СОДЕРЖАНИЕ

_

615

Том 86, выпуск 4, 2021

Пандемия COVID-19 и мужская фертильность: клинические проявления и патологические механизмы (мини-обзор) <i>А. Абдель-Монейм</i>	459
Особенности регуляции синтеза белков L11-оперона термофильных бактерий и L1-оперона архей А.О. Михайлина, Е.Ю. Никонова, О.С. Костарева, В. Пиндл, М. Эрлахер, С.В. Тищенко	469
Канальная активность родопсинов может быть выявлена при измерении потенциал-зависимости фототоков на плоских бислойных липидных мембранах <i>Т.И. Рокицкая, Н. Маляр, К.В. Ковалев, А.А. Волков, В.И. Горделий, Ю.Н. Антоненко</i>	483
Эпигенетическая модификация микроРНК-219-1 и ее ассоциация с мультиформной глиобластомой <i>А. Гасеми, А. Мохаммади, С. Фаллах</i>	496
Регуляция белков циркадных ритмов и Nrf2-опосредованной антиоксидантной защиты: двойная роль киназы гликогенсинтазы 3 (обзор) Г.А. Шиловский, Т.С. Путятина, Г.В. Моргунова, А.В. Селиверстов, В.В. Ашапкин, Е.В. Сорокина, А.В. Марков, В.П. Скулачев	511
Микробный арсенал противовирусной защиты. Глава II (обзор) А.Б. Исаев, О.С. Мушарова, К.В. Северинов	529
Нормализация кальциевого баланса в нейронах стриатума при болезни Хантингтона: роль сигма-1-рецептора как потенциальной мишени для терапии (мини-обзор) <i>Н.А. Красковская, И.Б. Безпрозванный</i>	554
Химический шаперон PBA ослабляет ЭПР-стресс и активирует экспрессию SOCS3, регулятора передачи сигналов лептина Б. Баба, М. Чалышкан, Г. Бёюк, А. Хаджишевки	564
Гетерологичная экспрессия эндо-ксантаназы <i>Thermogutta terrifontis</i> в <i>Penicillium verruculosum</i> : выделение и первичная характеристика фермента Ю.А. Денисенко, О.Г. Короткова, И.Н. Зоров, А.М. Рожкова, М.В. Семенова, А.Г. Ельченинов, И.В. Кубланов, А.П. Синицын	575
Антиоксидантные свойства галанина и его N-концевых фрагментов при моделировании окислительного стресса in vitro и in vivo О.И. Писаренко, И.М. Студнева, Л.И. Серебрякова, А.А. Тимошин, Г.Г. Коновалова, В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, О.М. Веселова, И.В. Доброхотов, Р.О. Любимов, М.В. Сидорова, М.Е. Палькеева, А.С. Молокоедов	584
D-рамнан и пируватсодержащая тейхуроновая кислота клеточной стенки Rathayibacter sp. BKM Ac-2759 A.C. Шашков, Е.М. Тульская, Н.В. Потехина, А.С. Дмитренок, С.Н. Сенченкова, В.А. Зайчиков, Л.В. Дорофеева, Л.И. Евтушенко	595
Влияние детергентов и осмолитов на термостабильность нативных и мутантных реакционных центров <i>Rhodobacter sphaeroides Т.Ю. Фуфина, Л.Г. Васильева</i>	607
В ПОМОЩЬ АВТОРУ	

Изучить или измерить?
А.А. Байков

Vol. 86, Publ. 4, 2021

=

COVID-19 Pandemic and Male Fertility: Clinical Manifestations and Pathological Mechanisms (Mini-Review) <i>A. Abdel-Moneim</i>	459
Characterization of Regulatory Elements of L11 and L1 Operons in Thermophilic Bacteria and Archaea A. O. Mikhaylina, E. Y. Nikonova, O. S. Kostareva, W. Piendl, M. Erlacher, and S. V. Tishchenko	469
Rhodopsin Channel Activity Can Be Evaluated by Measuring the Photocurrent Voltage Dependence in Planar Bilayer Lipid Membranes <i>T. I. Rokitskaya, N. Maliar, K. V. Kovalev, O. Volkov, V. I. Gordeliy, and Y. N. Antonenko</i>	483
Epigenetic Modification of microRNA-219-1 and Its Association with Glioblastoma Multiforme A. Ghasemi, A. Mohammadi, and S. Fallah	496
 A Crosstalk between the Biorhythms and Gatekeepers of Longevity: Two Affiliations of Glycogen Synthase Kinase-3 (Review) G. A. Shilovsky, T. S. Putyatina, G. V. Morgunova, A. V. Seliverstov, V. V. Ashapkin, E. V. Sorokina, A. V. Markov, and V. P. Skulachev 	511
Microbial Arsenal of Antiviral Defenses. Part II (Review) A. B. Isaev, O. S. Musharova, and K. V. Severinov	529
Normalization of the Calcium Balance in Striatal Neurons in Huntington's Disease: The Role of Sigma 1 Receptor as a Potential Target for Therapy (Mini-Review) <i>N. A. Kraskovskaya and I. B. Bezprozvanny</i>	554
Chemical Chaperone PBA Attenuates ER Stress and Upregulates SOCS3 Expression as a Regulator of Leptin Signaling B. Baba, M. Çalişkan, G. Böyük, and A. Hacişevki	564
 Heterologous Expression of Endo-Xanthanase <i>Thermogutta terrifontis</i> in <i>Penicillium verruculosum</i>, Isolation and Primary Characterization of the Enzyme Y. A. Denisenko, O. G. Korotkova, I. N. Zorov, A. M. Rozhkova, M. V. Semenova, A. G. Elcheninov, I. V. Kublanov, and A. P. Sinitsyn 	575
 Antioxidant Properties of Galanin and Its N-Terminal Fragments in Modeling Oxidative Stress in vitro and in vivo O. I. Pisarenko, I. M. Studneva, L. I. Serebryakova, A. A. Timoshin, G. G. Konovalova, V. Z. Lankin, A. K. Tihaze, O. M. Veselova, I. V. Dobrokhotov, R. O. Lyubimov, M. V. Sidorova, M. E. Palkeeva, and A. S. Molokoedov 	584
D-Rhamnan and Pyruvat-Containing Teichuronic Acid from the Cell Wall of <i>Rathayibacter</i> sp. VKM Ac-2759 <i>A. S. Shashkov, E. M. Tul'skaya, N. V. Potekhina, A. S. Dmitrenok, S. N. Senchenkova,</i> <i>V. A. Zaychikov, L. V. Dorofeeva, and L. I. Evtushenko</i>	595
Effect of Detergents and Osmolytes on Thermal Stability of Native and Mutant <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Reaction Centers <i>T. Yu. Fufina and L. G. Vasilieva</i>	607

TO HELP AN AUTHOR

То	study	or t	o measure?
	A. A.	Ba	ykov

УДК 578.242

ПАНДЕМИЯ COVID-19 И МУЖСКАЯ ФЕРТИЛЬНОСТЬ: КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ И ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

Мини-обзор

© 2021 А. Абдель-Монейм

Molecular Physiology Division, Faculty of Science, Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt; e-mail: adel men2020@yahoo.com, adel.hassan@science.bsu.edu.eg

> Поступила в редакцию 21.10.2020 После доработки 03.01.2021 Принята к публикации 07.01.2021

Пандемия нового коронавирусного заболевания-2019 (COVID-19), вызванная тяжёлым острым респираторным синдромом коронавируса 2 (SARS-CoV-2), стала серьёзной чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения во всем мире. По состоянию на 01 января 2021 года было зарегистрировано более 82,6 миллиона подтверждённых случаев заболевания COVID-19 и 1,8 миллиона смертей. Хотя это заболевание в первую очередь поражает лёгкие, могут возникнуть повреждения других органов, таких как сердце, почки, печень и яички. Яички – краеугольный камень мужского воспроизводства, а репродуктивное здоровье – самый ценный ресурс для продолжения рода. Учитывая уникальную природу SARS-CoV-2, механизмы его воздействия на яички еще до конца не изучены. В частности, было обнаружено, что коронавирусы проникают в клетку-мишень через рецептор, ангиотензинпревращающий фермент 2, который встречается в дыхательных, желудочно-кишечных, сердечно-сосудистых, мочевыводящих путях и репродуктивных органах, таких как яички. Исследования коронавируса показали, что яички могут быть потенциальной мишенью для инфекции SARS-CoV-2. Однако первая этиопатогенная концепция, предложенная текущими гипотезами, указывает на то, что вирус может проникать в яички через клеточный рецептор, ангиотензинпревращающий фермент 2. Кроме того, активированный воспалительный ответ в яичках, связанная с заболеванием высокая температура и применяемые при лечении COVID-19 лекарства могут влиять на изменения в яичках. Хотя данные о наличии мРНК SARS-CoV-2 в сперме остаются противоречивыми, это может указывать исследователям на необходимость уделять более пристальное внимание заболеваниям, передающимся половым путем, а также мужской фертильности после выздоровления от COVID-19. В настоящем обзоре обобщены последние данные о дисфункции яичек, связанной с COVID-19, и обсуждаются возможные механизмы патогенности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: COVID-19, SARS-CoV-2, яичко, манифестация, патогенность, мужская фертильность. **DOI:** 10.31857/S0320972521040011

введение

Пандемия нового коронавирусного заболевания-2019 (COVID-19), вызванная тяжёлым острым респираторным синдромом коронавируса 2 (SARS-CoV-2), является актуальной глобальной проблемой общественного здравоохранения с экспоненциальным ростом числа инфекций во всем мире [1]. Пандемия COVID-19 затронула 213 стран, где, по состоянию на 01 января 2021 года, было зарегистрировано более 82,6 миллиона подтверждённых случаев COVID-19 и 1,8 миллиона смертей, связанных с этой болезнью [2]. Недавние сообщения показывают, что почти 58% инфицированных SARS-CoV-2 — мужчины, что делает мужской пол одним из факторов риска развития COVID-19 [3]. Хотя COVID-19 в первую очередь проявляется как острое респираторное заболевание, он также может поражать другие органы, такие как почки, сердце, яички и печень [4].

К сожалению, у пациентов с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS) были выявлены повреждения яичек и нарушения сперматогенеза, причем у всех инфицированных вирусом тяжёлого острого респираторного синдрома коронавируса (SARS-CoV) в яичках

Принятые сокращения: ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2; COVID-19 – новая коронавирусная болезнь-2019; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ТТ – тестостерон; IL – интерлейкин; SARS – тяжелый острый респираторный синдром; SARS-CoV – тяжелый острый респираторный синдром коронавируса; SARS-CoV-2 – тяжелый острый респираторный синдром коронавируса 2; TMPRSS2 – трансмембранная сериновая протеаза 2-го типа (transmembrane protease serine 2).

наблюдалась широко распространенная деструкция половых клеток, небольшое количество или полное отсутствие сперматозоидов в семенных канальцах и лейкоцитарная инфильтрация [5]. Таким образом, из-за сходства между SARS-CoV и SARS-CoV-2 был заподозрен орхитоподобный синдром у пациентов мужского пола с SARS-CoV-2 [6]. Основным рецептором клетки-хозяина для SARS-CoV или SARS-CoV-2 является ангиотензинпревращающий фермент 2 (АСЕ2). Рецепторы АСЕ2 широко распространены и высоко экспрессируются в сердце, лёгких, почках и яичках [7]. Поэтому, вероятно, SARS-CoV-2 может оказывать неблагоприятное репродуктивное воздействие на мужчин посредством АСЕ2 или других факторов, приводя к повреждению яичек у пациентов мужского пола. Особое внимание следует уделить потенциальному риску SARS-CoV-2 для мужской фертильности [8]. Яички – краеугольный камень мужского воспроизводства, а репродуктивное здоровье - самый ценный ресурс для продолжения рода. Однако мало что известно о возможном краткосрочном и долгосрочном воздействии COVID-19 на мужскую репродуктивную систему. Этот обзор, анализируя последние исследования, позволяет по-новому взглянуть на клинические проявления и возможную патогенность инфекции SARS-CoV-2, связанные с повреждением яичек.

СОVID-19 И КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ПОВРЕЖДЕНИЕМ ЯИЧЕК

Орхит яичек. Предыдущие исследования показали, что ряд вирусов может инфицировать яички, включая вирус паротита, ВИЧ и SARS-CoV [5, 9]. Из-за того, что новый вирус SARS-CoV-2 имеет 76% гомологии аминокислотной последовательности с SARS-CoV, можно предположить, что SARS-CoV-2 может обладать способностью проникать в яичко. Действительно, Gagliardi et al. [10] сообщали о случае орхоэпидидимита, связанного с инфекцией SARS-CoV-2. Кроме того, у шести пациентов с SARS-CoV наблюдались признаки орхита и повреждения яичек, включая уменьшение количества половых клеток и апоптотическую гибель с лейкоцитарной инфильтрацией интерстиция. Гистопатологические данные показали воспалительные инфильтрации и накопление иммуноглобулина G особенно в семенном эпителии, интерстиции, дегенеративных половых клетках и клетках Сертоли [5]. Этот вывод согласуется с результатами, представленными в исследовании Pan et al. [11], где у 6 из 34 мужчин, выздоровевших после инфекции SARS-CoV-2, появились неприятные ощущения в мошонке. Кроме того, бразильское исследование тяжёлых случаев COVID-19 выявило орхит с фибриновыми микротромбами в двух исследуемых яичках [12]. Аналогичным образом обследование 12 скончавшихся от COVID-19 мужчин в Китае показало выраженное повреждение семенных клеток, снижение количества клеток Лейдига и умеренное лимфоцитарное воспаление [13]. В другом исследовании предположили, что орхит мог быть вызван васкулитом, учитывая взаимосвязь COVID-19 с нарушениями свертываемости крови, и что сегментарная васкуляризация яичка может быть вызвана орхитоподобным синдромом [6]. Таким образом, вышеупомянутые данные предполагают, что SARS-CoV-2 может способствовать ультраструктурным повреждениям яичек и орхиту у мужчин с тяжёлыми случаями инфицированиях.

Аномалии половых гормонов. Что касается секреции андрогенов, то снижение общего тестостерона (TT) и рассчитываемого свободного ТТ с повышенным уровнем лютеинизирующего гормона (ЛГ), регистрируемое в тяжёлых случаях COVID-19, достоверно коррелировало с повышением лактатдегидрогеназы в плазме, а уровни ферритина и нейтрофилов - со снижением количества лимфоцитов [14]. Эти данные подтверждают результаты другого исследования, которое показало значительное снижение уровня ТТ в сыворотке крови у 113 пациентов (51,1%) с тяжёлой формой COVID-19, рассматривая это, как негативный прогностический фактор прогрессирования COVID-19 [15]. Кроме того, недавнее исследование 119 мужчин с COVID-19 показало, что инфицированные мужчины имели слегка пониженный общий уровень ТТ и повышенный уровень ЛГ в сыворотке крови, а также пониженное соотношение ТТ/ЛГ и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ)/ЛГ по сравнению с 273 здоровыми мужчинами того же возраста [16]. Аналогичное немецкое исследование показало, что у мужчин с тяжёлой формой COVID-19 наблюдался повышенный уровень ЛГ и ФСГ при снижении уровня ТТ и дигидротестостерона [17]. Примечательно, что повышение уровня ЛГ в сыворотке крови у мужчин, больных COVID-19, вероятно, может ингибировать цепь гипоталамус-гипофиз-яички, что, возможно, объясняет первичное повреждение клеток Лейдига [18]. Более того, низкий уровень ТТ был наиболее важным прогностическим гормональным фактором больничной летальности у пожилых мужчин [19]. Соответственно, COVID-19 может ин-

Дисфункция яичек	Воздействие	Кол-во случаев	Номер ссылки	
Клинические	вирусный орхит зарегистрирован у 6 больных; вирус в сперме не обнаружен	34	[11]	
проявления	у 12 скончавшихся пациентов было обнаружено выраженное повреждение се- менных клеток; у 11 скончавшихся пациентов вирус в яичках не обнаружен, но у одного из пациентов результат был положительным	12	[13]	
	снижение уровня общего и свободного ТТ; уровень ЛГ в сыворотке крови был повышен			
	значительное снижение уровня ТТ в сыворотке крови у 113 пациентов (51,1%) с тяжёлой формой COVID-19	221	[15]	
	умеренное снижение уровня TT; уровень ЛГ был повышен; соотношение TT/ЛГ и ФСГ/ЛГ было пониженным	119	[16]	
	уровень ЛГ и ФСГ был повышен; снижение уровня ТТ и дигидротестостерона	35	[17]	
	РНК SARS-CoV-2 не была обнаружена в 12 образцах спермы и биопсии яичек	12	[23]	
	положительный результат на SARS-CoV-2 у 6 пациентов (15,8%)	38	[22]	
	в 34 образцах спермы вирус не обнаружен	34	[24]	
Инфицирова- ние через ре- цептор АСЕ2	экспрессия ACE2 и TMPRSS2 главным образом в клетках семенных протоков, сперматогониях, клетках Лейдига, примордиальных половых клетках и клет- ках Сертоли		[7, 27–33]	
Воспалитель-	цитокины могут усиливать воспаление и вызывать орхит у пациентов		[5, 33, 36, 37]	
ный ответ и устойчивая высокая тем- пература	гипервоспалительное состояние с устойчивой высокой температурой, влияющие на функцию яичек		[39–43]	
Повреждения яичек, связан- ные с медика- ментозным	глюкокортикоиды и стресс вызвали повреждение яичек; рибавирин снижал уровень TT и подавлял сперматогенез		[22, 45]	
	лопинавир/ритонавир могут ингибировать сперматогенез		[46]	
лечением	хлорохинфосфат влияет на сперматогенез и эпидидимальную функцию		[47]	

Клинические проявления дисфункции яичек, и ассоциация с патогенностью SARS-CoV-2

Примечание. Принятые сокращения: ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2; TT – тестостерон; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; ЛГ – лютеинизирующий гормон; SARS-CoV-2 – тяжелый острый респираторный синдром коронавируса 2; TMPRSS2 – трансмембранная сериновая протеаза 2-го типа.

дуцировать острый гипогонадизм у мужчин, который клинически проявляется снижением уровня TT (таблица).

Обнаружение вируса в семенной жидкости. На сегодняшний день нет чётких сведений о передаче SARS-CoV-2 половым путём, и доказательства присутствия SARS-CoV-2 в сперме остаются ограниченными. В последнее время появились противоречивые данные о наличии SARS-CoV-2 в сперме пациентов с диагнозом COVID-19. Между тем лица, инфицированные SARS-CoV-2, должны принимать все возможные меры предосторожности, чтобы свести к минимуму возможный риск передачи инфекции половым путём [20]. Хотя реальную картину фертильности пациентов с диагнозом COVID-19 еще предстоит изучить, Американское общество репродуктивной медицины (ASRM) и Общество вспомогательных репродуктивных технологий (SART) уже опубликовали предупреждения о передаче SARS-CoV-2 половым путем [21]. Важно отметить, что среди 38 пациентов с COVID-19, предоставивших образцы спермы, 6 пациентов (15,8%) имели положительные результаты на PHK SARS-CoV-2, в том числе 4 из 15 пациентов (26,7%), находящихся в острой стадии инфекции, и 2 из 23 выздоравливали (8,7%) [22].

Напротив, Pan et al. [11] сообщили об отсутствии вируса в сперме пациентов через 29-36 дней после выздоровления, хотя симптомы вирусного орхита проявились у 19% пациентов с COVID-19, и 6 мужчин почувствовали лёгкий дискомфорт в мошонке во время болезни. Кроме того, Song et al. [23] исследовали 12 образцов спермы у пациентов с COVID-19 и биопсию яичек скончавшегося пациента. PHK SARS-CoV-2 не была обнаружена в образцах спермы и биопсии яичек. Авторы пришли к выводу, что, хотя в образцах спермы не был обнаружен SARS-CoV-2, не может быть исключена вероятность заражения яичек на ранней и симптоматической фазе инфекции при инфицировании некоторых других органов, таких как лёгкие, сердце и кишечник. Holtmann et al. [24] также не обнаружили РНК SARS-CoV-2 в сперме 34 выздоровевших или остро инфицированных мужчин с SARS-CoV-2 в среднем через 43 дня после постановки диагноза. Кроме того, среди 12 скончавшихся пациентов с COVID-19 тестикулярная ткань 11 пациентов была отрицательна на PHK SARS-CoV-2, в то время как один из пациентов оказался положительным на вирус. Однако у пациентов с COVID-19 были обнаружены серьезно поврежденные семенные канальцы, уменьшенное количество клеток Сертоли и небольшие воспалительные инфильтраты в интерстиции [13] (таблица). Таким образом, данные, полученные от 132 кумулятивных пациентов в ходе 7 исследований показали, что вирус присутствовал в сперме 7 (5%) пациентов с COVID-19 [11, 13, 22–26].

Более того, Ma et al. [16] сообщили, что 4 пациента с COVID-19 (33,3%, 4/12) имели низкую подвижность сперматозоидов. Продолжительность между сбором спермы и началом заболевания варьировала от 56 до 109 дней (в среднем 78,5 дня). Однако у выздоровевших участников, у которых проявлялись умеренные симптомы, требующие госпитализации, наблюдалось заметное негативное влияние на такие параметры спермы, как концентрация сперматозоидов, общее количество сперматозоидов и общее количество прогрессивных подвижностей по сравнению с контролем. Это открытие указывает на то, что инфекция SARS-CoV-2 оказывает краткосрочное влияние на сперматогенез у пациентов с умеренными симптомами, связанными с COVID-19 [24]. Примечательно, Yang et al. [13] заявили, что COVID-19 может вызывать повреждение ткани яичек и влиять на фертильность, особенно у молодых мужчин, что подчеркивает необходимость изучения функции яичек после выздоровления.

СОVID-19 И ТЕСТИКУЛЯРНАЯ ПАТОГЕННОСТЬ

Прямая инвазия яичек SARS-CoV-2. Рецепторы АСЕ2 вездесущи и высоко экспрессируются в нескольких органах, таких как сердце, кишечник, лёгкие, почки, яички и мозг [7], они непосредственно влияют на инвазию трех штаммов коронавируса в клетки человека: SARS-CoV, NL63 и SARS-CoV-2. Семенные канальцы составляют до 90% яичек человека; клетки Сертоли и половые клетки экспрессируют АСЕ2, что делает их потенциальным очагом инфекции SARS-CoV-2, которая впоследствии влияет на сперматогенез (рисунок). Интересно, что из всех тестикулярных клеток самый высокий уровень мРНК АСЕ2 обнаружили в клетках семенных канальцев, сперматогониях, клетках Лейдига, примордиальных половых клетках и в клетках Сертоли. Во время обследования пациентов с COVID-19 было отмечено значительное повреждение семенных канальцев, уменьшение количества клеток Лейдига и умеренное лимфоцитарное воспаление [7, 27]. Физиологическая роль АСЕ2 в клетках Лейдига включает контроль стероидогенеза и сперматогенеза, модуляцию синтеза TT и регуляцию местной сосудистой регуляторной системы для балансирования объема интерстициальной жидкости путём контроля превращения ангиотензина II в ангиотензин I [14, 28]. Кроме того, при гистопатологическом исследовании у 3 из 6 мужчин с COVID-19, которым сделали биопсию, было обнаружено нарушение сперматогенеза. Гистологическое окрашивание у одного пациента с COVID-19 продемонстрировало интерстициальную макрофагальную и лейкоцитарную инфильтрацию. Кроме того, иммунофлуоресцентный анализ биопсий пациентов с COVID-19 показал прямую корреляцию между повышенным количеством рецепторов АСЕ2 и нарушением сперматогенеза, что указывает на возможный механизм того, как SARS-CoV-2 заражает яички [29]. На основании того, что в яичках высокий уровень экспрессии ACE2, Li et al. [30] пришли к выводу, что SARS-CoV-2 проникает в интерстиций яичек, циркулируя в кровотоке во время активной виремии, и что клетки Лейдига могут быть одной из первоначальных мишеней. Более того, экспрессия АСЕ2 в яичках была связана с возрастом, самый высокий уровень



Краткая схема вероятного патогенеза повреждения яичек, вызванного COVID-19. Принятые сокращения: ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2; SARS-CoV-2 – тяжелый острый респираторный синдром коронавируса 2. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/.)

