остатков спирта. Фрагмент элюировали 20 мкл подогретого до 65С элюирующего буфера.
4. **Рестрикция.** Были сделаны 2 смеси с общим объемом по 20 мкл. Смесь для рестрикции плазмиды содержала 10 мкл плазмиды, 2 мкл 10Хбуфера CutSmart (NEB, США), 1 мкл рестриктазы BamHI (NEB, США), 1 мкл рестриктазы XhoI (NEB, США), 6 мкл стерильной воды. Смесь для рестрикции ДНК-фрагмента содержала 15 мкл амплифицированного ДНК-фрагмента 2 мкл 10Хбуфера CutSmart (NEB, США), 1 мкл рестриктазы BamHI (NEB, США), 1 мкл рестриктазы XhoI (NEB, США), 1 мкл стерильной воды. Пробирки инкубировались 90 минут при 37°C, затем 20 минут при 65°C для инактивации рестриктаз. Затем фрагменты и плазмида были очищены с помощью Monarch DNA and PCR Cleanup kit в соответствии с протоколом производителя. Объем элюирующего буфера – 12 мкл.
5. **Лигирование.** Концентрацию фрагмента и плазмиды измерили на NanoDrop-1000 (США). Реакционная смесь содержала растворы фрагмента и плазмиды в соотношении 3:1 (М:М), 10Х буфер для лигазы, 1 мкл Т4 лигазы (New England Biolabs, США, 400 единиц), в общем объеме 20 мкл. Далее она инкубировалась 16 часов при 4°C. Лигазу инактивировали 10 минут при 65°C.

**Ход работы**

ИБК, как и глутамат, является агонистом NMDA-рецептора, состоящего из 4 субъединиц. Это позволило предположить, что сайты связывания ИБК, вероятно, совпадают с сайтами связывания глутамата. Поэтому на первом этапе были проанализированы научные статьи, в которых описаны сайты связывания глутамата во всех четырех субъединицах рецептора (5-8). Затем, из базы данных NCBI были взяты их аминокислотные последовательности и размечены те остатки, которые формируют известные сайты связывания глутамата. Несмотря на то, что NMDA-рецепторы активно изучаются, не для всех субъединиц было понятно точное расположение сайтов связывания глутамата, а детальной информации о сайтах связывания ИБК в научной литературе и вовсе нет. Поэтому мы смоделировали структуры субъединиц NMDA-рецепторов с помощью программ SwissModel, Phyre 2 (9) и Alpha Fold (10) и провели гибкий молекулярный докинг молекул глутамата и ИБК с помощью AutodockVina (11) (Рис. 1 и Табл.1).