экспрессии ACE2 наблюдался у 30-летних пациентов, в то время как 60-летние пациенты показали самую низкую экспрессию ACE2 в яичках [31], что позволяет предположить, что более молодые мужчины с COVID-19 имели значительно более высокий риск повреждения яичек по сравнению с мужчинами старшего возраста.

Кроме того, эффективное проникновение SARS-CoV-2 в клетки-хозяева зависит не только от присутствия рецепторов АСЕ2, но и от сериновой протеазы клетки, то есть трансмембранной сериновой протеазы 2-го типа (TMPRSS2), которая расшепляет S-белок коронавируса человека на мембране, и то и другое важно для проникновения вируса в клетку [32]. В дополнение к ACE2, TMPRSS2 также экспрессируется в сперматогониях, клетках Лейдига и клетках Сертоли, обеспечивая потенциальный путь проникновения SARS-CoV-2 в эти клетки [33]. Предположительно, вирус связывается с АСЕ2 и TMPRSS2 в ткани яичек, вызывая свои побочные эффекты. Важно отметить, что Abobaker и Raba [34] подчеркнули возможность повреждения яичек и последующего мужского бесплодия после инфицирования SARS-CoV-2; повреждения яичек могут быть вызваны либо прямой вирусной инвазией посредством связывания с рецептором АСЕ2, либо как побочное явление воспалительного иммунного ответа.

Воспалительный ответ, вызванный SARS-CoV-2. Хотя цитокины играют жизненно важную роль в функции яичек, они также способствуют проявлению патологических отклонений [35]. Повышенные концентрации цитокинов после вирусной инфекции могут влиять на сперматогенез и стероидогенез, тем самым серьёзно влияя на фертильность [36] (рисунок). Примечательно, что воспаление яичек вызывает повышенную активность интерлейкинов (IL) (IL-1 β , IL-1 α и IL-6) и фактора некроза опухоли-α (TNFα), что оказывает вредное воздействие на половые клетки и воспалительные состояния яичек, которые мешают процессу сперматогенеза [37]. Кроме того, АСЕ2, присутствующий на клетках Лейдига, может влиять на локальные микрососудистые потоки и проницаемость и способствовать воспалению, которое противоречит роли клеток Лейдига, тем самым ингибируя выработку ТТ и повреждая клетки семенных канальцев [5]. Таким образом, SARS-CoV-2 проникает в мужской репродуктивный тракт во время острой инфекции через АСЕ2, присутствующий в клетках семенных канальцев. Вирус часто остается там только на несколько дней, возможно потому, что яички - это участки с повышенным иммунитетом [22]. В частности, известно, что иммуносупрессивные свойства клеток Сертоли и макрофагов яичек играют жизненно важную роль в подавлении воспаления и уменьшении повреждений яичек, связанных с вирусами. Тем не менее воспаление, вызванное COVID-19, может оказывать временное воздействие на целостность гематотестикулярного барьера (ГТБ), что может негативно повлиять на сперматогенез [33]. SARS-CoV-2 может вызывать избыток ACE2 через рецепторы ACE2 и способствовать типичной воспалительной реакции, которая может нарушать функцию клеток Лейдига и Сертоли. Провоспалительные цитокины, высвобождаемые клетками Лейдига и Сертоли, могут активировать аутоиммунный ответ и повреждать эпителий яичек, приводя к аутоиммунному орхиту [5]. Соответственно, несмотря на их благоприятный иммунный статус, яички не могут быть защищены от общего иммунного ответа. Лейкоцитарная инфильтрация, а также CD3⁺ Т-лимфоциты и CD68⁺ макрофаги в интерстициальной ткани яичек могут вырабатывать интерфероны, которые также могут снижать выработку тестостерона [36]. Более того, истощение ТТ также связано с аутоиммунными заболеваниями и повышением уровня биомаркеров воспаления, таких как С-реактивный белок (СРБ), IL-6 и ТNFа [38].

Повышенная температура, связанная С **COVID-19.** Гиперактивный иммунный ответ, наряду с цитокиновым штормом после инфицирования SARS-CoV-2, поражают многие органы, включая сердце, печень, почки и яички. Примечательно, что высокая температура, как дополнительный фактор риска пандемии COVID-19, может повлиять на мужскую фертильность. Что еще более важно, гипервоспалительное состояние с устойчивой высокой температурой, молниеносной и фатальной гиперцитокинемией было связано с полиорганной недостаточностью [39]. Сильный воспалительный ответ, связанный с высокой температурой, активацией иммунных клеток и медиаторами воспаления, такими как интерфероны и цитокины, может влиять на функцию яичек [40, 41] (рисунок). Гипотеза о том, что высокая температура и повышение температуры яичек способствуют дефициту сперматозоидов, была общепринятой. Учитывая, что на сперматогенез может влиять высокая температура, вызванная COVID-19, такие параметры спермы, как концентрация и подвижность сперматозоидов, могут быть снижены в течение 72-90 дней после инфицирования вирусом [42]. Более того, участники, у которых зафиксировали сильное повышение температуры, вызванное COVID-19, как правило, имели более низкое количество подвижных сперматозоидов, а также снижение концентрации и общего количества сперматозоидов [43].

COVID-19 и гонадотоксические препараты. Интерферон-а и рибавирин (в сочетании с интерфероном или лопинавиром/ритонавиром), а также хлорохинфосфат были рекомендованы в качестве лекарств от COVID-19 [44]. Исследования на животных показали, что введение рибавирина снижает уровень TT и ингибирует сперматогенез [45], в то время как лопинавир/ритонавир также ингибируют сперматогенез у крыс, вероятно, из-за окислительного стресса и воспаления [46]. К сожалению, дисфункция яичек может быть вызвана глюкокортикоидами и стрессом, проявившимся из-за инфекционного заболевания и психологического кризиса, вызванными COVID-19 [22] (рисунок). Кроме того, было обнаружено, что хлорохинфосфат влияет на сперматогенез и эпидидимальную функцию у самцов крыс, что указывает на то, что медикаментозное лечение в больницах может влиять на функцию мужских яичек человека у пациентов с COVID-19 [47] (таблица).

К сожалению, вышеупомянутые первичные исследования мужской фертильности имеют некоторые ограничения, связанные с размером выборки, методологией исследования и течением заболевания. Поэтому для повышения уровня доказательности и лучшего понимания влияния SARS-CoV-2 на репродуктивную функцию мужчин и здоровье яичек, необходимы дальнейшие всесторонние исследования на всех уровнях. К счастью, недавно исследователи запустили перспективный многомерный проект андрологических исследований (PROTEGGIMI, prospective multidimensional andrological research project) для развития международного сотрудничества в области регистрации данных гормональных и геномных исследований в надежде заполнить недавний пробел в знаниях для понимания связи между SARS-CoV-2 и влиянием этого заболевания на мужчин [48].

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА РЕПРОДУКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ

Учитывая новизну пандемии COVID-19, долгосрочные исследования ее влияния на мужскую фертильность отсутствуют. Тем не менее в ряде исследований изучалось влияние длительной вирусной инфекции на репродуктивную функцию мужчин. Известно, что некоторые вирусы, такие как вирусы папилломы человека, гепатита В (HBV) и гепатита С (HCV), вирусы герпеса человека, вирусы гриппа, цитомегаловирусы, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус эпидемического паротита, вирусы Зика и Эбола, вызывают орхит и влияют на мужскую фертильность [49]. Интересно, что исследование 298 пациентов с паротитным орхитом показало, что у 24% взрослых мужчин и у 38% подростков наблюдались аномалии спермы в течение 3 лет после выздоровления. По край-

БИОХИМИЯ том 86 вып. 4 2021

ней мере 24% взрослых и 38% молодых людей имели аномальные эякуляты даже через 3 года после орхита [50]. Ультразвуковое исследование пациентов с паротитным орхитом че-8 рез 40–230 дней после выздоровления выявило атрофию яичек с появлением продолговатой формы, гетерогенную низкую эхогенность и снижение кровоснабжения [51]. Проведённое после аутопсии 57 пациентов с хроническим ВИЧ исследование показало, что гистологические характеристики яичек имеют несколько более низкую степень сперматогенеза, а также повышенное утолщение клеточной мембраны и интерстициальный фиброз [52]. Кроме того, пациенты мужского пола с хроническим HCV показали более низкий уровень общего тестостерона в сыворотке, имели более низкое общее количество сперматозоидов, количество подвижных сперматозоидов, а также аномальную морфологию сперматозоидов по сравнению с контрольной группой здоровых мужчин [53]. В другом исследовании на сперме пациентов с хроническим HBV наблюдаемые результаты показали худшую морфологию сперматозоидов со снижением подвижности, жизнеспособности и концентрации сперматозоидов по сравнению со здоровыми испытуемыми [54].

Примечательно, что РНК вируса Эболы может быть обнаружена в семенной жидкости более чем через 13 месяцев после заражения [55]. Более того, исследование персистенции вируса после вспышки вируса Эбола в 2014-2016 гг. выявило присутствии РНК вируса Эбола в семенной жидкости в течение 565 дней после заражения [56]. Кроме того, среди группы из 135 пациентов мужского пола с вирусом Эбола, которые находились под наблюдением с 2015 по 2017 год, 8% сообщили об эректильной дисфункции, а 12% – о снижении либидо [57]. Что касается вируса Зика, Counotte et al. [58] сообщили о наличии идентификации РНК вируса Зика в сперме в среднем в течение 40-370 дней. Однако Avelino-Silva et al. [59] обнаружили нормальную концентрацию половых гормонов в сыворотке крови и отрицательное значение РНК вируса Зика в сперме в образцах 6 пациентов через 1 год после заражения вирусом Зика, хотя в трех образцах наблюдалось нарушение подвижности, а у одного пациента было зарегистрировано низкое количество сперматозоидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нынешний обзор допускает, что недавняя пандемия коронавируса COVID-19 оказывает различное воздействие на мужское репродуктивное здоровье. Стоит отметить, что было недостаточно данных о мужской репродуктивной системе у пациентов с COVID-19, в то время как наиболее актуальные доказательства получены из небольших исследований без доступных данных долгосрочного наблюдения. В совокупности несколько гипотез этиопатогенеза предполагают, что инфекция SARS-CoV-2 может быть ответственна за нарушение функции яичек. АСЕ2 в основном экспрессируется в сперматогониях, клетках Лейдига и Сертоли яичка человека, что может привести к дисфункции яичек у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2. Кроме того, повреждение яичек может быть связано с воспалительным ответом и воспалением, связанным с высокой температурой, а в тяжёлых случаях — с приёмом лекарств. Таким образом, клинические и трансляционные (краткосрочные/долгосрочные) исследования в более крупных группах субъектов, инфицированных на настоящий момент, необходимы для оценки влияния COVID-19 на сперматогенез человека, определения защитных мер и лечебных подходов против повреждения яичек, а также формирования чётких выводов.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Эта статья не содержит никаких исследований с участием людей или животных, выполненных автором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Wu, Z., and McGoogan, J. M. (2020) Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese center for disease control and prevention, *JAMA*, **323**, 1239-1242.
- 2. World Health Organization (2020) WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Data last updated: 2021/3/12, URL: https://covid19.who.int.
- 3. Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., et al. (2020) Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study, *Lancet*, **395**, 1054-1062.
- Wang, T., Du, Z., Zhu, F., Cao, Z., An, Y., et al. (2020) Comorbidities and multi-organ injuries in the treatment of COVID-19, *Lancet*, **395**, e52, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30558-4.
- 5. Xu, J., Qi, L., Chi, X., Yang, J., Wei, X., et al. (2006) Orchitis: a complication of severe acute respiratory syndrome (SARS), *Biol. Reprod.*, **74**, 410-416.
- Corona, G., Baldi, E., Isidori, A. M., Paoli, D., Pallotti, F., et al. (2020) SARS-CoV-2 infection, male fertility and sperm cryopreservation: a position statement of the Italian Society of Andrology and Sexual Medicine (SIAMS) (Società Italiana di Andrologia e Medicina della Sessualità), *J. Endocrinol. Invest.*, 43, 1153-1157.
- Verdecchia, P., Cavallini, C., Spanevello, A., and Angeli, F. (2020) The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection, *Eur. J. Intern. Med.*, 76, 14-20.
- 8. Li, R., Yin, T., Fang, F., Li, Q., Chen, J., et al. (2020) Potential risks of SARS-CoV-2 infection on reproductive health, *Reprod. Biomed. Online*, **41**, 89-95.
- Ding, Y., He, L., Zhang, Q., Huang, Z., Che, X., et al. (2004) Organ distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: implications for pathogenesis and virus transmission pathways, *J. Pathol.*, **203**, 622-630.
- Gagliardi, L., Bertacca, C., Centenari, C., Merusi, I., Parolo, E., et al. (2020) Orchiepididymitis in a Boy With COVID-19, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **39**, e200-e202.
- 11. Pan, F., Xiao, X., Guo, J., Song, Y., Li, H., et al. (2020) No evidence of severe acute respiratory syndrome-coronavirus 2 in semen of males recovering from coronavirus disease 2019, *Fertil. Steril.*, **113**, 1135-1139.

- Nunes Duarte-Neto, A., de Almeida Monteiro, R. A., da Silva, L., Malheiros, D., de Oliveira, E. P., et al. (2020) Pulmonary and systemic involvement of COVID-19 assessed by ultrasound-guided minimally invasive autopsy, *Histopathology*, 77, 186-197, doi: 10.1111/his.14160.
- Yang, M., Chen, S., Huang, B., Zhong, J. M., Su, H., et al. (2020) Pathological findings in the testes of COVID-19 patients: clinical implications, *Eur. Urol. Focus*, 6, 1124-1129.
- Rastrelli, G., Di Stasi, V., Inglese, F., Beccaria, M., Garuti, M., et al. (2020) Low testosterone levels predict clinical adverse outcomes in SARS-CoV-2 pneumonia patients, *Andrology*, 9, 88-98, doi: 10.1111/andr.12821.
- Çayan, S., Uğuz, M., Saylam, B., and Akbay, E. (2020) Effect of serum total testosterone and its relationship with other laboratory parameters on the prognosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in SARS-CoV-2 infected male patients: a cohort study, *Aging Male*, doi: 10.1080/ 13685538.2020.1807930.
- Ma, L., Xie, W., Li, D., Shi, L., Ye, G., et al. (2020) Evaluation of sex-related hormones and semen characteristics in reproductive-aged male COVID-19 patients, *J. Med. Virol.*, doi: 10.1002/jmv.26259.
- Schroeder, M., Tuku, B., Jarczak, D., Nierhaus, A., Bai, T., et al. (2020) The majority of male patients with COVID-19 present low testosterone levels on admission to intensive care in Hamburg, Germany: a retrospective cohort study, *medRxiv*, doi: 10.1101/2020.05.07.20073817.
- Pal, R., and Banerjee, M. (2020) COVID-19 and the endocrine system: exploring the unexplored, *J. Endocrinol. Invest.*, 43, 1027-1031.
- Iglesias, P., Prado, F., Macías, M. C., Guerrero, M. T., Muñoz, A., et al. (2014) Hypogonadism in aged hospitalized male patients: prevalence and clinical outcome, *J. Endocrinol. Invest.*, 37, 135-141.
- Cardona Maya, W. D., Du Plessis, S. S., and Velilla, P. A. (2020) SARS-CoV-2 and the testis: similarity with other viruses and routes of infection, *Reprod. Biomed. Online*, 40, 763-764.
- 21. Society for Assisted Reproductive Technology (SART) (2020) SART and ASRM issue advice for infertility patients concerning the novel coronavirus (COVID-19), URL: https://www.Sart.Org/news-and-publications/news-

and-research/press-releases-and-bulletins/sart-and-asrmissue-advice-for-infertility-patients-concerning-thenovel-coronavirus-covid-19/.

- Li, D., Jin, M., Bao, P., Zhao, W., and Zhang, S. (2020) Clinical characteristics and results of Semen tests among men with Coronavirus disease 2019, *JAMA Netw. Open*, 3, e208292, doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.8292.
- Song, C., Wang, Y., Li, W., Hu, B., Chen, G., et al. (2020) Absence of 2019 novel coronavirus in semen and testes of COVID-19 patients, *Biol. Reprod.*, **103**, 4-6, doi: 10.1093/ biolre/ioaa050.
- Holtmann, N., Edimiris, P., Andree, M., Doehmen, C., Baston-Buest, D., et al. (2020) Assessment of SARS-CoV-2 in human semen – a cohort study, *Fertil. Steril.*, 114, 233-238.
- Paoli, D., Pallotti, F., Colangelo, S., Basilico, F., Mazzuti, L., et al. (2020) Study of SARS-CoV-2 in semen and urine samples of a volunteer with positive naso-pharyngeal swab, *J. Endocrinol. Invest.*, **43**, 1819-1822, doi: 10.1007/s40618-020-01261-1.
- Ning, J., Li, W., Ruan, Y., Xia, Y., Wu, X., et al. (2020) Effects of 2019 Novel Coronavirus on male reproductive system: a retrospective study, *Preprints*, doi: 10.20944/ preprints202004.0280.v1.
- Liu, X., Chen, Y., Tang, W., Zhang, L., Chen, W., et al. (2020) Single-cell transcriptome analysis of the novel coronavirus (SARS-CoV-2) associated gene ACE2 expression in normal and non-obstructive azoospermia (NOA) human male testes, *Sci. China Life Sci.*, 63, 1006-1015.
- Younis, J. S., Abassi, Z., and Skorecki, K. (2020) Is there an impact of the COVID-19 pandemic on male fertility? The ACE2 connection, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 318, E878-E880.
- Achua, J. K., Chu, K. Y., Ibrahim, E., Khodamoradi, K., Delma, K. S., et al. (2020) Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections on testis, *World J. Mens Health*, **38**, e56, doi: 10.5534/wjmh.200170.
- Li, M. Y., Li, L., Zhang, Y., and Wang, X. S. (2020) Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues, *Infect. Dis. Poverty*, 9, 45, doi: 10.1186/s40249-020-00662-x.
- Shen, Q., Xiao, X., Aierken, A., Yue, W., Wu, X., et al. (2020) The ACE2 expression in Sertoli cells and germ cells may cause male reproductive disorder after SARS-CoV-2 infection, *J. Cell. Mol. Med.*, 24, 9472-9477.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., et al. (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor, *Cell*, 181, 271-280.e8.
- 33. Wang, Z., and Xu, X. (2020) scRNA-seq profiling of human testes reveals the presence of the ACE2 receptor, a target for SARS-CoV-2 infection in spermatogonia, Leydig and Sertoli cells, *Cells*, **9**, 920, doi: 10.3390/cells9040920.
- Abobaker, A., and Raba, A. A. (2020) Does COVID-19 affect male fertility? *World J. Urol.*, doi: 10.1007/s00345-020-03208-w.
- Loveland, K. L., Klein, B., Pueschl, D., Indumathy, S., Bergmann, M., et al. (2017) Cytokines in male fertility and reproductive pathologies: immunoregulation and beyond, *Front. Endocrinol.*, 8, 307, doi: 10.3389/fendo.2017.00307.
- 36. Hedger, M. P., and Meinhardt, A. (2003) Cytokines and the immune-testicular axis, *J. Reprod. Immunol.*, **58**, 1-26.
- Guazzone, V. A., Jacobo, P., Theas, M. S., and Lustig, L. (2009) Cytokines and chemokines in testicular inflammation: a brief review, *Microsc. Res. Tech.*, **72**, 620-628.
- Tsilidis, K. K., Rohrmann, S., McGlynn, K. A., Nyante, S. J., Lopez, D. S., et al. (2013) Association between

endogenous sex steroid hormones and inflammatory biomarkers in US men, *Andrology*, **1**, 919-928.

- Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., et al. (2020) COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression, *Lancet*, 395, 1033-1034.
- Satie, A. P., Mazaud-Guittot, S., Seif, I., Mahé, D., He, Z., et al. (2011) Excess type I interferon signaling in the mouse seminiferous tubules leads to germ cell loss and sterility, *J. Biol. Chem.*, 286, 23280-23295.
- 41. Hedger, M. P. (2011) Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis, *J. Androl.*, **32**, 625-640.
- 42. Jung, A., and Schuppe, H. C. (2007) Influence of genital heat stress on semen quality in humans, *Andrologia*, **39**, 203-215.
- Patel, D. P., Guo, J., and Hotaling, J. M. (2020) The jury is still out: COVID-19 and male reproduction, *Fertil. Steril.*, **114**, 257-258.
- 44. Rismanbaf, A., and Zarei, S. (2020) Liver and kidney injuries in COVID-19 and Their effects on drug therapy, a letter to editor, *Arch. Acad. Emerg. Med.*, **8**, e17.
- Almasry, S. M., Hassan, Z. A., Elsaed, W. M., and Elbastawisy, Y. M. (2017) Structural evaluation of the peritubular sheath of rat's testes after administration of ribavirin: A possible impact on the testicular function, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 30, 282-296.
- 46. Adaramoye, O. A., Akanni, O. O., Adewumi, O. M., and Owumi, S. E. (2015) Lopinavir/ritonavir, an antiretroviral drug, lowers sperm quality and induces testicular oxidative damage in rats, *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 40, 51-57.
- Asuquo, O. R., Igiri, A. O, Olawoyin, O. O., and Eyong, E. U. (2007) Correlation of histological and histometric changes in rats testes treated with chloroquine phosphate, *Niger J. Physiol. Sci.*, 22, 135-139.
- Salonia, A., Corona, G., Giwercman, A., Maggi, M., Minhas, S., et al. (2020) SARS-CoV-2, testosterone and frailty in males (PROTEGGIMI): a multidimensional research project, *Andrology*, 9, 19-22, doi: 10.1111/andr. 12811.
- Khalili, M. A., Leisegang, K., Majzoub, A., Finelli, R., Panner Selvam, M. K., et al. (2020) Male fertility and the COVID-19 pandemic: systematic review of the literature, *World J. Mens Health*, 38, 506-520.
- Barták, V. (1973) Sperm count, morphology and motility after unilateral mumps orchitis, *J. Reprod. Fertil.*, 32, 491-494.
- Choi, H. I., Yang, D. M., Kim, H. C., Kim, S. W., Jeong, H. S., et al. (2020) Testicular atrophy after mumps orchitis: ultrasonographic findings, *Ultrasonography*, **39**, 266-271.
- De Paepe, M. E., and Waxman, M. (1989) Testicular atrophy in AIDS: a study of 57 autopsy cases, *Hum. Pathol.*, 20, 210-214.
- Hofny, E. R., Ali, M. E., Taha, E. A., Nafeh, H. M., Sayed, D. S., et al. (2011) Semen and hormonal parameters in men with chronic hepatitis C infection, *Fertil. Steril.*, 95, 2557-2559.
- Lorusso, F., Palmisano, M., Chironna, M., Vacca, M., Masciandaro, P., et al. (2010) Impact of chronic viral diseases on semen parameters, *Andrologia*, 42, 121-126.
- 55. Sissoko, D., Duraffour, S., Kerber, R., Kolie, J. S., Beavogui, A. H., et al. (2017) Persistence and clearance of Ebola virus RNA from seminal fluid of Ebola virus disease survivors: a longitudinal analysis and modelling study, *Lancet Glob. Health*, **5**, e80-e88.
- 56. Oka, M. J., Choi, M. J., Baller, A., White, S., Rogers, E., et al. (2016) Prevention of sexual transmission of Ebola in

Liberia through a national semen testing and counselling programme for survivors: an analysis of Ebola virus RNA results and behavioural data, *Lancet Glob. Health*, **4**, e736-743.

- De St Maurice, A., Ervin, E., Orone, R., Choi, M., Dokubo, E. K., et al. (2018) Care of Ebola survivors and factors associated with clinical Sequelae-Monrovia, Liberia, *Open Forum Infect. Dis.*, 5, ofy239, doi: 10.1093/ ofid/ofy239.
- Counotte, M. J., Kim, C. R., Wang, J., Bernstein, K., Deal, C. D., et al. (2018) Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: a living systematic review, *PLoS Med.*, 15, e1002611, doi: 10.1371/journal.pmed.1002611.
- Avelino-Silva, V. I., Alvarenga, C., Abreu, C., Tozetto-Mendoza, T. R., Canto, C., et al. (2018) Potential effect of Zika virus infection on human male fertility? *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **60**, e64, doi: 10.1590/S1678-9946201860064.

COVID-19 PANDEMIC AND MALE FERTILITY: CLINICAL MANIFESTATIONS AND PATHOLOGICAL MECHANISMS

Mini-Review

A. Abdel-Moneim

Molecular Physiology Division, Faculty of Science, Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt; E-mail: adel_men2020@yahoo.com; adel.hassan@science.bsu.edu.eg

The novel coronavirus disease-2019 (COVID-19) pandemic, caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has been a major public health emergency worldwide with over 118.27-million confirmed COVID-19 cases and 2.62-million deaths recorded, as of March 12, 2021. Although this disease primarily targets lungs, damages in other organs, such as heart, kidney, liver, and testis, may occur. Testis is the cornerstone of male reproduction, while reproductive health is the most valuable resource for continuity of the human race. Given the unique nature of SARS-CoV-2, the mechanisms of its impact on the testes have yet to be fully explored. Notably, coronaviruses have been found to invade target cells through the angiotensin-converting enzyme 2 receptor, which can be found in the respiratory, gastrointestinal, cardiovascular, urinary tract, and reproductive organs, such as testes. Coronavirus studies have suggested that testes might be a potential target for SARS-CoV-2 infection. The first etiopathogenic concept proposed by current hypotheses indicates that the virus can invade testes through the angiotensin-converting enzyme 2 receptor. Next, the activated inflammatory response in the testes, disease-associated fever, and COVID-19 medications might be implicated in testicular alterations. Although evidence regarding the presence of SARS-CoV-2 mRNA in semen remains controversial, this emphasizes the need for researchers to pay closer attention to sexually transmitted diseases and male fertility after recovering from COVID-19. In this review the latest updates regarding COVID-19-associated testicular dysfunction are summarized and possible pathogenic mechanisms are discussed.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, testis, manifestations, pathogenicity, male fertility

УДК 577.218

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА БЕЛКОВ L11-ОПЕРОНА ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ И L1-ОПЕРОНА АРХЕЙ

© 2021 А.О. Михайлина^{1*}, Е.Ю. Никонова¹, О.С. Костарева¹, В. Пиндл², М. Эрлахер³, С.В. Тищенко¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук, 142290 Пущино, Россия; электронная почта: alisamikhaylina15@gmail.com

² Медицинский университет Инсбрука, Институт медицинской химии и биохимии, 6020 Инсбрук, Австрия ³ Медицинский университет Инсбрука, Институт геномики и РНКомики, 6020 Инсбрук, Австрия

> Поступила в редакцию 15.10.2020 После доработки 24.01.2021 Принята к публикации 24.01.2021

Рибосомный белок L1 — консервативный двухдоменный белок, участвующий в формировании L1-выступа большой рибосомной субчастицы. В условиях дефицита 23S рибосомной РНК белок ингибирует собственную трансляцию, связываясь со специфическим участком в последовательности мРНК своего оперона (L11-оперона бактерий и L1-оперона архей). В работе продемонстрирована консервативность регуляторных свойств рибосомного белка L1 и его домена I в термофильных бактериях родов *Thermus* и *Thermotoga* и в галофильной архее *Haloarcula marismortui*. Наряду с этим, выявлены особенности регуляции оперона в термофильных бактериях, предполагающие наличие двух регуляторных участков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: регуляция экспрессии, L11-оперон, L1-оперон, p-белки, мРНК. **DOI:** 10.31857/S0320972521040023

введение

Рибосомный белок L1 участвует в формировании L1-выступа большой рибосомной субчастицы и является регулятором синтеза белков своего оперона. Белок L1 связывается со специфическим сайтом на собственной мРНК и ингибирует трансляцию всех цистронов рибосомных белков оперона. Детально изучена регуляция L11-оперона бактерии Escherichia coli (включающего гены рибосомных белков L1 и L11) [1] и L1-оперона архей рода Methanococcus (включающего гены рибосомных белков L1, L10 и L12) [2]. Участок связывания L1 на мРНК *E. coli* располагается в лидерной последовательности мРНК белка L11 [3], а у архей рода Methanococcus – в начале кодирующей последовательности гена белка L1 (между 29-м и 67-м нуклеотидами) [4]. L1-связывающие участки мРНК имеют высокую гомологию с участком связывания этого белка на 23S pPHK – как первичной, так и вторичной структуры.

Тем не менее чёткого подтверждения регуляторных свойств рибосомного белка L1 (р-белка) в других бактериях и археях на сегодняшний день не существует. Биоинформатический анализ L11-оперонов продемонстрировал наличие потенциальных регуляторных сайтов перед геном белка L11 (у Proteobacteria, Spirochaetes, Thermotoga и Tenericutes) и L1 (у Cyanobacteria, Actinobacteria и Chloroflexi); а в 40% геномов типа Firmicutes обнаружены два потенциальных L1-связывающих участка — перед генами белков L11 и L1 [5]. Ранее мы локализовали участки связывания белка L1 на мРНК L11-оперонов Thermus thermophilus и Thermotoga maritima, определив константы диссоциации комплексов L1мРНК [6]. В данной статье мы демонстрируем наличие двух L1-связывающих участков на мРНК L11-оперонов исследуемых термофильных бактерий, используя систему транскрипции-трансляции in vitro.

В галофильных археях ген белка L1 котранскрибируется с генами белков L10 и L12. Анализ последовательностей L1-оперона выявил предположительный участок связывания белка L1 в нетранслируемой области гена белка L1 [7], однако исследование возможности связывания этого участка с белком и регуляции синтеза белков оперона не проводилось. В данной работе мы определили L1-связывающий участок на

Принятые сокращения: 5'-НТО – 5'-нетранслируемая область; БСА – бычий сывороточный альбумин; р-белки – рибосомные белки; SD – последовательность Шайна–Дальгарно; SPR – поверхностный плазмонный резонанс.

^{*} Адресат для корреспонденции.

мРНК L1-оперона *Haloarcula marismortui* и показали регуляторные свойства р-белка L1 из этого организма.

Структурно-кинетический анализ комплексов L1–PHK [8] показал, что ведущую роль в этих взаимодействиях играет белковый домен I. Ранее было показано, что домен I белка L1 *T. thermophilus* (TthL1dI) обладает регуляторными свойствами полноразмерного белка, ингибируя синтез архейного белка L1 *Methanococcus* vannielli in vitro [9]. В данной работе демонстрируется консервативность взаимодействий белка L1 с мРНК, поскольку домены I р-белков L1 *T. thermophilus, T. maritima* и *H. marismortui* обладают регуляторными свойствами полноразмерных белков L1 в системе *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение генетических конструкций, несущих гены полноразмерного белка L1 и его домена I *H. marismortui* (HmaL1, HmaL1dI). Для получения белков HmaL1 и HmaL1dI были созданы экспрессионные векторы на основе pET-11a (pET-11a HmaL1 и pET-11a HmaL1dI). В соответствии с известной нуклеотидной последовательностью, кодирующей HmaL1, были синтезированы праймеры («Евроген», Россия) (табл. 1), содержащие последовательности для расщепления сайт-специфическими эндонуклеазами рестрикции FauNDI и BamHI, необходимые для вставки гена в экспрессионный вектор рЕТ-11а. В качестве матрицы для получения полноразмерного белка была использована геномная ДНК *H. marismortui*.

Домен II белка L1 является вставкой в домен I. Ген домена I получен с помощью метода перекрывающихся участков с использованием 4-х праймеров и 3-х ПЦР (полимеразная цепная реакция). Праймеры Р1 и Р3 (табл. 1) были использованы для амплификации фрагмента ДНК, содержащего участок до вырезаемого домена II и фрагмент после него. Пара праймеров Р2 и Р4 (табл. 1) была использована во второй ПЦР для амплификации фрагмента ДНК, содержащего участок после вырезаемого домена и фрагмента до него. В качестве матрицы для ПЦР была использована плазмида pET-11а, несущая ген белка HmaL1. Таким образом, оба амплифицированных фрагмента содержали перекрывающиеся участки. Эти фрагменты смешивали, денатурировали и отжигали друг на друга для получения гетеродуплекса, который затем использовали в третьей ПЦР для амплификации в полноразмерный фрагмент с помощью двух праймеров к гену rplA (прямого P1 и обратного P2).

Генетические конструкции TthL1, TthL1dI, TmaL1 и TmaL1dI были получены в нашей лаборатории ранее [6, 8].

Создание генетических конструкций, несущих фрагменты L11-оперона T. maritima, T. ther*торніци* и L1-оперона *Н. тагізтотці*. В качестве матриц в сопряженной системе транскрипциитрансляции E. coli были использованы плазмиды на основе вектора pUC18, содержащие фрагменты L11-оперона T. maritima, T. thermophilus и L1-оперона *H. marismortui* под контролем Т7-промотора. Плазмиды pTmaL11-L1(-50) и pTthL11-L1(-46) содержали гены белков L11 и L1, а также 50 или 46 нуклеотидов (н.) 5'-нетранслируемой области (5'-HTO) L11-оперона T. maritima и T. thermophilus соответственно. Плазмида pHmaL1-L10(-74) содержала гены белков HmaL1 и HmaL10 и 74 нуклеотида 5'-HTO L1-оперона *H. marismortui* (рис. 1).

Для отдельного исследования двух L1-регуляторных участков мРНК T. maritima и T. thermophilus были получены укороченные конструкции. Плазмиды pTthL1(-100) и pTmaL1(-25) содержали только ген белка L1 и последние 100 или 25 нуклеотидов белка L11 (рис. 1). При использовании в качестве матрицы укороченной конструкции, содержащей ген белка TthL1 и последние 100 н. гена белка TthL11, включая область перекрывания открытых рамок считывания генов белков TthL11 и TthL1 (pTthL1(-100)), в сопряженной системе транскрипции-трансляции белок L1 не синтезировался (данные не представлены). По всей видимости, в T. thermophilus перед геном белка L1 нет собственной последовательности SD, а его трансляция сопряжена с трансляцией белка L11. Для того чтобы оценить способность белка TthL1 регулировать свой синтез при взаимодействии с участком мРНК в области перекрывания генов р-белков L11 и L1, мы добавили к 5'-концу укороченной конструкции pTthL1(-100) участок, содержащий последовательность SD (рис. 1). Плазмиды pTmaL11(-50) и pTthL11(-46) содержали только ген белка L11 и 50/46 нуклеотидов 5'-HTO Т. maritima и Т. thermophilus соответственно (рис. 1).

Согласно известной нуклеотидной последовательностью L11-оперона *T. maritima*, *T. thermophilus* и L1-оперона *H. marismortui*, были синтезированы праймеры («Евроген», Россия) (табл. 1), несущие сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции, необходимые для вставки гена в экспрессионный вектор pUC18. Прямой праймер содержал последовательность промотора для PHK-полимеразы фага T7 (табл. 1). На рисунке 1 представлены схемы полученных конструкций фрагментов L11-оперона и L1-оперона.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ УЧАСТКИ L11- И L1-ОПЕРОНОВ

Фрагмент гена	Прямой праймер, 5'→3'	Обратный праймер, 5'→3'
HmaL1	P1 FauNDI GGAATC <u>CATATG</u> GCAGATCAGGAA	P2 BamHI CGC <u>GGATCC</u> TCAGGCAACCTCCATCGCA
HmaL1dI	P1 P4 CGGTGAGGTCATCGAAGGTCCGCACG	P3 CGGTACCGGTGCCAGCAGG P2
pTth <i>L11-L1</i> (-46)	P5 XbaI Aggtcgac <u>tctaga</u> aatacgactcactatag- Aggcctagaggcgtttgca	P6 EcoRI Atgattac <u>gaattc</u> ttaggagtgggggttgat- gcgca
pTth <i>L11</i> (-46)	Р5	P7 EcoRI ATCTAG <u>GAATTC</u> TTAGATCTCCAGGACCTGCTC
pTth <i>L1</i> (-100)	P8 XbaI Aggtcgac <u>Tctaga</u> aatacgactcactatag- <u>Gaaggagatatacat</u> atggtggtgggc- gctccggaggtgaagg	Р7
pTma <i>L11-L1</i> (-50)	P9 HindIII CTACTGCA <u>AAGCTT</u> AATACGACTCACTATAG- TGAGAAAACGTGGGAGGAGGA	P10 XmaI ATCTAG <u>CCCGGG</u> TTACTCTTTCAACAGACTCT- GAA
pTma <i>L11</i> (-50)	Р9	P10 XmaI ATCTAG <u>CCCGGG</u> TTACAAGCTGTTTGCGTTC- AAATC
pTma <i>L1</i> (-25)	P11 HindIII CTACTGCA <u>AAGCTT</u> AATACGACTCACTATAG- ATGCGGAAAGGAGGA	Р9
pHma <i>L1-L10</i> (-74)	P12 HindIII CTACTGCA <u>AAGCTT</u> AATACGACTCACTATAG- CTACTCGCACGAGACAGGCATC	P13 EcoRI Atgattac <u>gaattc</u> ttactgaatgcgtgcgtc- ggcacc

Таблица 1	. Послеловательности использованных	праймен	ров

Примечание. Праймеры были использованы для клонирования генов белков HmaL1 и HmaL1dI и фрагментов L11-оперона *T. maritima, T. thermophilus* и L1-оперона *H. marismortui*. Сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции подчеркнуты, серым выделена последовательность T7-промотора, рамкой выделен добавленный участок, содержащий последовательность Шайна–Дальгарно (SD).

Выделение белков L1 и L1dI. Получение белков TthL1, TthL1dI, TmaL1 и TmaL1dI описано ранее [6, 8]. Для получения штаммов-суперпродуцентов белка L1 *H. marismortui* и его домена I была использована система Штудиера [10]. Поскольку ген белка HmaL1 содержит редкие в *E. coli* кодоны для Gly, Arg и Ile, клетки штамма BL21(DE3) предварительно трансформировали плазмидой pRARE, которая несет гены тPHK, узнающие редкие кодоны (AGG/AGA (Arg), CGG (Arg), AUA (Ile), CUA (Leu), CCC (Pro),

GGA (Gly)) [11]. Штамм *E. coli* BL21 (DE3) рRARE трансформировали плазмидой pET-11a, содержащей ген белка HmaL1 или HmaL1dI. Несколько колоний высевали в жидкую среду LB (абб. от англ. lysogeny broth) (100 мкг/мкл ампициллина и 35 мкг/мкл хлорамфеникола) и культивировали в течение ночи при 37 °C. Затем клетки пересевали в 500 мл среды LB и культивировали при температуре 37 °C до получения оптической плотности $A_{590} \approx 0,6$ о.е., после чего к клеткам добавляли индуктор IPTG (изопро-



Рис. 1. Схемы генетических конструкций фрагментов L11-оперона *T. maritima* (*a*), *T. thermophilus* (*б*) и L1-оперона *H. marismortui* (*b*), использованных в качестве матриц в сопряженной системе транскрипции-трансляции *E. coli in vitro*: pTmaL11-L1(-50) и pTthL11-L1(-46) – гены белков L11 и L1, и 50/46 н. 5'-HTO перед геном белка L11; pTmaL11(-50) и pTthL11(-46) – фрагмент гена белка L11 и 50/46 н. 5'-HTO перед ним; pTmaL1(-25) – ген белка TmaL1 и 25 н. 5'-HTO перед ним; pTthL1(-100) – ген белка TthL1, последние 100 н. гена белка TthL11, включая область перекрывания открытых рамок считывания генов белков TthL11 и TthL1, и последовательность SD; pHmaL1-L10(-74) – гены белков HmaL1 и HmaL10 и 74 н. 5'-HTO перед геном белка HmaL1

пил- β -D-1-тиогалактопиранозид) до конечной концентрации 0,5 мМ. После добавления индуктора клетки продолжали инкубировать в тех же условиях в течение 3 ч. Затем их осаждали низкоскоростным центрифугированием (8 000 g, 15 мин, 4 °C) и ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 50 мМ Tris-HCl, 2 M KCl, 50 мМ MgCl₂, 5 мМ β -MЭ, 1 мМ ЭДТА-Na2, 0,1 мМ PMSF, pH 7,5 при 25 °C. Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Sonic Dismembrator 550 («Fisher Scientific», США). Затем центрифугированием последовательно осаждали клеточный дебрис (14 000 g, 30 мин, 4 °C) и рибосомы (90 000 g, 1 ч, 4 °C).

К безрибосомному лизату добавляли сульфат аммония и КСІ до конечной концентрации 1,5 и 3 М соответственно. Образец наносили на колонку с носителем бутил-сефароза («GE Healthcare», США), уравновешенную со стартовым буфером (50 мМ Tris-HCl, 3 М KCl, 1,5 М (NH₄)₂SO₄, pH 7,5 при 25 °C). Элюирование белков проводили обратным линейным градиентом концентрации (NH₄)₂SO₄ от 1,5 М до 0 М в стартовом буфере. Препарат белка HmaL1 (или HmaL1dI) диализовали против буфера (50 мМ Tris-HCl, 3 M KCl, pH 7,5 при 25 °C) и дополнительно очищали Superdex 75. Чистоту белковых препаратов оценивали при помощи Ds-Na-ПААГ-электрофореза [12].

Фрагменты мРНК *T. thermophilus, T. maritima, H. marismortui* и РНК *H. marismortui*. Для кинетических исследований мы использовали полученные синтетически («Синтол», Россия) модифицированные биотином фрагменты мРНК L11-оперона *T. thermophilus* и *T. maritima*, L1-оперона *H. marismortui*, содержащие потенциальные регуляторные участки, а также специфический фрагмент 23S рРНК *H. marismortui*, содержащий три спирали (Н76, Н77, Н78) [13]. Биотин располагался на 3'-конце фрагментов мРНК.

Кинетический анализ взаимодействия белка L1 и его домена I *T. thermophilus, T. maritima* и *H. marismortui* со специфическими фрагментами мРНК и рРНК методом SPR. Кинетический анализ взаимодействия белков со специфическими фрагментами РНК проводили с помощью поверх-

ностного плазмонного резонанса (SPR – surface plasmon resonance) [14] на системе ProteOn XPR36 («Bio-Rad», США). Биотинилированные фрагменты PHK наносили на сенсорные чипы NLC («Bio-Rad», США) с иммобилизованным авидином [15].

Серии разведений из пяти концентраций аналита (L1 или L1dI) готовили в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl, 175 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 0,05% Tween-20, pH 7,5 при 25 °C. Скорость протока составляла 30 мкл/мин, время ассоциации — 300 сек, время диссоциации — 700—1200 сек. Все эксперименты по связыванию проводили при температуре 25 °C.

Набор из 3–5 сенсограмм обсчитывали в программе BIAEvaluation («Biacore», США) с использованием модели Ленгмюра (1 : 1) или двухстадийной реакции.

Анализ ингибирования синтеза белков L11-оперона T. thermophilus, T. maritima и L1-оперона *H. marismortui* в сопряженной системе транскрипции-трансляции in vitro. Для экспериментов в сопряженной системе транскрипции-трансляции in vitro использовали набор PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit («New England Biolabs», Германия). Матрицами служили плазмиды, несущие фрагменты L11-оперона T. thermophilus, T. maritima или L1-оперона H. maris*mortui* под контролем Т7-промотора (рис. 1). В качестве отрицательного контроля использовали плазмиду, несущую ген р-белка L3 из *М. jan*naschii (MjaL3). Реакцию проводили согласно рекомендациям производителя в присутствии L-[³⁵S]метионина в концентрации 11 мКи/мл («PerkinElmer», США). Для ингибирования синтеза белков с плазмиды в реакционную смесь добавляли белок L1 или его домен I (0–20 мкМ). В качестве контроля использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) в тех же количествах. Для опытов по конкуренции в смесь добавляли специфический для белка L1 фрагмент 23S рРНК до 20 мкМ. Реакцию проводили при 37 °С в течение 1 ч, после чего к смеси добавляли буфер для Ds-Na-ПААГ-электрофореза и наносили на полиакриламидный гель.