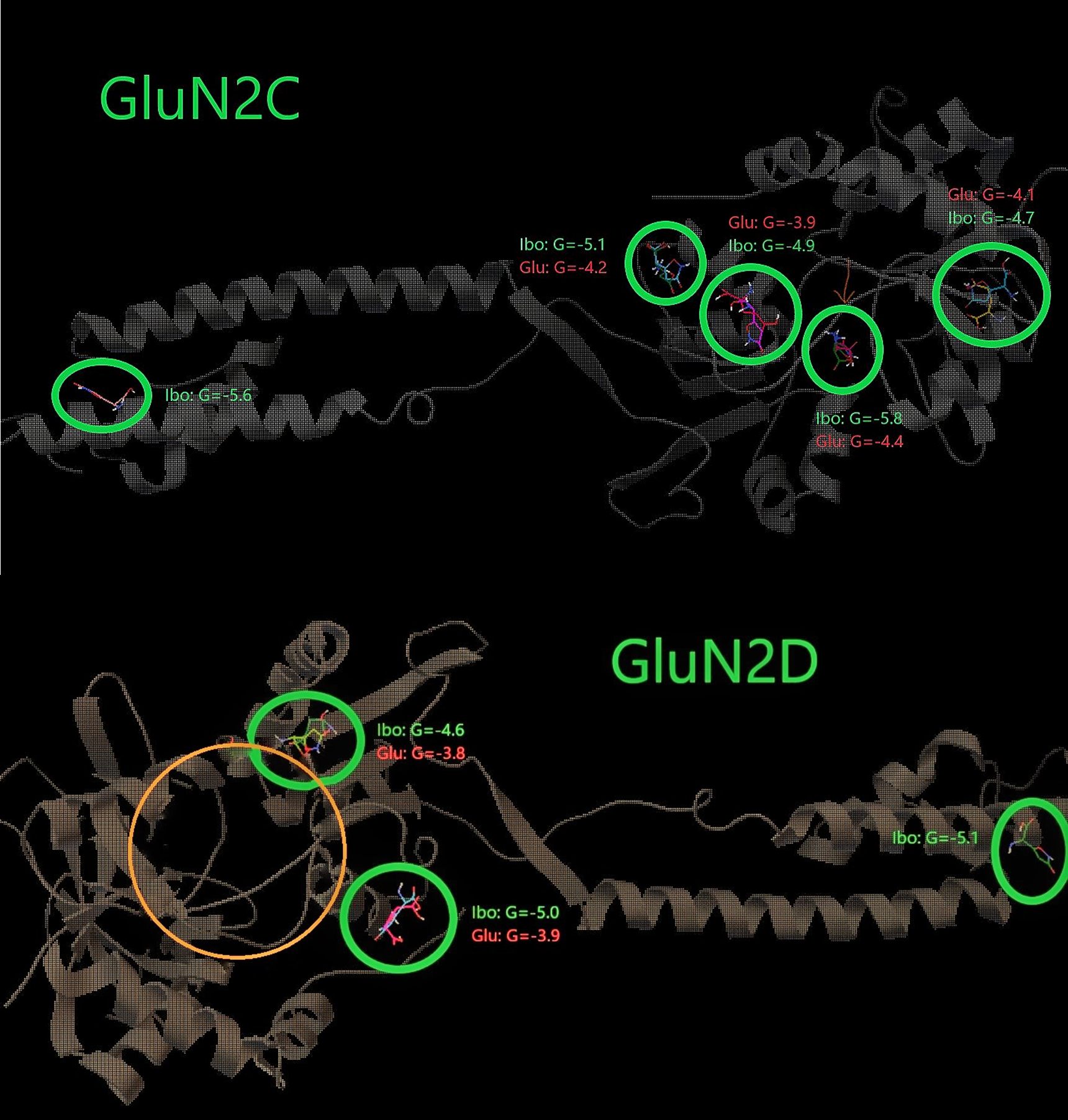


Рис. 1 Результаты молекулярного докинга ИБК и глутамата для GluN2А,B,C и D субъединиц NMDA-рецептора. Ibo – иботеновая кислота, Glu – глутамат. Для каждого сайта приведены значения свободной энергии Гиббса при связывании ИБК и глутамата. Зелеными кругами обозначены сайты, где вероятнее всего будет связываться ИБК, а красными – глутамат.

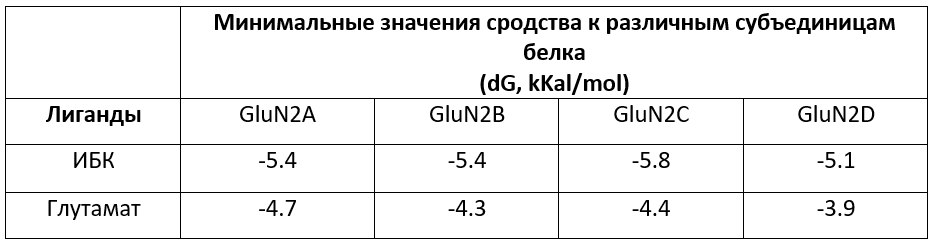


Табл. 1 Минимальные значения сродства ИБК и глутамата к различным субъединицам NMDA-рецептора.

Видно, что во всех случаях энергия связывания ИБК была ниже, чем для глутамата – это, по-видимому, значит, что ИБК является преимущественным лигандом для этих рецепторов, и может вытеснять глутамат из сайтов или препятствовать его связыванию. Кроме того, в субъединицах C и D есть дополнительные сайты связывания ИБК с очень низкой энергией связывания. Последнее свойство очень интересно и может позволить использовать эти 2 субъединицы, как «ловушки» для связывания с ИБК в организме.