Анализ способности белка L1 ингибировать in vitro синтез мРНК L11-оперона T. thermophilus и T. maritima, а также L1-оперона H. marismortui. Фрагменты мРНК были получены методом транскрипции in vitro с использованием РНК-полимеразы фага T7, как в отсутствие р-белка L1, так и в присутствии его 20 мкМ. В качестве матрицы использовали плазмиды рTthL11(-46), pTmaL11(-50) и pHmaL1-L10(-74), линеаризованные с помощью эндонуклеаз рестрикции EcoRI, XmaI и EcoRI соответственно (табл. 1, рис. 1). Плазмиды содержали гены, кодирующие мРНК соответствующих оперонов, под контролем Т7-промотора. Анализ транскриптов проводили с помощью электрофореза в 5%-ном ПААГ (19:1) в присутствии 8 М мочевины и электродного буфера (40 мМ Tris-Aцетат, 0,2 мМ ЭДТА-Na2, pH 8,0 при 25 °C).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фрагменты мРНК L11-оперона T. thermophilus, T. maritima и L1-оперона H. marismortui, содержащие L1-связывающие детерминанты. Ранее мы определили, что в *Т. maritima* имеется два потенциальных участка связывания белка L1 на мРНК L11-оперона [6]. Первый участок расположен в лидерной последовательности мРНК белка L11 (mRNA_{TmaL11}), второй участок включает лидерный и кодирующий участки мРНК белка L1 (mRNA_{TmaL1}) (рис. 2, *a*). В *T. thermophilus* мы обнаружили лишь один потенциальный участок связывания белка L1, который расположен между кодирующими частями мРНК белков TthL11 и TthL1 (mRNA_{TthL1}) (рис. 2, δ). Мы получили соответствующие фрагменты мРНК и определили сродство TthL1 и TmaL1 к этим фрагментам методом SPR [6]. Оказалось, что при взаимодействии белка L1 с этими фрагментами мРНК, образуются стабильные комплексы TthL1-mRNA_{TthL1} и TmaL1-mRNA_{TmaL11}, однако комплекс TmaL1-mRNA_{TmaL1} не формируется. Несмотря на то, что все основные детерминанты для РНК-белкового взаимодействия были сохранены, фрагмент mRNA_{TmaL1} не содержал нуклеотид С+17, который, согласно данным о структуре комплекса TthL1–mRNA, способен образовывать две закрытые от растворителя водородные связи с белком L1, которые ранее считались несущественными для РНК-белкового взаимодействия [16]. Мы получили удлинённый на 2 пары нуклеотидов фрагмент mRNA_{Tmal1} (рис. 2, a) и показали, что он образует стабильный комплекс с белком L1.

Детальный анализ геномной последовательности L11-оперона *Т. thermophilus* на основе гомологии со структурно-консервативным L1-связывающим модулем [17] позволил обнаружить второй предположительный участок связывания белка L1 на мРНК L11-оперона *Т. thermophilus*, который оказался расположен перед геном белка L11 (mRNA_{TthL11}) (рис. 2, *б*). Взаимодействие с этим фрагментом мРНК также было исследовано.

Опероны, регулируемые белком L1 в археях, отличаются от бактериальных. В *H. marismortui* ген белка L1 котранскрибируется с генами бел-



Рис. 2. a — Организация генов в L11-опероне *T. maritima*. Пунктирной рамкой на фрагменте mRNA_{Tmall} выделены добавленные пары нуклеотидов. Нуклеотиды 5'-НТО соответствующего гена обозначены знаком (-), нуклеотиды смысловой части мPHK обозначены знаком (+); δ — организация генов в L11-опероне *T. thermophilus*; a — организация генов в L1-опероне *H. marismortui*; a — вторичная структура специфического фрагмента 23S pPHK *H. marismortui*. Также на рисунке представлены предположительные вторичные структуры фрагментов мPHK, с которыми может взаимодействовать р-белок L1. Стрелками показано положение L1-связывающих участков на соответствующей полицистронной мPHK. На фрагментах мPHK в рамке выделены нуклеотиды, образующие консервативные контакты с белком L1, серым показан старт-кодон

ков L10 и L12. В лидерной последовательности мРНК белка L1 *H. marismortui* находится участок, гомологичный консервативному сайту связывания данного белка на мРНК, также схожий с сайтом связывания белка HmaL1 на 23S рРНК *H. marismortui* [13] (рис. 2, *в*, *г*).

Анализ взаимодействия белков L1 *T. thermophilus*, *T. maritima* и *H. marismortui*, а также их доменов I со специфическими фрагментами мРНК тех же организмов. Для проверки способности полноразмерных белков TthL1, TmaL1, HmaL1, а также их доменов I взаимодействовать с определенными участками на мРНК соответствующих оперонов мы получили биотинилированные фрагменты мРНК, содержащие эти предположительные L1-связывающие участки. Методом SPR были определены константы диссоциации (K_D) комплексов TthL1 (TthL1dI), TmaL1 (TmaL1dI), (рис. 3) и HmaL1 (HmaL1dI) (рис. 4) со специфическими фрагментами мРНК (табл. 2).

Оказалось, что сродство TthL1 и TthL1dI к фрагменту мРНК_{TthL11} почти на порядок выше, чем к фрагменту мРНК_{TthL1} (табл. 2). Константы</sub>

a



Рис. 3. Сенсограммы кинетического анализа взаимодействия белка L1 и его домена I T. thermophilus и T. maritima со специфическими фрагментами мРНК. а – Соответствующие мРНК_{L11}; б – соответствующие мРНК_{L1}. Для каждого набора сенсограмм указаны используемые концентрации аналита. Ровные линии соответствуют теоретической аппроксимации полученных экспериментальных данных с использованием модели Ленгмюра (1:1) (а) или двухстадийной реакции (б)



Рис. 4. Сенсограммы кинетического анализа взаимодействия белков HmaL1 и HmaL1dI со специфическими фрагментами мРНК. Для каждого набора сенсограмм указаны используемые концентрации аналита. Ровные линии соответствуют теоретической аппроксимации полученных экспериментальных данных с использованием модели Ленгмюра (1 : 1)

диссоциации (K_D) комплексов белков TmaL1 и TmaL1dI с мРНК_{TmaL1} сравнимы с K_D комплексов белков с мРНК_{TmaL11} (табл. 2). Взаимодействие в комплексах TthL1(TthL1dI) – мРНК_{TthL11} и TmaL1(TmaL1dI) – мРНК_{TmaL11} (рис. 3, *a*) описывается простой моделью Ленгмюра (1 : 1). Взаимодействие белков со специфическими фрагментами мРНК_{L1} с лучшим приближением ($\chi^2 < 10$) описывается моделью двухстадийной реакции, которая предполагает образование промежуточного комплекса (рис. 3, *б*).

HmaL1 и HmaL1dI связываются с фрагментом мРНК_{HmaL1}, содержащим предполагаемый регуляторный участок L1-оперона *H. marismortui* (рис. 4, табл. 2). Причем это взаимодействие слабее, чем со специфическим фрагментом 23S рРНК (табл. 2), что согласуется с классическими принципами регуляции синтеза р-белков. Сродство доменов I к специфическим фрагментам мРНК сравнимо со сродством полноразмерных белков, что позволяет предположить, что как бактериальный, так и архейный домен I белка L1 обладает регуляторными свойствами наряду с полноразмерными белками.

Исследование способности белка L1 регулировать синтез белков своего оперона на уровне транскрищии. Чтобы исключить влияние р-белка L1 исследуемых термофильных бактерий и археи на транскрипцию мРНК своего оперона, мы проанализировали эффективность синтеза мРНК методом транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7. Исследование проводили как в присутствии, так и в отсутствие р-белка L1. Анализ мРНК транскриптов показал, что р-белок L1 не оказывает влияния на уровень транскрипции мРНК L11-оперона

Комплекс	ka ₁ , (×10 ³ M ⁻¹ s ⁻¹)	kd_1 , (×10 ⁻⁴ s ⁻¹)	ka ₂ , (×10 ⁻⁶ s ⁻¹)	kd_2 , (×10 ⁻⁵ s ⁻¹)	К _D , (нМ)
Tmal.1-MPHK	2.79	6.4	_	_	2 29
TmaL1dI-MPHK _{TmaL11}	1190	23,5	_	_	1,97
TmaL1-мPHK _{TmaL1}	272	0,1	738	10,8	3,78
TmaL1dI-мPHK _{TmaL1}	986	22,3	456	78	2,26
TthL1–мРНК _{TthL11}	137	2,67	_	_	1,93
TthL1dI—мРНК _{TthL11}	810	13	_	_	1,60
TthL1–мРНК _{TthL1}	33	4,7	1,14	9,65	14,24
TthL1dI—мРНК _{TthL1}	5,88	3,87	43	248	65,82
HmaL1–мPHK _{HmaL1}	0,98	4,09	_	_	417
HmaL1dI–мPHK _{HmaL1}	0,64	5,44	_	_	850
HmaL1–pPHK	1,16	0,53	_	_	45,6
HmaL1dI-pPHK	2,5	1,7	-	_	71,2
		1			

Таблица 2. Кинетические параметры взаимодействия белка L1 и его домена I *T. thermophilus*, *T. maritima* и *H. marismortui* со специфическими фрагментами мРНК

Примечание. $K_D = kd_1/ka_1$; $ka_1 - константа скорости ассоциации первой стадии реакции; <math>kd_1 - константа скорости диссоциации первой стадии реакции; <math>K_D - кажущаяся константа диссоциации; ka_2 и kd_2 - константы скорости ассоциации и диссоциации второй стадии реакции соответственно.$

T. thermophilus и *T. maritima*, а также L1-оперона *H. marismortui* (рис. 5).

Таким образом, мы показали, что исследуемые белки не регулируют синтез белков своего оперона на уровне транскрипции.

Анализ регуляторных свойств рибосомного белка L1 T. maritima и T. thermophilus. Последующие исследования мы проводили в сопряженной системе транскрипции-трансляции E. coli in vitro. В наших экспериментах были использованы матрицы, несущие разные участки L11-оперона T. thermophilus и \overline{T} . maritima. Четыре конструкции содержали один из генов белка, L11 или L1, (pTmaL11(-50), pTthL11(-46), pTmaL1(-25) и pTthL1(-100)) (рис. 1); две конструкции содержали гены двух белков, L11 и L1. (pTmaL11-L1(-50) и pTthL11-L1(-46)) (рис. 1). В реакционную смесь добавляли различные количества L1/L1dI T. thermophilus или T. maritima. Как полноразмерные белки L1, так и их домены I ингибировали синтез белков соответствующих конструкций (рис. 6, 7).

Было выявлено, что добавление в систему белка L1 ингибирует дозозависимым образом синтез обоих белков L11-оперона (L11 и L1), как на мРНК *T. thermophilus*, так и *T. maritima*. Более того, при добавлении домена I белка L1 также происходит ингибирование синтеза обоих белков (рис. 6). В экспериментах по конкурентному ингибированию добавление специфического фрагмента 23S рРНК *T. thermophilus*, содержащего L1-связывающий участок, ингибирования в обоих случаях (TthL1 и TmaL1) не происходит (рис. 6).

Была проверена эффективность синтеза белков с укороченных конструкций, содержащих только по одному участку связывания белка L1 и одному гену L11-оперона *T. thermophilus* и *T. maritima* в присутствии белка L1. Показано, что как полноразмерный белок, так и его домен I ингибируют синтез белков L11 и L1 с соответствующих конструкций (рис. 7).

Анализ регуляторных свойств рибосомного белка L1 археи *H. marismortui*. Регуляторные свойства белка HmaL1 и его домена I были также исследованы в сопряженной системе транскрипции-трансляции *in vitro* (рис. 8). В качестве матрицы использовали конструкцию, несущую два гена L1-оперона *H. marismortui*, кодирующие белки L1 и L10, и 5'-НТО (74 н.), предположительно, включающую регуляторный участок (рHmaL1-L10(-74), рис. 1, в). При добавле-



Рис. 5. Электрофоретический анализ транскрипции фрагментов мРНК. В качестве матрицы для транскрипции *in vitro* использовали конструкции, содержащие ген белка L11 и 5'-НТО перед ним термофильных бактерий: a - pTthL11(-46); $\delta - pTmaL11(-50)$; e - конструкция, содержащая гены белков HmaL1 и HmaL10 и 5'-НТО перед геном белка HmaL1 – pHmaL1-L10(-74)



Рис. 6. Авторадиограмма белков L11 и L1 *T. thermophilus* (*a*) и *T. maritima* (δ), синтезированных в присутствии L-[³⁵S]метионина, белка L1 (в различном количестве), его домена I, или БСА. В качестве матрицы в сопряженной системе транскрипции–трансляции использовали конструкции, несущие оба гена L11-оперона – *rplK* и *rplA*, кодирующие белки L11 и L1 соответственно, и 5'-HTO (pTmaL11-L1(-50) и pTthL11-L1(-46), рис. 1, *a*, δ)



Рис. 7. Авторадиограммы белков L11 *T. thermophilus* и *T. maritima* (*a*, *в*) и белков L1 *T. thermophilus* и *T. maritima* (*б*, *е*), синтезированных в присутствии L-[³⁵S]метионина и белка L1 (в различной концентрации), его домена I, БСА и фрагмента 23S pPHK *T. thermophilus*, содержащего L1-связывающий участок. В качестве матрицы в сопряженной системе транскрипции-трансляции были использованы укороченные конструкции, содержащие только по одному L1-связывающему участку и одному гену L11-оперона: *а*, *в* – ген белка L11 и участок 5'-НТО перед ним (pTmaL11(-50), pTthL11(-46), рис. 1); *б*, *е* – ген белка L1 и участок перед ним (pTmaL1(-25) и pTthL1(-100), рис. 1)

нии в систему как белка HmaL1, так и HmaL1dI, дозозависимым образом ингибируется синтез обоих белков (L1 и L10) (рис. 8). В экспериментах по конкурентному ингибированию в обоих случаях добавление специфического фрагмента 23S pPHK *H. marismortui* (рис. 2, *г*), содержащего L1-связывающий участок, ингибирующий эффект HmaL1 или HmaL1dI отсутствует (рис. 8).



Рис. 8. Авторадиограмма белков L1 и L10 *H. marismortui*, синтезированных в присутствии L-[³⁵S]метионина, белка HmaL1 (в различных концентрациях), HmaL1dI или БСА. В качестве матрицы в сопряженной системе транскрипции-трансляции *in vitro* использовали плазмиду, несущую гены двух белков L1-оперона *H. marismortui* – L1 и L10, а также 5'-HTO (pHmaL1-L10(-74), рис. 1, *г*)

Для проверки специфичности взаимодействия белка L1 с мРНК были поставлены контрольные эксперименты. В качестве отрицательного контроля использовали плазмиду, несущую ген рибосомного белка L3 *M. jannaschii* (MjaL3) [18] (рис. 9), где было показано, что L1 не ингибирует экспрессию гена белка другого оперона. Как контроль на специфичность взаимодействия в экспериментах использовали белок БСА. Синтез белков L11-оперона *T. thermophilus*, *T. maritima* и L1-оперона *H. marismortui* не зависел от добавления БСА в реакционную систему (рис. 6–8).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Взаимодействие белка L1 с участками связывания мРНК L11-оперона и L1-оперона. В результате сравнительного структурного анализа комплексов TthL1 со специфическими фрагментами мРНК и рРНК были определены нуклеотиды, формирующие структурно-консервативный модуль РНК, необходимый для образования стабильного комплекса РНК–L1 [17]. Проведённый нами анализ геномных последовательностей *T. thermophilus* и *T. maritima* в районе L11-оперонов показал, что в мРНК этих бак-

РЕГУЛЯТОРНЫЕ УЧАСТКИ L11- И L1-ОПЕРОНОВ



Рис. 9. Авторадиограмма белка MjaL3, синтезированного в присутствии L-[35 S]метионина при избытке белка L1 или его домена I: *a* – *T. thermophilus*; *б* – *T. maritima* ; *в* – *H. marismortui*. В качестве матрицы в сопряженной системе транскрипции-трансляции *in vitro* использована плазмида, несущая ген рибосомного белка MjaL3

терий имеется два потенциальных участка связывания белка L1. Первый участок расположен, как у *E. coli*, в лидерной последовательности мРНК белка L11. Второй участок в *T. maritima* включает нетранслируемый лидерный участок и начало кодирующей части мРНК белка L1 (17 н.) (рис. 2, *a*). В *T. thermophilus* второй L1-связывающий участок находится в области перекрывания генов белков L11 и L1 (рис. 2, δ). Эти участки гомологичны L1-связывающему сайту на рРНК [17].

Мы показали, что бактериальные рибосомные белки L1 *T. thermophilus* и *T. maritima* имеют высокое сродство к двум участкам на мРНК L11-оперона. Сродство р-белка L1 к этим участкам мРНК сравнимо ($K_D = 10^{-9}-10^{-8}$ М (табл. 2)) с полученными ранее данными по вза-имодействию TthL1 с фрагментом мРНК *М. vannielii* ($K_D = 8,6 \times 10^{-9}$ М) [19].

Ранее нам не удавалось детектировать взаимодействие белка TmaL1 с фрагментом мРНК T. maritima, содержащим лидерный участок мРНК L1. В составе этого фрагмента были сохранены все основные детерминанты для РНКбелкового взаимодействия [6], но длина концевой спирали была короче на одну пару нуклеотидов по сравнению с двумя другими фрагментами мРНК (рис. 2, *a*, mRNA_{TmaL1}, пунктирная рамка). Мы предположили, что отсутствие этих нуклеотидов привело к потере двух водородных связей, важных для ориентации белка на молекуле РНК. В комплексе TthL1-мРНК M. vannielii Thr168, расположенный в домене I белка TthL1, образует две закрытые от растворителя водородные связи с рибозой одного из нуклеотидов последней пары фрагмента мРНК (рис. 2, *a*, mRNA_{TmaL1}, пунктирная рамка) [17]. В TmaL1 присутствует аналог этого аминокислотного остатка (Thr168). Ранее мы предполагали, что данные контакты не играют определяющей роли в формировании комплекса L1-PHK. Однако удлинение фрагмента этого участка мРНК на две пары нуклеотидов (рис. 2, *a*) привело к образованию комплекса с белками TmaL1 и TmaL1dI (табл. 2). Таким образом, вероятно, роль водородной связи между белком и нуклеотидом последних двух пар концевой спирали фрагмента мРНК (U-A (-13/+16) и G-C (-14/+17) в мРНК_{TmaL1}) не менее важна для образования прочного комплекса, чем выявленные ранее водородные связи между белком L1 и консервативным L1-связывающим модулем (выделен рамкой на рис. 2).

Таким образом, р-белок L1 как в *T. thermophilus*, так и в *T. maritima*, взаимодействует с двумя специфическими участками на мРНК своего оперона. По всей видимости, связываясь с этими участками мРНК, р-белок L1 может регулировать уровень синтеза белков L11-оперона в соответствующих организмах *in vitro* и *in vivo*.

Однако характер взаимодействия белков L1 с фрагментами мРНК_{L1} и мРНК_{L11} может различаться. Анализ взаимодействия как полноразмерного p-белка L1, так и его домена I со специфическими фрагментами мРНК_{L11} методом поверхностного плазмонного резонанса показывает, что наиболее подходящей является модель Ленгмюра (1 : 1) (рис. 3, *a*, табл. 2). Взаимодействие белков со специфическими фрагментами мРНК_{L1} можно описать только моделью двухстадийной реакции (рис. 3, б, табл. 2). Такая модель была использована нами ранее для описания взаимодействий в комплексах мутантных форм белка TthL1 со специфическим фрагментом 23S рРНК [16]. В этой модели два компонента формируют сначала промежуточный комплекс с константами скорости ассоциации и диссоциации k_{a1} и k_{d1} , далее образуя конечный комплекс с кинетическими константами k_{a2} и k_{d2}. Промежуточный комплекс формируется быстро, затем следует медленный конформационный переход в более стабильный комплекс.

В мРНК L1-оперона архей *H. marismortui* мы обнаружили только один участок, гомологичный консервативному участку связывания белка L1 на 23S рРНК, — в лидерной последовательности мРНК белка L1 (рис. 2, *в*, *г*). НтаL1 и его домен I связываются с этим участком мРНК, причем это взаимодействие слабее, чем с рибосомной РНК (K_D (HmaL1–мРНК_{Нта}) = 417 нМ, K_D (HmaL1–рРНК_{Нта}) = 45,6 нМ, табл. 2). Такое различие согласуется с принципом классической регуляции синтеза рибосомных белков (ингибирование по принципу обратной связи), основанным на конкуренции между двумя участ-ками связывания.

Сродство домена I как бактериальных, так и архейного белка L1 к фрагментам мРНК является примерно таким же, как сродство полноразмерного белка (K_D (HmaL1–мРНК_{Нта}) = 417 нМ, K_D (HmaL1dI–мРНК_{Нта}) = 846 нМ, табл. 2), что позволяет предположить, что L1dI может обладать такими же регуляторными свойствами, как бактериальный TthL1dI [9] и архейный MjaL1dI [20].

Регуляция синтеза белков L11-оперона и L1-оперона белком L1 и его доменом I. Для доказательства регуляторных свойств белка L1 и его домена I мы исследовали их дозозависимое влияние на уровень синтеза белков L11-оперона T. thermophilus, T. maritima и L1-оперона *Н. marismortui*. Подобные эксперименты проводились ранее для исследования ауторегуляции синтеза белков L1-оперона архейным рибосомным белком L1 M. vannielii [2], а также для определения регуляторных свойств TthL1/TthL1dI и MjaL1/MjaL1dI на мРНК *M. vannielii* [9, 20]. Бесклеточная система транскрипции-трансляции E. coli может быть использована как для экспрессии архейных, так и эукариотических белков [21].

Как упоминалось выше, мы показали наличие двух регуляторных участков в мРНК L11-оперона бактерий T. thermophilus и T. maritiта. Стоит отметить, что структурно-консервативный участок связывания белка L1 на РНК включает последовательность GGAG (рис. 2), которая может быть принята за SD-подобный мотив мРНК, будучи расположенной перед AUG-кодоном. Однако, согласно структурным данным, 3 из 4-х нуклеотидов этой последовательности находятся в спиральных участках [17] и недоступны для РНК-РНКовых взаимодействий. В результате такой участок мРНК взаимодействует с р-белком L1, но не связывается с анти-SD на рибосоме. Ранее было показано наличие такой «маскированной» SD-последовательности в мРНК белка L1 E. coli [22]. Для того чтобы в полной мере исследовать регуляторные свойства белка TthL1, мы получили конструкцию, содержащую ген белка TthL1 с добавленной последовательностью, содержащей SD, поскольку природный SD-подобный мотив входил в состав L1-связывающего участка. Известно, что положение предположительного L1-связывающего сайта в мРНК L11-оперона в различных родах бактерий не строго консервативно. В мРНК *Е. coli* имеется единственный L1-связывающий участок, а в геномах некоторых бактерий типа Firmicute обнаружены два потенциальных участка связывания белка L1 [5], также как в исследованных нами бактериях *T. thermophilus* и *T. maritima*. В отличие от данных литературы, наличие двух регуляторных участков L11-оперона в этих гипертермофильных бактериях подтверждено нами экспериментально. Несомненно, в термофильных организмах имеются механизмы, поддерживающие рост клеток при высоких температурах. Геномный анализ промоторов и рибосом-связывающих участков в *Т. maritima* показал [23], что они кодируют высококонсервативные жёсткие структуры, которые могут обеспечить плотные контакты, что очень важно в термодинамически неблагоприятных условиях (75-80 °C). Наличие двух L1-связывающих участков может являться примером усиленной регуляции синтеза белков L11-оперона у бактерий, живущих в гипертермофильных условиях.

В случае экстремального галофила *H. maris*mortui был обнаружен один регуляторный участок, взаимодействие с которым р-белка L1 может ингибировать синтез белков своего L1-оперона. Можно заметить, что в бесклеточной системе транскрипции-трансляции E. coli количество синтезированного белка L1 археи H. maris*mortui* было ниже, чем белка L11 (рис. 8). Ранее при анализе регуляции трансляции мРНК L1-оперона другой археи *M. vannielli* в такой же in vitro системе E. coli наблюдалась аналогичная ситуация [2], причём в *in vivo* системе *E. coli* соотношение синтеза белков, кодируемых генами этого архейного оперона, было другим. Такие отличия могут быть связаны с особенностями синтеза белков в системе in vitro.

В археях рода *Methanococcus* участок связывания белка L1 находится в начале его кодирующей части мРНК (первые 30 нуклеотидов после старт-кодона) [2]. Мы показали, что в *H. marismortui* регуляторный участок находится в 5'-НТО мРНК белка L1. При связывании белка HmaL1 ингибируется синтез белков L1, L11 и, предположительно, L12. Полученные нами данные подтверждают консервативность регуляторных свойств р-белка L1. При этом важно отметить, что ведущую роль в регуляторных свойствах белка в исследуемых организмах играет его домен I, что свидетельствует о структурной консервативности РНК-белковых взаимодействий. Более того, наличие двух регуляторных участков на мРНК L11-оперона гипертермофильных бактерий экспериментально подтверждено. Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Gourse, R. L., Thurlow, D. L., Gerbi, S. A., and Zimmermenn, R. A. (1981) Specific binding of a procaryotic ribosomal protein to an eukaryotic ribosomal RNA: implications for evolution and autoregulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2722-2726, doi: 10.1073/pnas.78.5. 2722.
- Hanner, M., Mayer, C., Köhrer, C., Golderer, G., Gröbner, P., and Piendl, W. (1994) Autogenous translational regulation of the ribosomal MvaL1 operon in the archaebacterium *Methanococcus vannielii*, *J. Bacteriol.*, **176**, 409-418, doi: 10.1128/jb.176.2.409-418.1994.
- Baughman, G., and Nomura, M. (1984) Translational regulation of the L11 ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: analysis of the mRNA target site using oligonucleotide-directed mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5389-5393, doi: 10.1073/pnas.81.17.5389.
- Mayer, C., Kohrer, C., Grobner, P., and Piendl, W. (1998) MvaL1 autoregulates the synthesis of the three ribosomal proteins encoded on the MvaL1 operon of the archaeon *Methanococcus vannielii* by inhibiting its own translation before or at the formation of the first peptide bond, *Mol. Microbiol.*, 27, 455-468, doi: 10.1046/j.1365-2958.1998. 00693.x.
- Fu, Y., Deiorio-Haggar, K., Anthony, J., and Meyer, M. M. (2013) Most RNAs regulating ribosomal protein biosynthesis in Escherichia coli are narrowly distributed to Gammaproteobacteria, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3491-3503, doi: 10.1093/nar/gkt055.
- Mikailina, A. O., Kostareva, O. S., Nikonova, E. Yu., Garber, M. B., and Tischenko, S. V. (2018) Identification of binding sites for ribosomal protein L1 on mRNA of *Thermus thermophilus* and *Thermotoga maritima*, *Mol. Biol.* (*Mosk.*), **52**, 98-105.
- Kraft, A., Lutz, C., Lingenhel, A., Gröbner, P., and Piendl, W. (1999) Control of ribosomal protein L1 synthesis in mesophilic and thermophilic archaea, *Genetics*, 152, 1363-1372.
- Tishchenko, S., Nikonova, E., Kljashtorny, V., Kostareva, O., Nevskaya, N., and Piendl, W. (2007) Domain I of ribosomal protein L1 is sufficient for specific RNA binding, *Nucleic Acids Res.*, 35, 7389-7395, doi: 10.1093/nar/gkm898.
- Korepanov, A. P., Kostareva, O. S., Bazhenova, M. V., Bubunenko, M. G., Garber, M. B., and Tishchenko, S. V. (2015) Studying the properties of domain I of the ribosomal protein L1: incorporation into ribosome and regulation of the L1 operon expression, *Protein J.*, 34, 103-110, doi: 10.1007/s10930-015-9602-5.
- Studier, F., Rosenberg, A., Dunn, J., and Dubendorff, J. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *J. Methods Enzymol.*, 185, 60-89.
- 11. Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., and Mierendorf, R. (2001) Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression, *inNovations*, **12**, 1-3.

- 12. Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- Gabdulkhakov, A., Tishchenko, S., Mikhaylina, A., Garber, M., Nevskaya, N., and Nikonov, S. (2017) Crystal structure of the 23S rRNA fragment specific to r-protein L1 and designed model of the ribosomal L1 stalk from *Haloarcula marismortui*, *Crystals*, 7, 37, doi: 10.3390/ cryst7020037.
- Katsamba, P. S., Park, S., and Laird-Offringa, I. A. (2002) Kinetic studies of RNA-protein interactions using surface plasmon resonance, *Methods*, 26, 95-104, doi: 10.1016/ S1046-2023(02)00012-9.
- Kostareva, O., Tishchenko, S., Nikonova, E., Kljashtorny, V., Nevskaya, N., et al. (2011) Disruption of shape complementarity in the ribosomal protein L1–RNA contact region does not hinder specific recognition of the RNA target site, J. Mol. Recognit., 24, 524-532, doi: 10.1002/jmr.1063.
- Tishchenko, S., Kostareva, O., Gabdulkhakov, A., Mikhaylina, A., Nikonova, E., et al. (2015) Protein–RNA affinity of ribosomal protein L1 mutants does not correlate with the number of intermolecular interactions, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **71**, 376-386, doi: 10.1107/ S1399004714026248.
- Nevskaya, N., Tishchenko, S., Volchkov, S., Kljastorny, V., Nikonova, E., et al. (2006) New insights into the interaction of ribosomal protein L1 with RNA, *J. Mol. Biol.*, 355, 747-759, doi: 10.1016/j.jmb.2005.10.084.
- Mikhaylina, A., Kostareva, O., Sarskikh, A. V., Feodorov, R. V., Pindl, V., et al. (2014) Study of the regulatory properties of archaeal ribosomal protein L4, *Biochemistry* (*Moscow*), **79**, 87-95.
- Tishchenko, S., Kljashtorny, V., Kostareva, O., Nevskaya, N., Nikulin, A., et al. (2008) Domain II of *Thermus thermophilus* ribosomal protein L1 hinders recognition of its Mrna, J. Mol. Biol., 383, 301-305, doi: 10.1016/j.jmb.2008.08.058.
- Mikhailina, A., Kostareva, O., Nikonova, E., and Tischenko, S. (2016) Analysis of the interaction of domain I of archaeal ribosomal protein L1 with specific RNA fragments, *Aktual. Vopr. Biol. Khim.*, 1, 239-243.
- Chen, F., Wang, J., Du, L., Zhang, X., Zhang, F., et al. (2019) Functional expression of olfactory receptors using cell-free expression system for biomimetic sensors towards odorant detection, *Biosens. Bioelectron.*, 130, 382-388.
- 22. Sor, F., Bolotin-Fukuhara, M., and Nomura, M. (1987) Mutational alterations of translational coupling in the L11 ribosomal protein operon of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **169**, 3495-507.
- Latif, H., Lerman, J. A., Portnoy, V. A., Tarasova, Y., Nagarajan, H., et al. (2013) The genome organization of *Thermotoga maritima* reflects its lifestyle, *PLoS Genet.*, 9, e1003485, doi: 10.1371/journal.pgen.1003485.

CHARACTERIZATION OF REGULATORY ELEMENTS OF L11 AND L1 OPERONS IN THERMOPHILIC BACTERIA AND ARCHAEA

A. O. Mikhaylina^{1*}, E. Y. Nikonova¹, O. S. Kostareva¹,
 W. Piendl², M. Erlacher³, and S. V. Tishchenko¹

¹ Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Russia; E mail: alisamikhaylina15@gmail.com

² Division of Medical Biochemistry, Biocenter, Medical University of Innsbruck, 6020 Innsbruck, Austria; E mail: wolfgang.piendl@i-med.ac.at

³ Division of Genomics and RNomics, Biocenter, Medical University of Innsbruck, 6020 Innsbruck, Austria; E mail: matthias.erlacher@i-med.ac.at

Ribosomal protein L1 is a conserved two-domain protein that is involved in formation of the L1 stalk of the large ribosomal subunit. When there are no free binding sites available on the ribosomal 23S RNA, the protein binds to the specific site on the mRNA of its own operon (L11 operon in bacteria and L1 operon in archaea) preventing translation. Here we show that the regulatory properties of the r-protein L1 and its domain I are conserved in the thermophilic bacteria *Thermus* and *Thermotoga* and in the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. At the same time the revealed features of the operon regulation in thermophilic bacteria suggest presence of two regulatory regions.

Keywords: regulation of expression, L11 operon, L1 operon, r-proteins, mRNA

УДК 577.12

КАНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ РОДОПСИНОВ МОЖЕТ БЫТЬ ВЫЯВЛЕНА ПРИ ИЗМЕРЕНИИ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОСТИ ФОТОТОКОВ НА ПЛОСКИХ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

© 2021 Т.И. Рокицкая^{1*}, Н. Маляр², К.В. Ковалев^{2,3}, А.А. Волков^{4,5}, В.И. Горделий^{2,3,4,5}, Ю.Н. Антоненко¹

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: rokitskaya@genebee.msu.ru

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

³ Университет Гренобль—Альпы, CEA, CNRS, Институт структурной биологии (IBS), 38044 Гренобль, Франция ⁴ Юлихский исследовательский центр, Институт биологической обработки информации. Структурная биохимия (IBI-7), 52425 Юлих, Германия

⁵ Юлихский исследовательский центр, Центр структурной биологии Юлиха (JuStruct), 52425 Юлих, Германия

Поступила в редакцию 04.12.2020 После доработки 22.01.2021 Принята к публикации 22.01.2021

Определение функциональных свойств ретиналь-содержащих белков зачастую включает исследования на модельных системах, например, измерения электрического тока через плоские бислойные липидные мембраны (БЛМ) с адсорбированными на одной поверхности мембраны протеолипосомами. Однако возможности этого метода до конца не изучены. На примере двух светочувствительных белков – бактериородопсина (bR) и канального родопсина 2 (ChR2) – мы показали, что потенциал-зависимости стационарных фототоков в присутствии протонофора имеют сильно отличающиеся характеристики. В случае протонной помпы bR регистрируемый через БЛМ фототок не меняет направление при изменении знака прикладываемых напряжений, а для светочувствительного белка канального типа ChR2 характерны увеличение фототока с ростом напряжения и смена знака тока при переходе через нулевые значения напряжения. В работе также показано, что для регистрации максимальных стационарных фототоков лучше всего подходит протонофор 4,5,6,7-тетрахлоро-2-трифлуорометил бензимидазол (ТТФБ). При использовании карбонилицианид-*m*-хлорофенилгидразона (ХКФ) измеряемые фототоки для bR значительно меньше по амплитуде, а для ChR2 – практически равны нулю. Это различие между ТТФБ и ХКФ, по-видимому, связано с тем, что ХКФ, в отличие от ТТФБ, которые используются в качестве поверхности адсорбции протеолипосом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ретиналь-содержащие белки, канальный родопсин, протонная помпа, протеолипосомы, бислойная липидная мембрана, протонофор.

DOI: 10.31857/S0320972521040035

введение

Бурный рост числа исследований микробных родопсинов, начавшийся с определения основных функциональных свойств бактериородопсина (bR) [1], привел к значительному развитию и возникновению новых методов изучения светочувствительных мембранных белков. Бактериородопсин, как в природных пурпурных мембранах, так и солюбилизированный в мицеллах детергента и встроенный в протеолипосомы (ПЛ) [2, 3], оказался чрезвычайно важным и удобным объектом исследования, что привело к его всестороннему изучению в модельных мембранных системах, в том числе при адсорбции протеолипосом на плоских бислойных ли-

* Адресат для корреспонденции.

Принятые сокращения: БЛМ — бислойная липидная мембрана; ТТФБ — 4,5,6,7-тетрахлоро-2-трифлуорометил бензимидазол; ФКФ — карбонилцианид *n*-трифторометокси-фенилгидразон; ХКФ — карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразон; bR — бактериородопсин; ChR2 — канальный родопсин 2; ПЛ — протеолипосомы; ФХ — фосфатидилхолин; E_p — эквивалентное напряжение помпы, R_m — эквивалентное сопротивление БЛМ, R_c — эквивалентное сопротивление области контактов с липосомами, R_{ch} — эквивалентное сопротивление канала, R_v — эквивалентное сопротивление липосомальной мембраны; R_p — эквивалентное сопротивление помпы.

пидных мембранах (БЛМ) [4, 5]. В настоящее время метод адсорбции протеолипосом на мембранных фильтрах, пропитанных липидом, применяется для измерения электрических потенциалов, генерируемых белком при обычном или лазерном освещении [6]. Также при адсорбции ПЛ или мембранных дисков со светочувствительными белками на БЛМ проводятся измерения переходных токов [7, 8] в ответ на включение и выключение освещения или стационарных фототоков через БЛМ в присутствии протонофоров или других переносчиков [9–11]. Способ измерения светочувствительного тока с помощью адсорбции ПЛ или фрагментов пурпурных мембран на поверхности БЛМ получил широкое применение благодаря тому, что он оказался наиболее чувствительным. В этом случае амплитуда стационарного тока в присутствии протонофоров и/или ионообменников была гораздо выше, чем при встраивании bR непосредственно в БЛМ путём добавления в мембран-формирующий раствор или путём формирования БЛМ из двух монослоев липида с фоточувствительным белком [8, 10].

Открытие родопсинов канального типа [12, 13], осуществляющих пассивный транспорт ионов при воздействии светом, привело к революции в нейробилогии и развитию оптогенети-[14]. Катионный канальный ки родопсин 2 (ChR2) из одноклеточной водоросли Chlamydomonas reinhardtii был первым микробным родопсином, использованным для деполяризации нейрональной мембраны [15]. Впоследствии набор оптогенетических инструментов расширился за счёт разнообразных модификаций ChR2 [16] и открытия других природных катионных и анионных канальных родопсинов [17, 18], в том числе катионного канального родопсина из гигантских вирусов [19]. Помимо канальных родопсинов, некоторые светочувствительные ионные помпы также эффективны в качестве оптогенетических инструментов: для светоиндуцированного торможения нейрональной активности путём гиперполяризации плазматической мембраны нейрона используются *Np*HR хлорная помпа ИЗ Natronomonas pharaonic [20], протонная помпа археродопсин 3 (Arch) из Halorubrum sodomense [21], натриевая помпа KR2 и её модификации [22-25], а для деполяризации мембраны можно применять обратную протонную помпу [26]. К сожалению, по причине низкой экспрессии в плазматической мембране эукариотических клеток бактериородопсин не нашел широкого применения в оптогенетике [20]. В последнее время активно проводятся эксперименты по рациональному дизайну оптогенетических инструментов на основе перечисленных родопсинов для получения белков с новыми свойствами, например, с необычными параметрами открывания/закрывания канала, селективности и проводимости. Кроме того, продолжается поиск генов родопсинов в геномах неизученных бактерий, грибов, вирусов и дальнейшая гетерологическая экспрессия наиболее интересных из кодируемых ими родопсинов с целью определения их функциональности, эффективности и возможностей дальнейшего применения [27–29].

В большинстве работ новые или мутантные белки экспрессируются в плазматической мембране эукариотических клеток, и их фотоэлектрическая активность изучается методом фиксации потенциала всей клетки [17, 26]. Однако многие белки, особенно прокариотического происхождения, слабо экспрессируются в плазматической мембране эукариот. Кроме этого, в опытах на клетках затруднительно значительно изменять ионный состав внеклеточной среды (такие параметры, как pH и ионная сила) изза необходимости поддерживать осмотическое давление и концентрации ионов в физиологических диапазонах значений, что может ограничивать изучение свойств белков. В этой связи измерения в модельных системах с ПЛ, в том числе сорбированными на поверхности БЛМ, могут более полно раскрыть функциональные свойства родопсинов. Впервые стационарные фототоки через БЛМ в присутствии протонофора для ChR2 были продемонстрированы в работе Feldbauer et al. [30]. В представленной работе мы сравнили зависимости светочувствительного тока через БЛМ с адсорбированными ПЛ от прикладываемого к БЛМ напряжения и его знака в присутствии протонофора для протонной помпы bR и канального родопсина 2. В случае канальной функции белка (на примере ChR2) величины фототоков меняют свой знак при напряжениях близких к нулю, в то же время фототоки протонной помпы bR всегда положительны. Такие различия очень похожи на результаты, получаемые при электрофизиологических измерениях на клетках [18, 31]. Также нам удалось выяснить, что не любой протонофор применим для изучения светочувствительных белков с канальными свойствами. В опубликованных ранее работах наибольшее применение нашёл протонофор 1799, однако он коммерчески недоступен. Мы показали, что из-за более эффективного увеличения проводимости липосомальной мембраны, чем плоской БЛМ, такой широко распространенный протонофор, как карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразон (ХКФ), не может применяться в данной модельной системе. Из нескольких протестированных

известных протонофоров 4,5,6,7-тетрахлоро-2трифлуорометил бензимидазол (ТТФБ) оказался самым подходящим кандидатом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали реагенты фирмы «Sigma-Aldrich», США (если не указано другое). 4,5,6,7-тетрахлоро-2-трифлуорометил бензимидазол был предоставлен Ягужинским Л.С. (НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ).

Плоская бислойная липидная мембрана формировалась из раствора в декане, который содержал 2% (w/v) дифитаноилфосфатидилхолина (дифитаноил- ΦX) и 0,04% (w/v) димиристоилэтил-ФХ («Avanti Polar Lipids», США), на отверстии в перегородке, разделяющей на два отсека тефлоновую ячейку, содержащую буферный раствор [32]. Диаметр отверстия составлял 0,8 мм. Состав буферного раствора варьировался и указан в подписях к рисункам. Все эксперименты проводили при комнатной температуре (23-25 °C). При измерении проводимос-БЛМ, индуцированной протонофорати ми ТТФБ и ХКФ, мембрана формировалась из 2%-ного раствора смеси фосфолипидов из соевых бобов (азолектин) в сквалене.

Электрический ток регистрировался в условиях фиксации потенциала. Разность потенциалов подавалась на хлорсеребряные электроды, помещенные через агаровые мосты в тефлоновую ячейку с двух сторон мембраны. Ток измерялся с помощью пэтч-клэмп-усилителя ОЕС-2 («ОПУС», Россия), оцифровывался с помощью NI-DAQmx («National Instruments», США) и анализировался с использованием компьютерной программы WinWCP Strathclyde Electrophysiology Software, написанной Дж. Демпстером (University of Strathclyde, Великобритания).

Для освещения БЛМ использовали галогеновую лампу Novaflex («World Precision Instruments», США), плотность мощности которой составляет 0,77 Вт/см². Лампа освещала ячейку с передней (*цис*) стороны, ПЛ добавляли к БЛМ с противоположной (*транс*) стороны. В некоторых экспериментах использовали синий светофильтр СЗС-9 с шириной пропускания 400–540 нм и коэффициентом поглощения 0,36 на длине волны 480 нм.

Протеолипосомы с родопсином (ChR2 или bR). В стеклянной колбе готовили 1%-ный (w/v) раствор азолектина из соевых бобов в хлороформе («Химмед», Россия). От хлороформа избавлялись с помощью роторного испарителя и ва-

куумного насоса. Полученную тонкую липидную пленку, образовавшуюся на стенках колбы ресуспендировали в растворе, содержащем 0,1 M NaCl («Applichem», Германия), 2% (w/v) холата натрия с конечной концентрацией азолектина — 1% (*w*/*v*). Суспензию липидов обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин при 4 °С, после чего быстро добавляли солюбилизированный родопсин до конечной концентрации 0,7 мг/мл и детергент-абсорбирующие частицы. Получившуюся смесь перемешивали на орбитальной мешалке 2 ч при минимальном освещении, а затем сменяли частицы (так проводили минимум 4 смены частиц). ChR2 был экспрессирован в Leishmania tarentolae, выделен и очищен, как описано в работе Volkov et al. [33]. bR был солюбилизирован из пурпурных мембран по ранее опубликованному протоколу [34].

Измерение транспорта протонов через мембрану липосом. Проницаемость бислойных фосфолипидных мембран для ионов водорода оценивали с помощью ранее предложенной и несколько модифицированной методике [35]. Для приготовления нагруженных пиранином липосом смесь липидов (5,3 мг пальмитоил-олеоил ФХ, 1,3 мг пальмитоил-олеоил фосфатидилглицерола и 3,3 мг холестерина) растворили в хлороформе, а затем высушили в струе азота в пробирке с круглым дном. После этого липиды были ресуспендированы в 1 мл буферного раствора (20 мМ Мес, 20 мМ Tris-HCl, 20 мМ Трицин, 100 мМ КСІ, рН 6,0), содержащего 0,5 мМ рН-чувствительного флуоресцентного красителя пиранин. Суспензию тщательно встряхивали, затем трижды замораживали/оттаивали. Моноламелярные липосомы получали экструзии через поликарбонатный путем фильтр с порами диаметром 0,1 мкм с помощью экструдера («Avanti Polar Lipids»). Наружный пиранин убирали хроматографией на колонке с гелем Sephadex G-50 («Sigma-Aldrich»), уравновешенной буферным раствором 20 мМ Мес, 20 мМ Tris-HCl, 20 мМ Трицин, 100 мМ КСl, рН 6,0. В ходе эксперимента липосомы разбавляли в этом буфере с рН 6,0, в начале эксперимента рН внутри и снаружи липосом был одинаков. Далее к липосомам добавляли требуемую концентрацию протонофора и инкубировали в течение 1 мин. Протонный транспорт инициировался одномоментным увеличением рН водного раствора до значения 8,0 при добавлении определенного количества раствора щелочи, КОН. Измерение скорости увеличения рН внутри липосом проводили в присутствии 1 мМ ксилен-пиридиниум бромида для тушения флуоресценции вытекающего пиранина. Внутрилипосомальный pH оценивали по измерению флуоресценции при длине волны 505 нм, длина волны возбуждения — 455 нм. Измерения проводили на спектрофлуориметре Панорама Флюорат-02 («Люмэкс», Россия). В конце каждого



Рис. 1. Измерение электрического тока через БЛМ с адсорбированными ПЛ с ChR2. a – Записи тока через БЛМ при напряжениях 0, +/–50 мВ через 1 ч после начала инкубации с протеолипосомами. Период освещения показан сплошной черной линией. δ – Записи тока через БЛМ с адсорбированными протеолипосомами в присутствии 0,1 мкМ ТТФБ при различных напряжениях. e – Зависимость максимального фототока ($\Delta I_{макс}$) от напряжения. Буферный раствор содержал 10 мМ Мес, 10 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 6,0

эксперимента добавляли ласалоцид А в концентрации 1 мкМ для полного выравнивания рН внутри и снаружи липосом. Для предотвращения образования разности потенциалов на липосомальной мембране эксперименты проводили в присутствии 10 нМ валиномицина. Для уменьшения спонтанного выравнивания рН температуру поддерживали на уровне 15 °C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Измерения светоиндуцированного тока через БЛМ с адсорбированными протеолипосомами со встроенным ChR2. Добавление 10–15 мкл ПЛ со встроенным ChR2 с одной стороны БЛМ (транс-сторона с высокоомным входом усилителя) приводило к постепенному увеличению переходного тока в ответ на включение освещения белым светом (рис. 1, а) или синим светом (с использованием фильтра СЗС-9, данные не приведены). Процесс инкубации липосом длился приблизительно 1 ч или более, пока амплитуда переходного тока не прекращала увеличиваться. Амплитуда переходного тока никогда не превышала 10-15 пА, время спада тока отличалось от эксперимента к эксперименту в диапазоне 40-130 мс. Регистрация тока при разных напряжениях обычно показывала небольшое увеличение стационарной темновой проводимости БЛМ после прилипания ПЛ, после включения освешения стационарная проводимость БЛМ не менялась (рис. 1, *a*).