Однако помимо ИБК на предмет связывания с субъединицами C и D были проверены два других токсина мухомора – мусцимол и мусказон (4). Молекулярный докинг показал, что молекулы этих веществ могут связываться в той же области, что и ИБК. В трансмембранном домене GluN2D связываются и мусцимол, и мусказон, что говорит об универсальности фрагмента для связывания основных токсинов мухомора (Рис. 2 и 3)



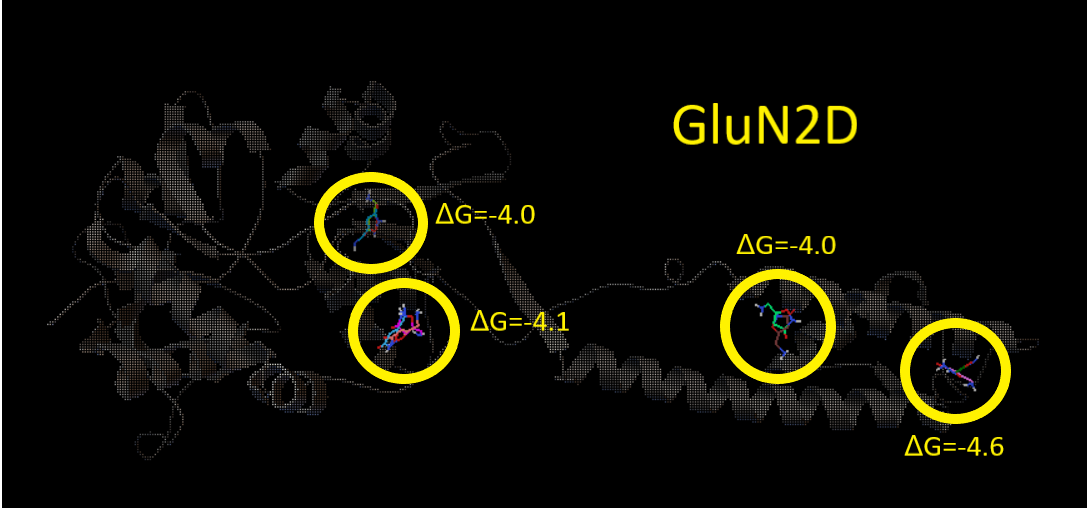
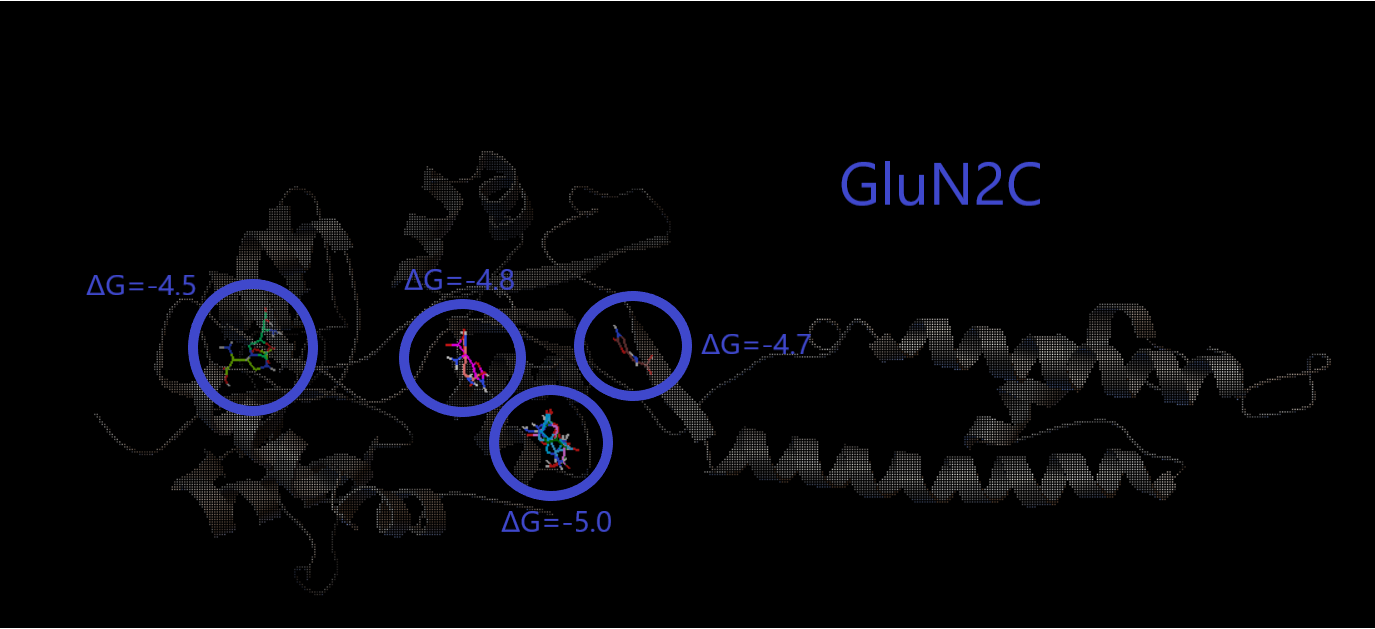


Рис. 2 Результаты молекулярного докинга мусцимола для GluN2C и D субъединиц NMDA-рецептора.



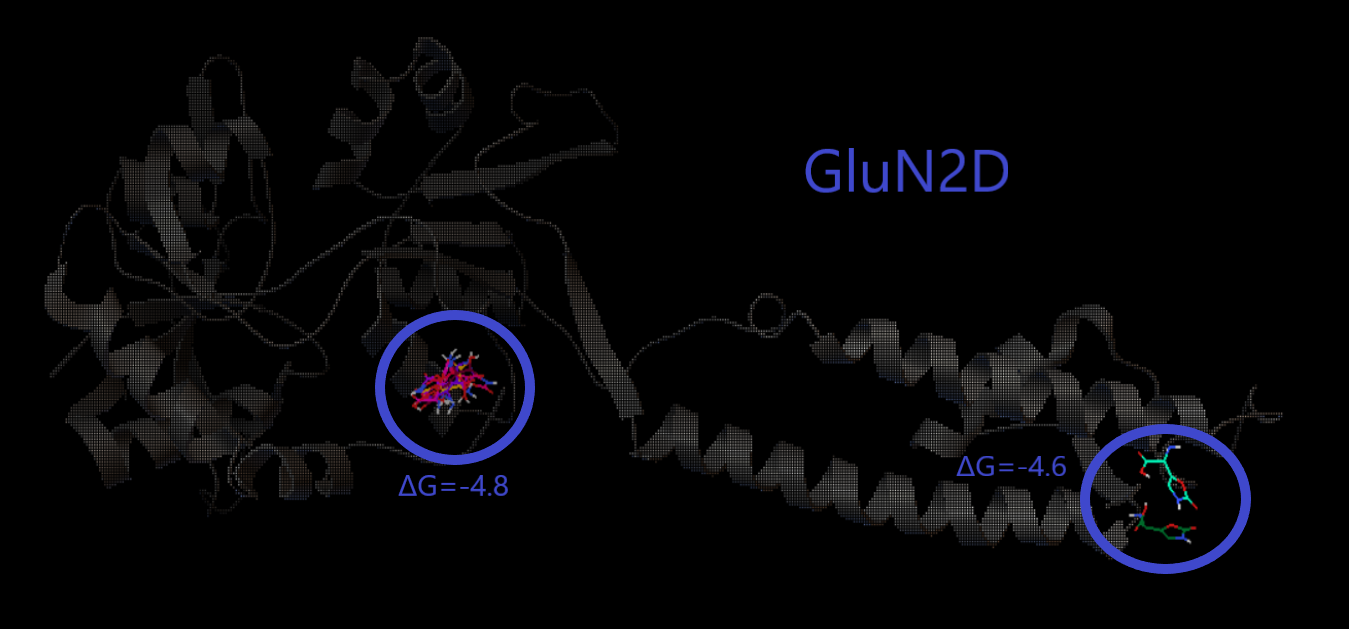


Рис. 3 Результаты молекулярного докинга мусказона для GluN2C и D субъединиц NMDA-рецептора.