Ранее было показано, что ПЛ со встроенным бактериородопсином при адсорбции налипают на поверхность бислойной липидной мембраны, но не сливаются с ней и остаются интактными на поверхности БЛМ [7, 8]. В наших экспериментах при адсорбции ПЛ, содержащих ChR2 или bR, практически отсутствует светоиндуцированный стационарный ток через БЛМ, а регистрируется только переходный ток в ответ на включение и выключение света. Это связано с тем, что БЛМ не проводит ионы, которые транспортирует bR, или которые проникают через ChR2 под действием приложенного напряжения. В начале освещения происходит увеличение поверхностного заряда на мембране благодаря переносу ионов через липидную мембрану липосом, в результате этого процесса наблюдается переходный ток через БЛМ, подобный ёмкостному ответу на прикладывание напряжения. В наших экспериментах, также как и у других авторов, не происходит слияния ПЛ с плоской мембраной, так как в течение длительного времени налипания липосом не наблюдается увеличение стационарной проводимости БЛМ в

процессе освещения при различных напряжениях, а регистрируется только переходный ток на включение освещения (рис. 1, *a*, кривые +/-50 мВ). Если бы происходило слияние ПЛ с БЛМ, мы бы наблюдали светоиндуцированное увеличение проводимости мембраны в случае ПЛ с ChR2.

Далее в эксперименте, представленном на рис. 1, а, с цис-стороны мембраны добавляли 0,1 мкМ протонофора ТТФБ, который значительно увеличивал проводимость БЛМ (до 10 нСм и более). Величина стационарного тока через БЛМ при разных напряжениях показана на рис. 1, δ до начала освещения (t = 0 c). При освещении БЛМ в присутствии ТТФБ ток через мембрану увеличивался (рис. 1, δ) на величину фототока $\Delta I(t)$. При прикладывании к липидной мембране напряжения разной величины и полярности включение света приводило к увеличению абсолютной величины стационарного тока (рис. 1, δ). Зависимость максимального изменения тока ($\Delta I_{\text{макс}}$), вызванного освещением, от приложенной разности потенциалов к электродам (V) является почти линейной и пересекает ось ординат при $V \approx -6$ мВ (рис. 1, *в*). Мы связываем отличие от линейной зависимости ΔI_{Makc} от V с тем, что проводимость БЛМ, опосредованная ТТФБ, нелинейно зависит от приложенного потенциала. В то же время вольт-амперная характеристика ChR2 в клеточной мембране тоже нелинейна и определяется свойствами самого белка [36], что может также сказываться на измерениях на БЛМ. Мы оценили относительное изменение тока α при освещении для противоположных значений напряжений:

$$\alpha = \frac{\left|\Delta I_{V}\right| + \left|\Delta I_{-V}\right|}{\left|I_{V}\right| + \left|I_{-V}\right|},$$

и величина α оказалась равна 12,5% для +/-25 мВ, 12,9% – для +/-50 мВ и 13,1% – для +/-75 мВ. Относительное изменение тока при освещении варьирует от эксперимента к эксперименту, но в каждом отдельном опыте α почти не зависит от прикладываемого напряжения.

Следует отметить, что в присутствии ТТФБ во всех опытах с ПЛ с ChR2 при V = 0 мВ при освещении регистрировался небольшой положительный стационарный ток (рис. 1, δ). Направление тока совпадает с таковым для бактериородопсина (результаты представлены ниже), что находится в согласии с представлением о слабой помповой активности ChR2 [30]. Появление стационарного тока через БЛМ с адсорбированными протеолипосомами с ChR2 в ответ на освещение синим светом было показано ранее в

присутствии протонофора 1799 при V = 0 мВ [30] в условиях, когда единственным проникающим через белок катионом является протон. В то же время внутримолекулярный перенос протона с шиффова основания на акцептор не был подтвержден у ChR2 из *C. reinhardtii* при освещении вспышкой лазера, хотя был обнаружен у нескольких родопсинов с канальными свойствами из других водорослей [37].

При освещении БЛМ синим светом качественно вид потенциал-зависимости светоиндуцированного тока от приложенного напряжения не изменился (рис. 2). В присутствии ТТФБ величины $\Delta I_{\text{макс}}$ были примерно на 40% меньше по сравнению с тем же экспериментом, но при освещении белым светом без синего фильтра. Также увеличилось время нарастания фототока до максимального стационарного значения при включении освещения (рис. 2, а). Увеличение рН водного раствора с двух сторон мембраны (с помощью небольшого оттитрованного количества КОН) привело к уменьшению проводимости мембраны и значительному уменьшению ΔI (рис. 2, $\delta - \epsilon$). Однако относительное изменение тока в ответ на освещение α изменилось незначительно: $(8,5 \pm 0,5)\%$ при pH 6,0, (7,1 ± 0,1)% при рН 7,0 и (6,7 ± 0,1)% при рН 8,1 (среднее \pm среднеквадратичное отклонение при разных приложенных потенциалах). Также с ростом рН наблюдалось существенное ускорение кинетики спада фототока при выключении освещения. Этот результат коррелирует с показанной ранее зависимостью времени спада фототока ионных каналов ChR2 от внутриклеточного рН после вспышки лазера, полученной методом пэтч-кламп-регистрации тока на ооцитах, экспрессирующих ChR2 [13].

Измерения светоиндуцированного тока через БЛМ с адсорбированными протеолипосомами со встроенным bR. Для сравнения потенциал-зависимости индуцированного тока канального родопсина с родопсином, который функционирует исключительно как протонная помпа, мы провели эксперименты с ПЛ со встроенной протонной помпой bR. Величина переходного тока после включения белого света (рис. 3, а) была на порядок больше, чем в случае с ChR2, направление тока совпадало с результатами, полученными другими авторами [7, 8]. После добавления протонофора ТТФБ с иис-стороны стационарная проводимость БЛМ значительно увеличилась, и появился стационарный светоиндуцированный ток протонной помпы (рис. 3, б). Направление тока указывает на движение протонов через БЛМ под действием света со стороны адсорбции ПЛ (транс-сторона) на противоположную сторону. Это говорит о закачивании



Рис. 2. Кинетики фототока через БЛМ с адсорбированными ПЛ с ChR2 в присутствии 0,1 мкМ ТТФБ при разных напряжения при освещении светом в присутствии синего фильтра при pH 6,0 (*a*), 7,0 (δ) и 8,1 (*в*). Период освещения показан сплошной черной линией. *е* – Зависимость величины максимального стационарного фототока (ΔI_{Marc}) от приложенного напряжения. Буферный раствор содержал 10 мМ Mec, 10 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 6,0

протонов внутрь ПЛ и проникновении их через область контакта липосом с БЛМ на *цис*-сторону благодаря работе протонофора ТТФБ. Защелачивание водных растворов симметрично с двух сторон мембраны до рН 7,0, а рН 7,8 приводило к уменьшению проводимости мембраны, опосредованной протонофором, и уменьшению ΔI . Светоиндуцированный ток был при всех значениях рН и приложенных к БЛМ напряжениях положительного знака (рис. 3, *в*).

Эквивалентная электрическая схема БЛМ с адсорбированными протеолипосомами со светочувствительным белком. Итак, добавление протонофора ТТФБ приводило к значительному увеличению протонной проводимости БЛМ и появлению стационарного фотоиндуцированного тока, который был постоянного знака при любых напряжениях для bR или менял направление согласно полярности напряжения для ChR2 (рис. 1–3). Чтобы понять, каким образом регистрируется ток в условиях фиксации напряжения на БЛМ, необходимо рассмотреть схему адсорбции везикул на поверхности мембраны (рис. 4, а) и соответствующую ей эквивалентную электрическую схему (рис. 4, б). Подобные модели для быстрых переходных процессов были тщательно изучены ранее [38–40], и было показано, что время уменьшения переходного тока в ответ на включение света соответствует RC времени мембраны и изменяется в диапазоне 100 мс. Для изучения светоиндуцированных стационарных токов в зависимости от внешнего напряжения мы использовали модель, предложенную в работе Vodyanoy et al. [41], в которой авторы пренебрегли ёмкостными переходными процессами. Мы незначительно модифицировали эквивалентную электрическую схему, чтобы модель описывала также возможные канальные свойства родопсинов, и ввели эквивалентное сопротивление канала (R_{ch})

(рис. 4, δ). Очевидно, что в случае проявления канальных свойств родопсина ток ионной утечки через мембрану ПЛ при освещении будет усиливаться. Поэтому сопротивление R_{ch} в электрической схеме расположено параллельно



Рис. 3. Измерение электрического тока через БЛМ с адсорбированными ПЛ с bR. a — Записи тока через БЛМ при напряжении 0 мВ через 1 ч после начала инкубации с протеолипосомами. Период освещения показан сплошной черной линией. δ — Кинетики фототока через БЛМ с адсорбированными ПЛ в присутствии 0,1 мкМ ТТФБ при разных напряжениях. Буферный раствор содержал 10 мМ Мес, 10 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 6,0. e — Зависимость величины максимального фототока от приложенного напряжения при разных pH



Рис. 4. *а* – Схематическое изображение плоской БЛМ с адсорбированными ПЛ в условиях фиксации напряжения и в присутствии протонофора. Область контакта ПЛ и БЛМ обозначена пунктиром. δ – Эквивалентная электрическая схема, где E_p – эквивалентное напряжение помпы, R_m – эквивалентное сопротивление БЛМ (за исключением области контактов с липосомами), R_c – эквивалентное сопротивление бласти контактов с липосомами, R_{ch} – эквивалентное сопротивление канала, R_v – эквивалентное сопротивление канала, R_v – эквивалентное сопротивление канала, R_p – эквивалентное сопротивление помпы. Емкости мембран в данном приближении не рассматриваются

с E_p , то есть с генератором тока. Анализ этой схемы дает соотношение между током и приложенным напряжением E_e в виде:

$$I = \frac{E_{e}}{R_{m}} + \frac{E_{e} \cdot R_{p} + (E_{p} + E_{e}) \cdot R_{v} \cdot R_{ch} / (R_{v} + R_{ch})}{R_{c} \cdot R_{p} + (R_{c} + R_{p}) \cdot R_{v} \cdot R_{ch} / (R_{v} + R_{ch})},$$
(1)

где E_p — эквивалентное напряжение помпы, R_m — эквивалентное сопротивление БЛМ (за исключением области контактов с липосомами), R_c — эквивалентное сопротивление области контактов с липосомами (рис. 4, *a*), R_v — эквивалентное сопротивление липосомальной мембраны и R_p — эквивалентное сопротивление помпы.

Нами были сделаны следующие предположения: сопротивление помпы и/или канала светочувствительных белков очень большое в отсутствие освещения (R_p , $R_{ch} >> R_m$, R_c , R_v) и существенно уменьшается при освещении (R_p , $R_{ch} \approx R_m$, R_c). Также очевидно, что в случае высокой ионной проводимости липидной мембраны липосом ($R_v \rightarrow 0$), опосредованное каналом родопсина светоиндуцированное изменение тока будет ничтожно мало, так как ток пойдёт по наименьшему из сопротивлений (рис. 4, δ). Поэтому важной задачей является недопущение уменьшения сопротивления липидной части липосом. При условии $R_v \rightarrow \infty$ уравнение (1) сводится к двум следующим уравнениям:

мембранный ток в темноте –

$$I_d = \frac{E_e}{R_m},$$
 (1a)

и мембранный ток при освещении -

$$I_{L} = \frac{E_{e}}{R_{m}} + \frac{E_{e}R_{p} + (E_{p} + E_{e})R_{ch}}{R_{c}R_{p} + (R_{c} + R_{p})R_{ch}}.$$
 (16)

Появление стационарного фототока при добавлении протонофора связано с тем, что ТТФБ значительно снижает сопротивление R_c для ионов водорода, что позволяет зарядам (ионам водорода), закачиваемым в липосомы протонной помпой, переходить на *цис*-сторону БЛМ. Изменение стационарного тока после включения освещения описывается формулой:

$$\Delta I = I_{L} - I_{d} = \frac{E_{e} \cdot (R_{p} + R_{ch}) + E_{p} \cdot R_{ch}}{R_{c} \cdot (R_{p} + R_{ch}) + R_{p} \cdot R_{ch}} =$$
$$= \frac{E_{e} + E_{p} \cdot R_{ch} / (R_{p} + R_{ch})}{R_{c} + R_{p} \cdot R_{ch} / (R_{p} + R_{ch})}.$$
(2)

Из уравнения (2) следует, что в частном случае, когда белок обладает только помповой активностью и $R_{ch} = \infty$, то $\Delta I = (E_e + E_p)/(R_c + R_p)$. Линейная аппроксимация зависимости ΔI от напряжения позволяет определить $E_p - (E_p = -E_e \text{ при } \Delta I = 0)$ и $(R_c + R_p) - (R_c + R_p = E_p/\Delta I \text{ при } E_e = 0)$.

Таким образом, в случае бактериородопсина из рис. 3, в можно определить, что Е_p составило 195, 182 и 143 мВ для рН 6,0, 7,0 и 7,8 соответственно. Ранее было показано, что при измерении напряжения на БЛМ с адсорбированными bR-содержащими ПЛ в условиях постоянного освещения напряжение на мембране, при котором фотоответ становился равен нулю, составило ~300 мВ [5]. В другой работе при встраивании пурпурных мембран в БЛМ и измерении фототока при разных напряжениях путём экстраполяции вольт-амперной характеристики фотоиндуцированного тока было обнаружено, что нулевой ток помпы наблюдается при 200 мВ (эксперимент проводился при рН 6,3) [8]. Из экспериментальных данных мы оценили сумму сопротивлений контакта с липосомами и помпой. $(R_c + R_p)$ увеличивается с 1,3 10⁹ Ω при pH 6,0 до 5,6 10⁹ Ω при pH 7,8, что коррелирует с почти 4× увеличением R_m (с 24 МΩ при рН 6,0 до 85 МΩ – при рН 7,8) и с хорошо известной рН-зависимостью работы ТТФБ на БЛМ с максимумом проводимости при значении pH ~5 [42, 43].

В другом частном случае, когда белок обладает только канальными способностями ($E_p = 0$ и $R_p = \infty$), уравнение (2) преобразуется в $\Delta I = E_e/(R_c + R_{ch})$. Линейная аппроксимация зависимости ΔI от напряжения позволяет определить ($R_c + R_{ch}$) по формуле ($R_c + R_{ch}$) = $E_e/\Delta I$.

Если белок обладает способностями и помпы, и канала, то $R_p >> R_{ch}$, и уравнение (2) примет вид:

$$\Delta I = \frac{E_e + E_p \cdot R_{ch} / R_p}{R_c + R_{ch}},$$

а при $\Delta I = 0$,

$$E_p = -E_e \cdot (1 + \frac{R_p}{R_{ch}}). \tag{3}$$

Так как мы не знаем соотношение R_p/R_{ch} , то сложно с достаточной точностью оценить величину E_n . Анализ вольт-амперных характеристик ChR2 показывает, что $-E_e$ при $\Delta I = 0$ составляет ~4 мВ при рН 6,0 (усреднение по четырём экспериментам) и увеличивается до 27 мВ при рН 8,1. ($R_c + R_{ch}$) для эксперимента, приведённого на рис. 2, увеличивалось с 0,43 10⁹ Ω при pH 6,0 до 6,8 10⁹ Ω – при pH 8,1, а сопротивление мембраны увеличилось с 34 МΩ до 370 МΩ. В среднем по нескольким экспериментам при освещении белым светом для ChR2 – $(R_c + R_{ch}) = 0.36 \pm 0.1$ GΩ при pH 6.0. И хотя не совсем корректно сравнивать липосомы с бактериородопсином и канальным родопсином ChR2 из-за некоторой разницы в концентрациях белка в ПЛ, оценка суммы сопротивления контакта и белка в случае ChR2 дает величину в 3,5 раза меньше, чем в случае bR (при одинаковом освешении белым светом и pH 6,0), что может быть связано со значительным светоиндуцированным падением сопротивления белка в случае ChR2.

Известно, что канал ChR2 пропускает протоны, а также одно- и двухвалентные катионы. Поэтому при уменьшении концентрации ионов Na⁺ и протонов в водном растворе проводимость канала ChR2 должна значительно уменьшиться. Тогда в этих условиях *R*_{ch} увеличится и, согласно уравнению (3), Е_р приблизится к значению $-E_e$ при $\Delta I = 0$. Мы измерили потенциалзависимость фототока липосом с ChR2 в условиях 20 мМ Tris-HCl, 20 мМ Hepes и pH 6,8, и $-E_{e}$ при $\Delta I = 0$ составило ~60 мВ (данные не приведены). Таким образом, варьируя ионный состав буферного раствора, можно усиливать либо помповую, либо канальную активность светочувствительного белка. Измерения в клеточных системах не всегда позволяют варьировать условия эксперимента в широком диапазо-

не. Следует сказать, что нам не удалось обнаружить зависимость относительной амплитуды фототока ChR2 или напряжения нулевого тока от концентрации ионов Na⁺ в омывающем растворе (в диапазоне 30–500 мМ) в присутствии протонофора ТТФБ и монензина. Это может быть объяснено тем, что селективность ChR2 по протону в ~ 10^6 раз выше селективности по натрию [13].

Изучение влияния различных протонофоров на проводимость БЛМ и возможности их использования при измерении фототоков. Мы также обнаружили, что амплитуда фототока сильно меняется при использовании различных протонофоров. Так в случае измерений в присутствии мкМ ХКФ с цис-стороны мембраны при рН 6,0 проводимость мембраны возрастает до 7 нСм, однако стационарный фототок для липосом с ChR2 не превышает 1-2 рА и практически не зависит от приложенного напряжения. При добавлении 4 мкМ ХКФ после экспериментов с ТТФБ и липосомами с канальным родопсином относительная величина тока а уменьшается в 2 и более раз, хотя R_m меняется при этом незначительно. При использовании протонофора ХКФ в случае липосом с бактериородопсином значения ΔI были примерно в 10 раз меньше, чем в случае ТТФБ. Ранее похожие результаты с бактериородопсином были получены с протонофором ФКФ (карбонилцианид *п*-трифторометокси-фенилгидразон) в работе Bamberg et al. [39]. В экспериментах с бактериородопсин-содержащими ПЛ фототок возрастал в 5 раз при добавлении 0,1 мкМ ФКФ. Однако при добавлении 5 мкМ протонофора $\Phi K \Phi \Delta I$ становилось равным нулю. Особенно сильное влияние было в случае низкой концентрации бактериородопсина в ПЛ. В то же время ТТФБ значительно увеличивал стационарный фототок в экспериментах с галородопсином. В дальнейших работах Bamberg et al. использовали протонофор 1799.

Поскольку при адсорбции ПЛ на поверхности БЛМ в модельной системе участвует два типа липидных мембран, мы предположили, что протонофоры могут по-разному встраиваться в положительно заряженную липидную мембрану (сформированную по методу Mueller et al. [32] с использованием декана в качестве растворителя) и мембрану липосом, образованную из липида азолектина и не содержащую растворителя. Для подтверждения этого предположения нами была измерена проводимость мембраны, сформированной из раствора 2%-ного дифитаноил-ФХ и 0,04%-ного димиристоилэтил-ФХ в декане, используемой для адсорбции ПЛ, и мембраны, сформированной из 2%-ного раст-

БИОХИМИЯ том 86 вып. 4 2021



Рис. 5. Значения проводимости БЛМ (нСм) в присутствии протонофоров ТТФБ и ХКФ на БЛМ, сформированных из раствора дифитаноил-ФХ и димиристоилэтил-ФХ в декане (*a*) или азолектина в сквалене (δ). Измерения проводили в условиях 5 мМ МЕС, 5 мМ Tris-HCl, 50 мМ KCl, pH 7,0. Приведены средние значения ± стандартная ошибка

вора азолектина в сквалене, при двух концентрациях ХКФ и ТТФБ (рис. 5). Считается, что при формировании БЛМ из липидного раствора в сквалене, также как в случае липосом, образуется мембрана, лишенная растворителя, так как сквален, в отличие от декана, не может располагаться между липидными монослоями и уходит на периферию БЛМ при её формировании [44]. Поэтому БЛМ из раствора в сквалене по толщине более близка к липосомальной липидной мембране, тогда как декановые мембраны имеют примерно вдвое большую толщину [45]. Оказалось, что в используемых концентрациях ХКФ значительно сильнее увеличивает проводимость сухой мембраны из раствора азолектина в сквалене, чем проводимость БЛМ из раствора дифитаноил-ФХ в декане. В то же время ТТФБ в концентрации 50 нМ сильнее увеличивает проводимость сухой мембраны, а при увеличении концентрации лучше работает в мемб-



Рис. 6. Измерение способности протонофоров переносить протоны через липосомальную мембрану в модельной системе липосом, нагруженных флуоресцентным зондом пиранином. Кинетики изменения pH внутри липосом при отсутствии разобщителей (серая кривая, контроль), в присутствии 5 мкМ ХКФ (серая кривая, *I*) или 12 мкМ ТТФБ (черная кривая, *2*)

ране, сформированной из раствора в декане. По-видимому, это связано с тем, что ТТФБ функционирует в димерной форме на мембранах с деканом [42, 43]. Похожие результаты были получены ранее в работе Bakker et al. [46]. Авторы показали, что концентрационные зависимости проводимости БЛМ с деканом в качестве растворителя в присутствии различных протонофоров не коррелируют с их протонофорным действием на липосомах, измерение которого проводилось по валиномицин-индуцированному набуханию мультиламеллярных липосом или по восстановлению феррицианида, нагруженного в липосомы: ТТФБ сильнее увеличивал проводимость БЛМ, а ФКФ оказывал более сильное разобщающее действие на мембране липосом [46].

Такие же выводы можно сделать из наших по сравнению протонофорного опытов действия ТТФБ и ХКФ на липосомах, нагруженных рН-чувствительным флуоресцентным красителем пиранином (рис. 6). Соединения добавляли к липосомам в начале эксперимента при pH 6,0, затем в момент времени t = 0 с, добавляя определенное количество оттитрованного раствора КОН, создавали градиент рН в две единицы на мембране липосом (рН снаружи увеличивался с 6,0 до 8,0). В контрольном эксперименте (серая кривая на рис. 5) рН внутри липосом практически не менялся, и только добавление ласалоцида А приводило к выравниванию внешнего и внутреннего рН на липосомальной мембране. Добавление протонофоров ХКФ и ТТФБ значительно ускоряло процесс выравнивания pH, приблизительно одинаковая скорость изменения pH внутри липосом наблюдалась при 5 мкм ХКФ и 12 мкМ ТТФБ (рис. 6). Однако для индуцирования приблизительно одинакового протонного тока на БЛМ, сформированной из раствора липида в декане, требовались концентрации ХКФ на порядок больше, чем ТТФБ (рис. 5). Значит, ХКФ в большей степени делает мембрану ПЛ проницаемой по протону, чем увеличивает проводимость БЛМ, на которой сорбируются липосомы. ТТФБ, напротив, сильнее увеличивает протонную проводимость плоской БЛМ, чем мембраны ПЛ.