После стадии докинга с помощью моделирования были выбраны участки белков для их последующей наработки в клетках эукариот и бактерий - аминокислотная последовательность субъединиц была максимально укорочена так, чтобы сохранялась изначальная структура дополнительных сайтов связывания. Поскольку в ходе анализа научных статей было выяснено, что в организме субъединицы находятся в гликозилированном состоянии, то в идеальном варианте их стоит экспрессировать в эукариотической клетке (12, 13). Для этого была выбрана плазмида pcDNA3.1(+) (14). Однако экспрессия белков в эукариотической системе очень дорога и сложна, поэтому зачастую ученые используют более простые бактериальные системы – например, с их помощью успешно производится RBD-домен спайк-белка SARS-CoV-2, который тоже является гликозилированным. Поэтому мы тоже решили попробовать экспрессировать наши фрагменты и в кишечной палочке, с использованием плазмиды pGEX-6P-2 (Рис. 4).

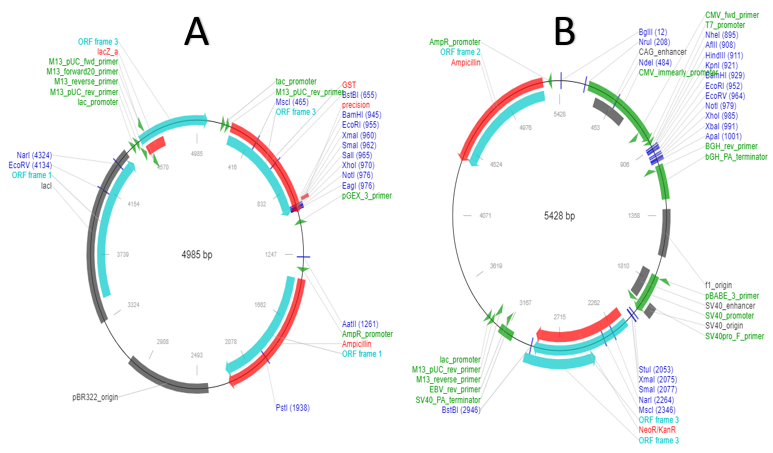


Рис. 4 Плазмиды, которые были отобраны для получения белковых фрагментов в эукариотических и бактериальных клетках: A - pcDNA3.1(+), B - pGEX-6P-2.

В обеих плазмидах есть сайты рестрикции BamHI и XhoI, что позволяет использовать универсальные праймеры. Для их подбора мы провели выравнивание нуклеотидных последовательностей субъединиц GluN2C и GluN2D с помощью алгоритма MUSCLE, в результате которого стало понятно, что праймеры можно сделать одинаковые для обоих последовательностей, т.к. они очень схожи (Рис. 5). Было проверено, что сайтов рестрикции XhoI и BamHI в самих генах нет. После этого с помощью программы Primer-BLAST были подобраны и прямой, и обратный праймер, так чтобы он был комплементарен первым (последним) 20 нуклеотидам последовательности, и затем сделаны замены для введения необходимых сайтов рестрикции (XhoI для обратного и BamHI для прямого, Рис. 5). Праймеры заказали на сайте Евроген.

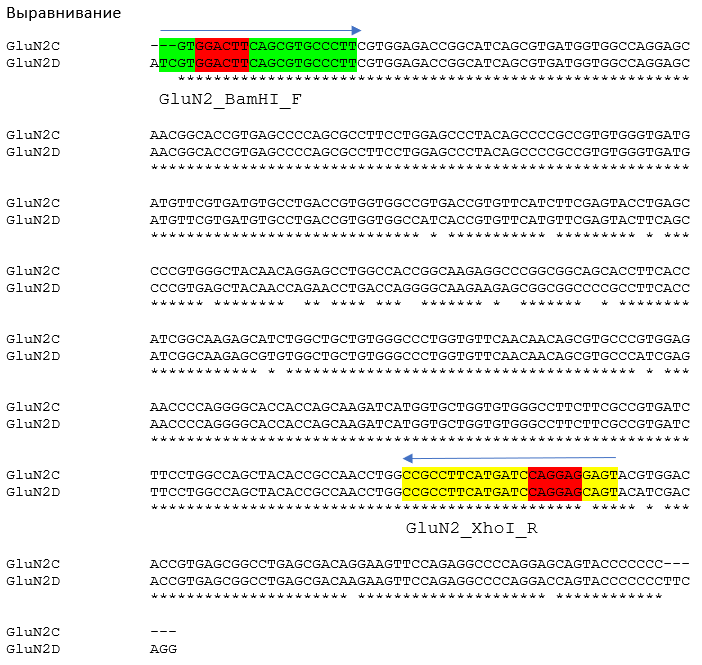


Рис. 5 Выравнивание нуклеотидных последовательностей, кодирующих GluN2D и GluN2С. Показаны выбранные праймеры для клонирования.

На следующей стадии проекта была выделена ДНК человека для последующей амплификации генов NMDA-рецепторов, из слюны. Для этого был использован Promega Wizard Genomic DNA purification kit, ДНК выделяли в соответствии с инструкцией производителя. На получившейся ДНК был проведен ПЦР и получены последовательности для вставки в плазмиду. С помощью гель-электрофореза результаты ПЦР были верифицированы (Рис. 6)

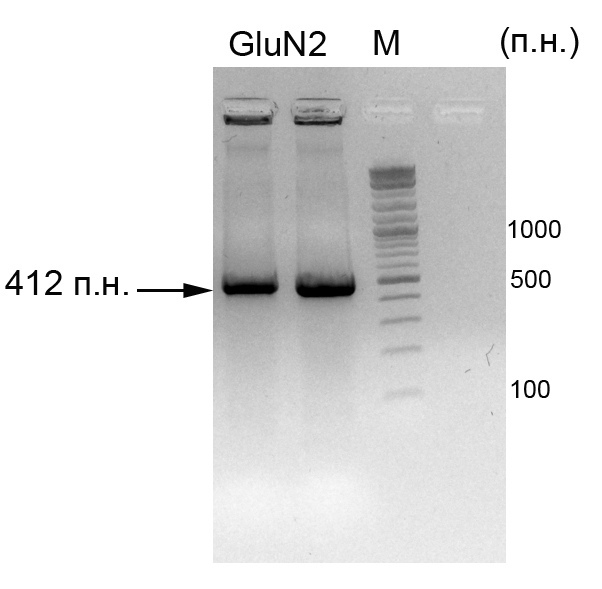


Рис. 6 Результаты гель-электрофореза. 1 дорожка – фрагмент GluN2C, 2 дорожка - фрагмент GluN2D. Визуализация проведена с помощью бромистого этидия в проходящему УФ-свете.

Для дальнейшей работы с амплифицированным фрагментом он был выделен из агарозного геля при помощи Monarch DNA Gel Extraction Kit. Далее при помощи рестриктаз BamHI и XhoI были проведены рестрикция фрагмента и плазмиды, очищение полученных ДНК от фермента проведено с помощью того же Monarch DNA Gel Extraction Kit. Затем было проведено лигирование фрагмента в плазмиду с помощью ДНК-лигаз, в результате чего были получены готовые к трансформации в бактерий векторы.

На ближайшее время запланирована работа с бактериальной плазмидой, продуцирующей рекомбинантные фрагменты GluN2D и GluN2С: будет проведена трансформация клеток, индуцирован синтез с помощью IPTG, фрагменты будут очищены с помощью аффинной хроматографии на GST-таг (с помощью глутатион-сефарозы), а их действие проверено на лабораторных животных.