Ранее при рассмотрении эквивалентной электрической схемы мы показали, что в случае высокой ионной проводимости липидной мембраны липосом ($R_v \rightarrow 0$) светоиндуцирован-



Рис. 7. Потенциал-зависимые измерения фототоков канального родопсина в присутствии усниновой кислоты. a — Кинетики фототока через БЛМ с адсорбированными ПЛ с ChR2 в присутствии 4,5 мкМ усниновой кислоты с *цис*-стороны при напряжении от -75 до +75 мВ (с шагом 25 мВ) при освещении белым светом. Буферный раствор содержал 10 мМ Мес, 10 мМ Tris-HCl, 0,2 мМ MgCl₂, 500 мМ NaCl, pH 5,7. δ — Зависимость величины стационарного фототока от приложенного напряжения
ное изменение сопротивления канала будет невозможно зарегистрировать, а стационарный ток при работе помпы будет очень мал, так как он в основном будет шунтироваться на липосомах. По-видимому, из-за быстрого проникновения через липидную мембрану добавление протонофора со стороны, противоположной добавлению ПЛ с бактериородопсином, не предотвращает увеличение протонной проводимости липосомальной мембраны. Дополнительные эксперименты с добавлением протонофора ТТФБ с *цис*- и *транс*-стороны показали, что величины фототока в случае ПЛ с бактериородопсином приблизительно одинаковы. Таким образом, из наших и литературных данных следует, что в экспериментах по изучению функций светочувствительных белков необходимо использовать протонофоры, которые сильнее увеличивают проводимость плоской БЛМ, на которой сорбируются липосомы, чем проводимость липосом: ТТФБ и, возможно, протонофор 1799 [47], который используется в лаборатории Ernst Bamberg.

Мы провели потенциал-зависимые измерения фототоков канального родопсина в присутствии усниновой кислоты [48], и также обнаружили почти симметричную по знаку напряжения потенциал-зависимость стационарного фототока (рис. 7). Однако в случае усниновой кислоты, кроме стационарного, наблюдался значительный спад фототока, который, по-видимому, связан с большим количеством заряженной формы протонофора и перераспределением ее в мембране липосом и БЛМ после включения света (рис. 7, a). Подобные кинетики спада тока были показаны в работе Bamberg et al. [39] на БЛМ с адсорбированными ПЛ с галородопсином в присутствии липофильного аниона тетрафенилбората, где благодаря работе хлорной помпы образовывался концентрационный градиент ионов Cl⁻, а вслед за этим градиент тетрафенилбората на липосомальной мембране. При использовании нами динитрофенола в качестве протонофора стационарные фототоки оказались небольшими. Потенциал-зависимость фототока регистрировалась при очень кислых значениях pH (~2,8), относительное изменение тока α было ~1%. При pH 5,0 и выше динитрофенол очень слабо увеличивал проводимость БЛМ.

Мы показали, что метод измерения фототоков при адсорбции липосом на поверхности БЛМ в присутствии протонофора и других переносчиков применим не только для изучения функционирования родопсинов помпового типа, но и родопсинов канального типа при регистрации потенциал-зависимости фототоков. Особое внимание должно быть уделено выбору используемого протонофора.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-04-00238), Российского Фонда Фундаментальных Исследований и Национального центра научных исследований в рамках научного проекта № 19-52-15017, а также при поддержке Государственного задания РФ (соглашение № 075-00337-20-03, проект FSMG-2020-0003).

Благодарности. Выражаем благодарность Christian Baeken за предоставление пурпурных мембран.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Oesterhelt, D., and Stoeckenius, W. (1973) Functions of a new photoreceptor membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2853-2857.
- Kayushin, L. P., and Skulachev, V. P. (1974) Bacteriorhodopsin as an electrogenic proton pump: reconstitution of bacteriorhodopsin proteoliposomes generating delta psi and delta pH, *FEBS Lett.*, **39**, 39-42.
- 3. Oesterhelt, D., and Schuhmann, L. (1974) Reconstitution of bacteriorhodopsin, *FEBS Lett.*, **44**, 262-265.
- Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., et al. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H⁺-ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, 249, 321-324.
- Drachev, L. A., Frolov, V. N., Kaulen, A. D., Liberman, E. A., Ostroumov, S. A., et al. (1976) Reconstitution of biological molecular generators of elec-

БИОХИМИЯ том 86 вып. 4 2021

tric current. Bacteriorhodopsin, J. Biol. Chem., 251, 7059-7065.

- Siletsky, S. A., Mamedov, M. D., Lukashev, E. P., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., et al. (2019) Elimination of proton donor strongly affects directionality and efficiency of proton transport in ESR, a light-driven proton pump from *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, 1860, 1-11.
- 7. Herrmann, T. R., and Rayfield, G. W. (1978) The electrical response to light of bacteriorhodopsin in planar membranes, *Biophys. J.*, **21**, 111-125.
- Bamberg, E., Dencher, N. A., Fahr, A., and Heyn, M. P. (1981) Transmembranous incorporation of photoelectrically active bacteriorhodopsin in planar lipid bilayers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7502-7506.
- 9. Bamberg, E., Apell, H. J., Dencher, N. A., Sperling, W., Stieve, H., and Lauger, P. (1979) Photocurrents generated

by bacteriorhodopsin on planar bilayer membranes, *Biophys. Struct. Mechanism*, **5**, 277-292.

- Bamberg, E., Butt, H. J., Eisenrauch, A., and Fendler, K. (1993) Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes, *Q Rev Biophys.*, 26, 1-25.
- Friedrich, T., Geibel, S., Kalmbach, R., Chizhov, I., Ataka, K., et al. (2002) Proteorhodopsin is a light-driven proton pump with variable vectoriality, *J. Mol. Biol.*, **321**, 821-838.
- Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A. M., et al. (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae, *Science*, **296**, 2395-2398.
- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., et al. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 13940-13945.
- 14. Deisseroth, K. (2015) Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience, *Nat. Neurosci.*, **18**, 1213-1225.
- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nat. Neurosci.*, 8, 1263-1268.
- McIsaac, R. S., Bedbrook, C. N., and Arnold, F. H. (2015) Recent advances in engineering microbial rhodopsins for optogenetics, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 33, 8-15.
- Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Li, H., and Spudich, J. L. (2017) Bacteriorhodopsin-like channelrhodopsins: alternative mechanism for control of cation conductance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E9512-E9519.
- Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Janz, R., Liu, X., and Spudich, J. L. (2015) Natural light-gated anion channels: a family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics, *Science*, 349, 647-650.
- genetics, *Science*, 349, 647-650.
 19. Zabelskii, D., Alekseev, A., Kovalev, K., Rankovic, V., Balandin, T., et al. (2020) Viral rhodopsins 1: a unique family of light-gated ion channels, *Nat. Commun.*, 11, 5707.
- Gradinaru, V., Zhang, F., Ramakrishnan, C., Mattis, J., Prakash, R., et al. (2010) Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics, *Cell*, **141**, 154-165.
- Chow, B. Y., Han, X., Dobry, A. S., Qian, X., Chuong, A. S., et al. (2020) High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps, *Nature*, 463, 98-102.
- Kovalev, K., Astashkin, R., Gushchin, I., Orekhov, P., Volkov, D., et al. (2020) Molecular mechanism of light-driven sodium pumping, *Nat. Commun.*, 11, 2137.
- Vogt, A., Silapetere, A., Grimm, C., Heiser, F., Moller, M. A., and Hegemann, P. (2019) Engineered passive potassium conductance in the KR2 sodium pump, *Biophys. J.*, **116**, 1941-1951.
- Kovalev, K., Polovinkin, V., Gushchin, I., Alekseev, A., Shevchenko, V., et al. (2019) Structure and mechanisms of sodium-pumping KR2 rhodopsin, *Sci. Adv.*, 5, eaav2671.
- Maliar, N., Kovalev, K., Baeken, C., Balandin, T., Astashkin, R., et al. (2020) Crystal structure of the N112A mutant of the light-driven sodium pump KR2, *Crystals*, 10, 496.
- Shevchenko, V., Mager, T., Kovalev, K., Polovinkin, V., Alekseev, A., Juettner, J., Chizhov, I., Bamann, C., Vavourakis, C., Ghai, R., Gushchin, I., et al. (2017) Inward H(+) pump xenorhodopsin: mechanism and alternative optogenetic approach, *Sci. Adv.*, 3, e1603187.
- 27. Gushchin, I., and Gordeliy, V. (2018) Microbial Rhodopsins, *Subcell Biochem.*, **87**, 19-56.
- Bratanov, D., Kovalev, K., Machtens, J. P., Astashkin, R., Chizhov, I., et al. (2019) Unique structure and function of viral rhodopsins, *Nat. Commun.*, 10, 4939.
- Maliar, N., Okhrimenko, I. S., Petrovskaya, L. E., Alekseev, A. A., Kovalev, K. V., et al. (2020) Novel pH-sensitive microbial rhodopsin from *Sphingomonas paucimobilis, Dokl. Biochem. Biophys.*, 495, 342-346.

- Feldbauer, K., Zimmermann, D., Pintschovius, V., Spitz, J., Bamann, C., and Bamberg, E. (2009) Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 12317-12322.
- Geibel, S., Friedrich, T., Ormos, P., Wood, P. G., Nagel, G., and Bamberg, E. (2001) The voltage-dependent proton pumping in bacteriorhodopsin is characterized by optoelectric behavior, *Biophys. J.*, 81, 2059-2068.
- Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T., and Wescott, W. C. (1963) Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution, *J. Phys. Chem.*, 67, 534-535.
- Volkov, O., Kovalev, K., Polovinkin, V., Borshchevskiy, V., Bamann, C., et al. (2017) Structural insights into ion conduction by channelrhodopsin 2, *Science*, 358, eaan8862.
- 34. Dencher, N. A., and Heyn, M. P. (1982) Preparation and properties of monomeric bacteriorhodopsin, *Methods Enzymol.*, **88**, 5-10.
- Chen, Y., Schindler, M., and Simon, S. M. (1999) A mechanism for tamoxifen-mediated inhibition of acidification, *J. Biol. Chem.*, 274, 18364-18373.
 Gradmann, D., Berndt, A., Schneider, F., and
- Gradmann, D., Berndt, A., Schneider, F., and Hegemann, P. (2011) Rectification of the channelrhodopsin early conductance, *Biophys. J.*, **101**, 1057-1068.
 Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Wang, J., Li, H.,
- 37. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Wang, J., Li, H., and Spudich, J. L. (2013) Intramolecular proton transfer in channelrhodopsins, *Biophys. J.*, **104**, 807-817.
- Rayfield, G. W. (1982) Kinetics of the light-driven proton movement in model membranes containing bacteriorhodopsin, *Biophys. J.*, 38, 79-84.
- Bamberg, E., Hegemann, P., and Oesterhelt, D. (1984) The chromoprotein of halorhodopsin is the light-driven electrogenic chloride pump in *Halobacterium halobium*, *Biochemistry*, 23, 6216-6221.
 Bamberg, E., Hegemann, P., and Oesterhelt, D. (1984)
- 40. Bamberg, E., Hegemann, P., and Oesterhelt, D. (1984) Reconstitution of the light-driven electrogenic ion-pump halorhodopsin in black lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **773**, 53-60.
- 41. Vodyanoy, I., Vodyanoy, V., and Lanyi, J. K. (1986) Current-voltage characteristics of planar lipid membranes with attached Halobacterium cell-envelope vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **858**, 92-98.
- 42. Liberman, E. A., and Topaly, V. P. (1968) Selective transport of ions through bimolecular phospholipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **163**, 125-136.
- 43. Borisova, M. P., Ermishkin, L. N., Liberman, E. A., Silberstein, A. Y., and Trofimov, E. M. (1974) Mechanism of conductivity of bimolecular lipid membranes in the presence of tetrachlorotrifluoromethylbenzimidazole, *J. Membr. Biol.*, **18**, 243-261.
- 44. White, S. H. (1978) Formation of "solvent-free" black lipid bilayer membranes from glyceryl monooleate dispersed in squalene, *Biophys. J.*, **23**, 337-347.
- 45. Benz, R., Frohlich, O., Lauger, P., and Montal, M. (1975) Electrical capacity of black lipid films and of lipid bilayers made from monolayers, *Biochim. Biophys. Acta*, **394**, 323-334.
- 46. Bakker, E. P., van den Heuvel, E. J., Wiechmann, A. H., and van Dam, K. (1973) A comparison between the effectiveness of uncouplers of oxidative phosphorylation in mitochondria and in different artificial membrane systems, *Biochim. Biophys. Acta*, **292**, 78-87.
- 47. Tittor, J., Schweiger, U., Oesterhelt, D., and Bamberg, E. (1994) Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T, and D85,96N, *Biophys. J.*, **67**, 1682-1690.
- 48. Antonenko, Y. N., Khailova, L. S., Rokitskaya, T. I., Nosikova, E. S., Nazarov, P. A., et al. (2019) Mechanism of action of an old antibiotic revisited: role of calcium ions in protonophoric activity of usnic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 310-316.

RHODOPSIN CHANNEL ACTIVITY CAN BE EVALUATED BY MEASURING THE PHOTOCURRENT VOLTAGE DEPENDENCE IN PLANAR BILAYER LIPID MEMBRANES

T. I. Rokitskaya^{1*}, N. Maliar², K. V. Kovalev^{2,3}, O. Volkov^{4,5}, V. I. Gordeliy^{2,3,4,5}, and Y. N. Antonenko¹

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: rokitskaya@genebee.msu.ru

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

³ Institut de Biologie Structurale (IBS), Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS, 38044 Grenoble, France

⁴ Institute of Biological Information Processing (IBI-7: Structural Biochemistry),

Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Juelich, Germany

⁵ JuStruct: Jülich Center for Structural Biology, Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Juelich, Germany

The studies of the functional properties of retinal-containing proteins often include experiments in model membrane systems, e.g., measurements of electric current through planar bilayer lipid membranes (BLMs) with proteoliposomes adsorbed on one of the membrane surfaces. However, the possibilities of this method have not been fully explored yet. We demonstrated that the voltage dependence of stationary photocurrents for two light-sensitive proteins, bacteriorhodopsin (bR) and channelrhodopsin 2 (ChR2), in the presence of protonophore had very different characteristics. In the case of the bR (proton pump), the photocurrent through the BLM did not change direction when the polarity of the applied voltage was switched. In the case of the photosensitive channel protein ChR2, the photocurrent increased with the increase in voltage and the current polarity changed with the change in the voltage polarity. The protonophore 4,5,6,7-tetrachloro-2-trifluoromethyl benzimidazole (TTFB) was more efficient in the maximizing stationary photocurrents. In the presence of carbonyl cyanide-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), the amplitude of the measured photocurrents for bR significantly decreased, while in the case of ChR2, the photocurrents virtually disappeared. The difference between the effects of TTFB and CCCP was apparently due to the fact that, in contrast to TTFB, CCCP transfers protons across the liposome membranes with a higher rate than through the decane-containing BLM used as a surface for the proteoliposome adsorption.

Keywords: retinal-containing proteins, channel rhodopsin, proton pump, proteoliposomes, bilayer lipid membrane, protonophore

УДК 576.385.5.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ микроРНК-219-1 И ЕЕ АССОЦИАЦИЯ С МУЛЬТИФОРМНОЙ ГЛИОБЛАСТОМОЙ

© 2021 А. Гасеми¹, А. Мохаммади², С. Фаллах^{2*}

¹ Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences (TUMS), 14176-13151 Tehran, Iran

² Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences (IUMS), 14496-14535 Tehran, Iran; e-mail: fallah.s@iums.ac.ir

> Поступила в редакцию 05.08.2020 После доработки 08.12.2020 Принята к публикации 29.12.2020

МикроРНК-219-1 (miR-219-1) известна как опухолевый супрессор, характерный для различных типов рака, однако до сих пор не изучен эпигенетический механизм, регулирующий экспрессию генов. Используя полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) и технологию бисульфитного секвенирования генома, были определены уровни метилирования промоторного участка гена miR-219-1 и уровни экспрессии генов miR-219-5p и miR-219-1-3p в ткани мультиформной глиобластомы (GBM) (n = 31) и близлежащих нормальных тканях (n = 31), а также в линии клеток GBM U87 соответственно. После обработки клеток U87 мультиформной глиобластомы препаратом 5-аза-2'-дезоксицитидина (5-ага-dC) в них были определены уровни метилирования промоторного участка гена miR-219-1, соответствующих целевых mRNA, и белков с помощью модификации генома бисульфитом, ПЦР-РВ и методики ELISA соответственно. Наши результаты показали, что уровни экспрессии генов miR-219-5р и miR-219-1-3р были значительно ниже у пациентов с GBM по сравнению с соседними нормальными тканями (p < 0,01). Промотор miR-219-1 имел высокий уровень метилирования в тканях GBM (*p* < 0,01). Также в тканях GBM наблюдалась отрицательная корреляция между экспрессией генов miRNA и уровнями метилирования (p < 0.01). Обработка клеток GBM U87 препаратом 5-аza-dC приводила к снижению уровня метилирования miR-219-1, целевых mRNA и белков циклина А2 и муцина 4 (MUC4) и повышению уровня экспрессии miR-219-5p и miR-219-1-3p (p < 0,01). Введение miR-219-5p и miR-219-1-3p приводило к подавлению экспрессии циклина A2 и MUC4, в результате чего наблюдалось снижение уровня пролиферации линии клеток GBM U87 ($p \le 0,01$). Эти результаты говорят о том, что метилирование DNA играет важную роль в регуляции гена miR-219-1, а гиперметилированная miR-219-1 может участвовать в патогенезе мультиформной глиобластомы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: miR-219-1, эпигенетика, GBM, мультиформная глиобластома. **DOI:** 10.31857/S0320972521040047

введение

Ежегодная заболеваемость раком центральной нервной системы (CNS) составляет примерно 3,5 случаев на 100 000 человек, что достигает 1,9% всех вновь диагностированных случаев рака и 2,3% смертей от рака во всем мире [1]. Глиомы являются самыми распространёнными и приводящими к летальному исходу нейроэпителиальными опухолями, и они составляют большинство злокачественных опухолей головного мозга человека [2]. По клинико-патологическим показателям глиомы были классифицированы Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) на разные стадии (I–IV) [3], а мультиформная глиобластома (GBM) является наиболее агрессивной формой (стадия IV) этих злокачественных опухолей головного мозга [2]. Средняя выживаемость пациента с впервые диагностированной GBM составляет 12–15 месяцев, а выживаемость в течение 5 лет – менее 3% [4]. Поэтому изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе возникновения и прогрессирования GBM, необходимо для улучшения традиционных терапевтических стратегий и облегчения разработки новых методов лечения этого агрессивного заболевания.

МикроRNA (miRNA) представляют собой небольшие некодирующие молекулы RNA (19–24 нуклеотидов), которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне как у растений, так и у животных [5].

Принятые сокращения: ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; 5-ага-dC – 5-аза-2'дезоксицитидин; GBM – мультиформная глиобластома; miRNA – микроРНК (microRNA); MUC4 – муцин 4; U87MG – линия клеток GBM U87.

^{*} Адресат для корреспонденции.

Они участвуют в регуляции различных биологических процессов, протекающих при нормальном развитии, включая клеточный цикл, пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и многие другие молекулярные пути [6]. Было показано, что при различных патологических процессах, таких как рак, происходит изменение уровня экспрессии генов различных miRNA [7]. Кроме генетических механизмов, важную роль в контроле экспрессии miRNA играет эпигенетика: метилирование DNA и ковалентная модификация гистоновых белков [8], а гиперметилирование СрG-островков miRNA, подавляющих развитие опухоли, вносит вклад в канцерогенез [8, 9].

В результате процессинга предшественника miR-219-1, который осуществляет фермент Dicer, образуются две зрелых miRNA: одна с 5'конца (miR-219-5p) и другая – с 3'-конца premiR-219-1 (miR-219-1-3p). В связи с тем, что эти два зрелых продукта процессинга обладают уникальными затравочными (seed) участками, каждая miRNA нацелена на разные mRNA (http://www.mirbase.org/). Недавнее исследование продемонстрировало, что miR-219-5p имеет низкий уровень экспрессии гена в глиоме и действует как опухолевый супрессор в клетках GBM [10].

Хотя исследование подтвердило, что Sal-подобный белок 4 является целевой mRNA miR-219-5р [10], циклин А2, идентифицированный как прямая мишень miR-219-5р при плоскоклеточной карциноме пищевода, также может оказывать онкогенное действие на глиому [11]. Также была показана роль в качестве опухолевого супрессора для miR-219-1-3p, нацеленной на ген, кодирующий муцин 4 (MUC4), при раке поджелудочной железы [12]. Однако несмотря на то что способность miR-219-1 подавлять опухолевый рост изучалась при различных типах рака, не было получено данных, касающихся эпигенетической модуляции miR-219-5p и miR-219-1-3р при мультиформной глиобластоме.

Хотя miR-219-1 является представителем miRNA, чья экспрессия при различных типах рака в значительной степени подавлена [10, 12], до сих пор в тканях GBM не определен уровень её экспрессии, эпигенетическая модификация и то, как этот регуляторный механизм может влиять на её функцию. С этой целью в настоящем исследовании изучалась связь между экспрессией гена miR-219-1 и уровнем гиперметилирования её промотора, а также было проанализировано, может ли эпигенетическая модификация этой miRNA привести к подавлению её мишеней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы опухолевой ткани. Исследовательские анализы были выполнены на 31 свежем образце опухоли GBM и прилегающих к ним гистологически нормальных тканях. В данном исследовании приняли участие 17 мужчин и 14 женщин в возрасте 25–79 лет (средний возраст – 59 лет). Подробные клинико-патологические характеристики образцов GBM представлены в таблице. Все образцы опухолевых тканей были получены в результате хирургической операции в отделении нейрохирургии госпиталя имама Резы (Тебриз, Иран) в соответствии с процедурой, одобренной Комитетом по исследованиям на людях.

Два патолога просмотрели все образцы. В исследовании использовались только первичные образцы тканей GBM. Ни один из пациентов до операции не подвергался переливанию крови, лучевой терапии или химиотерапии. Пациенты были исключены, если у них в анамнезе был диабет, фиброз печени, рассеянный склероз, шизофрения, а также некоторые виды рака (такие как гепатоцеллюлярная карцинома, папиллярная карцинома щитовидной железы, рак яичников, колоректальный рак и др.). Кроме того, окружающие опухоль нормальные ткани с какими-либо неопластическими опухолями и/или некротическими поражениями были исключены из исследования. После проведения операции все образцы мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °C до дальнейшего использования в настоящей работе. Для использования образцов опухолевой ткани от всех больных было получено письменное информированное согласие.