**Результаты**

* Проведен молекулярный докинг, в результате которого получены точные местоположения сайтов связывания иботеновой кислоты, глутамата, мусцимола и мусказона, а также их энергии связывания.
* В необходимом количестве получены бактериальные плазмиды со встроенным геном белка-ловушки, на основе которых будет вестись продукция белка.

**Выводы**

* Энергия связывания у ИБК меньше, чем у глутамата в одних и тех же сайтах. Следовательно ИБК способна вытеснять глутамат из сайтов связывания.
* Фрагменты субъединиц GluN2C и GluN2D NMDA-рецептора могут быть использованы, как «ловушки» для связывания молекул ИБК, а также других токсинов мухоморов, и не допустить их связывания с рецепторами в мозге.

**Список источников:**

1. Stebelska, K. (2013). Fungal Hallucinogens Psilocin, Ibotenic Acid, and Muscimol. Therapeutic Drug Monitoring, 35(4), 420–442.
2. Moss, M. J., & Hendrickson, R. G. (2018). Toxicity of muscimol and ibotenic acid containing mushrooms reported to a regional poison control center from 2002–2016. Clinical Toxicology, 1–5.
3. [Francesca Irene Rampolli](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Rampolli%20FI%5BAuthor%5D),corresponding author1 [Premila Kamler](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Kamler%20P%5BAuthor%5D),1 [Claudio Carnevale Carlino](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Carnevale%20Carlino%20C%5BAuthor%5D),1 and [Francesca Bedussi](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Bedussi%20F%5BAuthor%5D) (2021). The Deceptive Mushroom: Accidental Amanita muscaria Poisoning. [Eur J Case Rep Intern Med.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7977045/) 2021; 8(2): 002212.
4. Michelot, D., & Melendez-Howell, L. M. (2003). Amanita muscaria: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. Mycological Research, 107(2), 131–146.
5. Bonaccorso, C.; Micale, N.; Ettari, R.; Grasso, S.; Zappala, M. (2011). *Curr Med Chem*, 18(36), 5483–5506.
6. Jorgensen, Charlotte G.; Clausen, Rasmus P.; Hansen, Kasper B.; Brauner-Osborne, Hans; Nielsen, Birgitte; Bjorn Metzler, Kehler, Jan; Krogsgaard-Larsen, Povl; Madsen, Ulf (2007).  *Organic and Biomol. Chem.* 5(3), 463–0.
7. Vance, Katie M.; Simorowski, Noriko; Traynelis, Stephen F.; Furukawa, Hiro (2011).  *Nat Com*, 2:294
8. Dravid, S. M., Burger, P. B., Prakash, A., Geballe, M. T., Yadav, R., Le, P., … Traynelis, S. F. (2010). J. Neurosc, 30(7), 2741–2754.
9. Kelley, L., Mezulis, S., Yates, C. et al. (2015) Nat Protoc 10, 845–858.   
   doi: 10.1038/nprot.2015.053.
10. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. et al. (2021) Nature 596, 583–589.   
    https://vk.com/away.php?to=https%3A%2F%2Fdoi.org%2F10.1038%2Fs41586-021-03819-2&cc\_key=
11. Trott, O., & Olson, A. J. (2010). J Comp Chem, 31(2), 455-461.
12. Katarina Lichnerova1,2 †, Martina Kaniakova1 †, Kristyna Skrenkova1, Ladislav Vyklicky1 and Martin Horak (2014). Distinct regions within the GluN2C subunit regulate the surface delivery of NMDA receptors. Sec. Cellular Neurophysiology.
13. Dunah, A. W., Yasuda, R. P., Wang, Y., Luo, J., Dávila-García, M. I., Gbadegesin, M., Wolfe, B. B. (2002). Regional and Ontogenic Expression of the NMDA Receptor Subunit NR2D Protein in Rat Brain Using a Subunit-Specific Antibody. Journal of Neurochemistry, 67(6), 2335–2345.
14. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi (2006). Construction and identification of eukaryotic expression plasmid pcDNA3. 1-BACE and its transient expression in COS-7 cells. 20(4):423-6.