Линия клеток, культивирование клеток и их обработка препаратом 5-аza-dC. Линия раковых клеток человека GBM U87 (ATCC® HTB-14™) была приобретена в Институте Пастера (Иран), и её культивировали не более одного месяца после покупки. Клеточную линию культивировали в стерильных условиях при 37 °С в атмосфере 5% СО₂ в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM; «Life Technologies, Inc.», США), дополненной стрептомицином (100 мкг/мл), пенициллином (100 U/мл) («Life Technologies, Inc.»), 2 мМ глутамина («Life Technologies, Inc.») и 10%-ной фетальной бычьей сывороткой (FBS, «Life Technologies, Inc.»). Чтобы выявить корреляцию между уровнем гиперметилирования промотора miR-219-1 и уровнем экспрессии генов miR-219-5р и miR-219-1-3р, определяли уровни метилирования CpG-островка в промоторном участке гена miRNA и экспрессию исследуемых miRNA после инкубации клеток

GBM U87 (U87MG) в присутствии или при отсутствии 5-аза-2'-дезоксицитидина (5-аzа-dC), используя метод бисульфитного секвенирования генома и ПЦР в реальном времени (ПЦР-PB) соответственно. Вкратце, клетки GBM U87 рассевали в 6-луночные планшеты по 1×10^5 клеток на лунку и инкубировали в течение 24 ч. Затем добавляли свежую среду, содержащую 1 или 5 мкМ 5-aza-dC (чистота \geq 98%) («Sigma-Aldrich», США) и инкубировали в течение 72 ч. После завершения обработки агентом использованную среду сменяли на свежую, не содержащую 5-aza-dC, и клетки дополнительно культивировали в течение 48 ч. Исходные растворы 5aza-dC растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО; «Sigma-Aldrich»), и устанавливали базовую линию при имитации обработки клеток тем же объёмом ДМСО в трех повторах.

Определение уровня метилирования. Метилирование промотора CpG-островков miR-219-1 определяли методом бисульфитного геномного секвенирования на геномной DNA, обработанной бисульфитом натрия. Вкратце, DNA экстрагировали из клеток линии U87MG и замороженных тканей с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit («Qiagen», Германия). Для проведения бисульфитной конверсии DNA 1 мкг экстрагированной DNA обрабатывали бисульфитом натрия, согласно инструкциям производителя набора EpiTect® Fast Bisulfite Conversion Kit («Qiagen»), и затем подвергали полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием набора праймеров: прямой праймер (5'-GTGATTTTTGATTTTTGTTTTTT-3') и обратный праймер (5'-ТТСАССТАСАСТ-ТАТТССААСАААС-3'). Условия термоциклирования состояния бисульфита DNA были следующие: 95°С – 5 мин, 60°С – 10 мин; 95°С – 5 мин, 60°С – 10 мин. Образцы очищали на ко-EpiTect spin-column и элюировали лонке 15 мкл Buffer EB, прилагаемого в наборе. Чтобы определить картину метилирования в отдельной молекуле, для клонирования очищенных продуктов ПЦР в вектор pGEM-T Easy Vector мы использовали систему pGEM-T Easy Vector System II («Promega», США). С помощью скрининга «синий/белый» и анализатора DNA ABI 3730 XL («Applied Biosystem», CIIIA) секвенировали 8-10 клонов из каждого образца. Чтобы контролировать полное превращение DNA в результате действия бисульфита, цитозины (С), за которыми не следуют гуанины (цитозины, не входящие в состав CpG), были просмотрены в анализируемом участке после проведения секвенирования. Так как после обработки бисульфитом и проведения ПЦР такие цитозины (не входящие в CpG-островки) должны превратиться в тимин (T), присутствие C в этих положениях было индикатором неполного превращения бисульфита. Уровни метилирования каждого сайта CpG внутри ампликона DNA определяли количественно путём измерения отношения между значениями высоты пиков C и T, используя основное уравнение для определения процента метилирования: $(C/(C + T) \times 100)$.

Экстракция RNA и ПЦР в реальном времени. Препарат общей RNA, включающий различные miRNA, получали путём экстракции из всех тканей и клеток с помощью набора MirVanaTM miRNA Isolation Kit («Ambion», США) согласно инструкциям производителя. При изучении экспрессии miR-219-5р и miR-219-1-3р, для синтеза комплементарной DNA (cDNA) использовали набор qScript[™]microRNA cDNA Synthesis Kit («Quanta Bioscience», США). Для определения уровня экспрессии генов miR-219-5р и miR-219-1-3р использовали наборы PerfeCTa® microRNA Assays («Quanta Biosciences», CША) для определения miRNA, согласно инструкциям производителя для проведения ПЦР-РВ на амплификаторе Rotor-Gene 6000 («Qiagen»). Малая ядерная RNA U6 (U6 snRNA) использовалась в качестве эндогенного контроля для нормализации уровней экспрессии miR-219-5p и miR-219-1-3р при применении метода сравнительного Ct ($\Delta\Delta$ Ct). Значения относительного уровня экспрессии гена miRNA определяли с помощью метода $2^{-\Delta Ct}$.

Универсальный праймер, обычно входивший в набор, служил в качестве обратного праймера, а miRNA амплифицировали с помощью специфического прямого праймера. Наши специфические прямые праймеры для определения miR-219-5p и miR-219-1-3p были 5'-TGATTG-TCCAAACGCAATTCT-3' и 5'-AGAGTTGAG-TCTGGACGTCCCG-3' соответственно. Также прямым праймером U6 snRNA был 5'-ATTG-GAACGATACAGAGAAGATT-3', а обратным – 5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'. Каждую количественную ПРЦ-РВ проводили в двух повторах, и U6 snRNA использовали для нормализации уровня экспрессии miR-219-1.

Чтобы изучить уровни экспрессии генов, кодирующих белки MUC4 и циклин A2, 1 мкг общей RNA подвергали обратной транскрипции в комплементарную DNA. Затем раствор разводили в 10 раз. ПЦР-РВ осуществляли, используя специфические праймеры и метод SYBR Green detection technology, как было описано ранее [12, 13]. Значения относительного уровня экспрессии miR-219-1 определяли с помощью метода ΔΔCt.

Иммуноферментный анализ (ELISA). Определение содержания MUC4 и циклина A2 прово-

дили, используя наборы Human MUC4 ELISA Kit («My BioSource», CША) и Rat Cycline-A2 ELISA Kit («My BioSource») соответственно, в которых применялся количественный стандартный метод иммуноферментного анализа (метод ELISA).

Трансфекция клеток и определение уровня пролиферации. Обычно 10 нМ молекул-предшественников miR-219-5p и miR-219-1-3p, имитирующих miR-219-5р и miR-219-1-3р соответственно, и неспецифическую miRNA, служащую в качестве отрицательного контроля (NC), трансфицировали в клетки линии U87MG с использованием Lipofectamine TM RNAiMAX («Invitrogen», США). За день до трансфекции клетки помещали в среду, не содержащую антибиотики. Клетки U87MG, трансфицированные miR-219-5р и miR-219-1-3р, культивировали, а затем инкубировали с 20 мкл бромдезоксиуридина (BrdU) в течение 2 ч. Клетки фиксировали, и включённую метку BrdU регистрировали с помощью набора BrdU Cell Proliferation Kit («Abcam», США) согласно инструкции произволителя.

Статистическая обработка данных. Для сравнения усреднённых значений уровня метилирования и экспрессии гена miR-219-1 в тканях GBM и прилегающих нормальных тканях использовали *t*-критерий Стьюдента. Для сравнения средних значений уровня метилирования и экспрессии гена miR-219-1, MUC4 и циклина A2 в клетках до и после их обработки 5-аzadC использовали метод ANOVA. Коэффициент линейной корреляции Пирсона был использован для изучения взаимосвязи между метилированием промоторного участка miR-219-1 и экспрессии гена, кодирующего уровнем эту miRNA. Статистический анализ был проведён с использованием программы SPSS version 22.0, и значение p < 0.05 рассматривалось как статистически достоверное различие.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

МіR-219-1 и клинико-патологические характеристики пациентов с мультиформной глиобластомой. Взаимосвязь между экспрессией гена miR-219-1, уровнями метилирования и клинико-патологическими характеристиками была оценена у 31 пациента с GBM. Поскольку наша группа пациентов состояла из относительно небольшого количества образцов опухоли GBM (n = 31), для получения более точных результатов мы объединили miR-219-5p (n = 31) и miR-219-1-3p (n = 31) уровни экспрессии гена как miR-219-1 и изучили взаимосвязь между экспрессией гена miR-219-1 (n = 62), уровнем метилирования (n = 31) и клинико-патологическими характеристиками больных GBM. На основании среднего значения уровней экспрессии и метилирования miR-219-1 все пациенты с GBM были разделены на четыре группы: пациенты с низким (n = 37) и высоким (n = 25) уровнем экспрессии гена miR-219-1 и пациенты с низким (n = 13) и высоким уровнями метилирования miR-219-1 (*n* = 18). Как показано в таблице, в исследуемой группе пациентов не было выявлено статистически достоверных различий между экспрессией гена miR-219-1, уровнем метилирования и возрастом (<50 и ≥50), полом (мужской/женский), расположением опухоли (лобная доля, височная доля, теменная доля и затылочная доля). Однако проведённый нами статистический анализ показал, что пониженный уровень экспрессии гена и высокий уровень метилирования miR-219-1 в образцах пациентов ассоциированы с размером опухоли (<5 см против ≥5 см) и шкалой Карновского (KPS – Karnofsky Performance Scale; <80 против ≥80).

Уровни экспрессии miR-219-1 и её генов-мишеней в тканях GBM. С помощью метода ПЦР-PB мы определили уровни экспрессии miR-219-5p, miR-219-1-3p, циклина A2 и MUC4 у пациентов с GBM в опухолевой ткани и в близлежащих нормальных тканях. Для сопоставления экспрессии miRNA и их генов-мишеней в образцах опухолевой ткани и прилегающих нормальных тканей мы использовали сравнительный метод Ct. Нами было выявлено снижение уровня экспрессии генов miR-219-5p и miR-219-1-3p в 27 (87%) и 25 (80%) образцах тканей GBM по сравнению с прилегающими нормальными тканями соответственно.

Как показано на рис. 1, *а* и *b*, у пациентов в образцах GBM наблюдалось значительное снижение уровня экспрессии генов miR-219-5p и miR-219-1-3p по сравнению с прилегающими нормальными тканями (*t*-критерий Стьюдента, p < 0,01). Как показано на рис. 1, *с* и *d*, мы также обнаружили повышенную экспрессию генов, кодирующих циклин A2 (1,60 против 0,39; *t*-критерий Стьюдента, p < 0,01) и MUC4 (1,71 против 0,62; *t*-критерий Стьюдента, p < 0,01) в образцах GBM по сравнению с близлежащими нормальными тканями. Высокие уровни экспрессии циклина A2 и MUC4 в тканях GBM указывают на то, что эти онкогены могут принимать участие в канцерогенезе глиомы.

Статус метилирования промотора гена miR-219-1 в тканях GBM. Используя программу methprimer (www.urogene.org/methprimer/) и вставив 3000 нуклеотидов из вышележащей об-

ГАСЕМИ и др.

Характеристика	Уровень экспрессии гена miR-219-1 (<i>n</i> = 62*)		2	Уровень экспрессии гена miR-219-1 (<i>n</i> = 31)		2			
	Низкий (n = 37) n (%)	Высокий (n = 25) n (%)	Значение р	Низкий (n = 13) n (%)	Высокий (n = 18) n (%)	значение р			
Возраст (годы)									
<50	16 (43)	12 (48)	0,61	6 (46)	8 (44)	0,61			
≥50	21 (57)	13 (52)		7 (54)	10 (56)				
Пол									
Мужской	21 (57)	13 (52)	0,53	7 (54)	10 (55)	0,69			
Женский	16 (43)	12 (48)		6 (46)	8 (45)				
Расположение опухоли									
Лобная доля	9 (24)	5 (20)	0,42	3 (23)	4 (22)	0,71			
Височная доля	10 (27)	6 (24)		3 (23)	5 (28)				
Теменная доля	10 (27)	8 (32)		4 (31)	5 (28)				
Затылочная доля	8 (22)	6 (24)		3 (23)	4 (22)				
Размер опухоли									
<5 см	11 (30)	17 (68)	0,016	9 (69)	5 (28)	0,023			
≥5 см	26 (70)	8 (32)		4 (31)	13 (72)				
KPS									
<80	23 (62)	9 (36)	0,021	4 (31)	12 (67)	0,017			
≥80	14 (38)	16 (64)		9 (69)	6 (23)				

Корреляция уровня экспрессии и метилирования гена miR-219-1 с клинико-патологическими показателями больных с мультиформной глиобластомой

* Общее число определений уровня экспрессии генов miR-219-5р и miR-219-1-3р; GBM — мультиформная глиобластома; KPS — шкала Карновского для оценки общего состояния онкобольного.

ласти miR-219-1, мы обнаружили CpG-островок в промоторном участке miR-219-1 (от -2802 до -2952), на котором локализуются 22 CpG-повтора (рис. 2, *a*). Анализ относительного уровня метилирования с использованием субклонирования продуктов ПЦР и метода бисульфитного секвенирования выявил повышение уровня метилирования гена miR-219-1 у пациентов с GBM (70,7%) по сравнению с прилегающими нормальными тканями (16,4%; *t*-критерий Стьюдента, *p* < 0,01; рис. 2, *b* и *c*).

Чтобы определить, является ли подавление miR-219-1 в GBM результатом гиперметилирования его промотора, мы дополнительно провели анализ корреляции между метилированием промотора miR-219-1 и уровнями экспрессии генов miR-219-5р и miR-219-1-3р в образце пациента GBM. Как показано на рис. 2, *d*, корреляционный анализ Пирсона показал, что уровни экспрессии генов miR-219-5p (R = -0.82, p < 0.01) и miR-219-1-3p (R = -0.75, p < 0.01) отрицательно коррелировали с гиперметилированием промотора miR-219-1. Эти данные предполагают, что гиперметилирование промоторного участка гена miR-219-1 в тканях GBM может привести к снижению уровня экспрессии гена.

Влияние 5-аzа-dC на уровни метилирования и экспрессии генов miR-219-1. Чтобы оценить влияние 5-аzа-dC на уровень метилирования промотора гена miR-219-1, был определен средний уровень метилирования промотора miRNA до и после обработки (в течение 72 ч) клеточной линии U87MG с помощью 1 или 5 мкМ препарата 5-аzа-dC. Перед началом эксперимента метод секвенирования геномных бисульфитов показал

в промоторном участке гена mir-219-1 средний уровень метилирования — 64,5%. Однако обработка клеток (в течение 72 ч) препаратом 5-агаdC в концентрации 1 или 5 мкМ снизила уровень метилирования miR-219-1 на 26% и 51% соответственно. Эти результаты показали, что 5ага-dC способен снижать средний уровень метилирования miR-219-1 в промоторном участке (рис. 3, a). Кроме того, чтобы изучить влияние 5-ага-dC на уровень экспрессии гена miR-219-1, используя ПЦР-РВ, мы определили уровни экспрессии miR-219-5p и miR-219-1-3p до и после обработки клеток препаратом 5-аza-dC в концентрации 1 или 5 мкМ. Как показано на рис. 3, *b*, в результате деметилирования DNA с помощью 1 или 5 мкМ 5-аza-dC происходит повышение уровня экспрессии miR-219-5p в клетках U87MG в 1,9 и 4,1 раза соответственно. Также обработка клеток 1 или 5 мкМ 5-аza-dC вызывала повышение уровня экспрессии генов miR-219-1-3p в 1,8 и 3,2 раза соответственно (рис. 3, *c*).



Рис. 1. Уровни экспрессии генов miR-219-5p, miR-219-1-3p, циклина A2 и MUC4 в образцах GBM. Для определения с помощью метода $2^{-\Delta CT}$ уровня экспрессии miRNA и генов-мишеней в образцах GBM и прилегающих нормальных тканей использовали метод ПЦР-PB. MiR-219-5p (*a*) и miR-219-1-3p (*b*) имели низкие уровни экспрессии генов у пациентов с GBM (*n* = 31) по сравнению с соседней нормальной тканью без GBM (*n* = 31). Экспрессию miRNA в отдельных образцах опухолевой ткани выражали относительно U6 snRNA (* *p* < 0,01). Также наблюдалось значительное увеличение уровней экспрессии генов циклина A2 (*c*) и MUC4 (*d*) у пациентов с GBM в сравнении с нормальными прилегающими тканями. Результаты были нормализованы относительно уровня mRNA β-актина (ACTB). Все данные по экспрессии генов, касающиеся индивидуальных образцов тканей человека, представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение; *p* < 0,01 для всех образцов опухолей GBM в сравнении с образцами без GBM



Рис. 2. Метилирование участков DNA, расположенных выше гена miR-219-1, и его связь с уровнем экспрессии гена. *a* – Картирование CpG-островков, показывающее их количество и расположение относительно промотора miR-219-1. Для проведения анализа метилирования был использован CpG-островок, включающий 151 п.н. (от -2802 до -2952 п.н., расположенных ниже кодона инициации pre-miR-219-1, охватывающий 22 сайта CpG). *b* – Схема распределения CpGостровков в промоторном участке miR-219-1 в случайно выбранном образце ткани GBM, соответствующей прилегающей нормальной ткани и клетках линии U87MG. Для каждого образца секвенировали по 8 отдельных клонов. Каждая строка представляет уровень метилирования отдельных CpG (в диапазоне от 0 до 1) в отдельном клоне, за исключением последней строки, которая представляет положение каждого CpG на хромосоме 6. Для упрощения первые четыре цифры каждой позиции CpG (3320) были удалены из сайтов CpG. Поэтому положение 4867 для CpG точно представляет 33204867-й нуклеотид на хромосоме 6

a



Рис. 2. Метилирование участков DNA, расположенных выше гена miR-219-1, и его связь с уровнем экспрессии гена. c - Kак можно видеть, есть значительные различия между уровнем метилирования промоторного участка гена miR-219-1 в тканях GBM и близлежащих нормальных тканях пациентов (* p < 0,01). Полученные данные были представлены в виде процента метилированных цитозинов CpG-островка (C/(C + T) × 100). d – Корреляция между уровнем метилирования промотора гена miR-219-1 и экспрессией генов miR-219-5p в образцах тканей GBM и между уровнем метилирования промотора гена miR-219-1 и экспрессией генов miR-219-1-3p в образцах тканей GBM. Как показано, уровень метилирования miR-219-1 в значительной степени отрицательно коррелировал с уровнями экспрессии генов miR-219-5p (R = -0,82) и miR-219-1-3p (R = -0,75) (p < 0,01)



Рис. 3. Влияние 5-аzа-dC на уровни метилирования и экспрессии гена miR-219-1. Клетки линии U87MG были обработаны 5-аzа-dC в концентрации 1 или 5 мкМ в течение 72 ч. Как видно (*a*), различные концентрации 5-аzа-dC через 72 ч понижали уровень метилирования промотора miR-219-1. Противоположные результаты были получены при изучении зависимости от дозы и времени обработки в случае уровня экспрессии miR-219-5p и miR-219-1-3p, когда гипометилирование под воздействием 5-аzа-dC индуцировало экспрессию генов (*b* и *c*). Столбики ошибок представляют стандартные отклонения трех повторностей ПЦР из одного экспериментального набора, а *p* представляет собой статистическую разницу между группами клеток (* *p* < 0,05, ** *p* < 0,01); аza – 5-аza-dC

Влияние 5-аzа-dC на экспрессию генов циклина A2 и MUC4 и уровни этих белков. Чтобы изучить влияние 5-аzа-dC на уровни экспрессии генов циклина A2 и MUC4 и уровни самих белков, клетки U87MG обрабатывали 1 или 5 мкМ 5аzа-dC в течение 72 ч, далее использовали методы ПЦР-РВ и ELISA соответственно. Наши результаты показали, что после обработки клеток 1 или 5 мкМ 5-аzа-dC происходило снижение уровня экспрессии гена циклина A2 (в 0,29 и 0,72 раза соответственно; рис. 4, *а*). Кроме того, деметилирование DNA с помощью 1 или 5 мкМ 5-аzа-dC приводило к снижению уровня экспрессии гена MUC4 в клетках U87MG (в 0,11 и 0,81 раза соответственно; рис. 4, *b*). Однако, как показано на рис. 4, *c* и *d*, обработка клеток 1 мкМ 5-аza-dC не приводила к снижению уровня циклина A2 и MUC4, а восстановление уровня этих белков происходило только в случае обработки клеток 5 мкМ 5-аza-dC. С помощью метода ELISA был определен уровень циклина A2 в необработанных клетках U87MG, он составлял 310,8 пкг/мл. Обработка клеток препаратом 5-аza-dC в концентрации 1 или 5 мкМ вызывала снижение уровня циклина A2 на 12,1 пкг/мл (p > 0,05) и 112,7 пкг/мл (p < 0,01) соответственно. Концентрация белка MUC4 в необработанных клетках U87MG составляла

12 нг/мл, и наблюдалось снижение его содержания на 1,2 нг/мл (p > 0,05) и 6,3 нг/мл (p < 0,01) после обработки клеток 1 или 5 мкМ 5-аzа-dC соответственно (рис. 4, d).

Подавляющее влияние эктопической экспрессии miR-219-1 на гены-мишени и скорость пролиферации клеток. Поскольку в нашей работе получены доказательства того, что в клетках U87MG понижены уровни экспрессии генов miR-219-5p и miR-219-1-3p, а их промоторный участок гиперметилирован, мы исследовали, может ли восстановление экспрессии miR-219-5p и miR-219-1-3p, опосредованное временной трансфекцией клеток двуцепочечной RNA (dsRNA), имитирующей miR-219-5p и miR-2191-3р, в клетки U87MG, привести к подавлению клеточной пролиферации. Полученные нами результаты подтверждают, что трансфекция клеток dsRNA, имитирующей miR-219-5p и miR-219-1-3p, приводит к повышению уровня экспрессии генов кандидатных miRNA в 4 и 5 раз соответственно, и восстановление уровня этих miRNA вызывает значительное снижение уровня пролиферации клеток U87MG (рис. 5, *a* и *b*; p < 0,01). Эти данные позволяют предположить, что miR-219-15p и miR-219-1-3p могут обладать антипролиферативным влиянием в клетках U87MG. Чтобы подтвердить роль циклина A2 и MUC4 в качестве мишеней действия miR-219-5p и miR-219-1-3p, мы провели ПЦР-PB на



Рис. 4. Влияние 5-аzа-dC на экспрессию генов, кодирующих циклин A2 и MUC4, и на уровни самих белков. Клетки глиобластомы линии U87MG были обработаны 1 или 5 мкМ 5-аzа-dC в течение 72 ч. Уровни экспрессии генов циклина A2 (*a*) и MUC4 (*b*) снижались после обработки клеток 1 или 5 мкМ 5-аzа-dC, но при этом не было выявлено статистически достоверных различий между уровнями белков циклин A2 (*c*) и MUC4 (*d*) после обработки клеток 1 мкМ 5-аzа-dC в течение 72 ч. Понижение уровня циклина A2 (*c*) и MUC4 (*d*) наблюдалось только после обработки клеток 5 мкМ 5-аzа-dC в течение 72 ч (* p < 0.05, ** p < 0.01); aza – 5-aza-dC



Рис. 5. Подавление опухолевых клеток U87MG с помощью miR-219-1. В клетки трансфицировали 10 нМ молекулы-предшественника pre-miR miRNA, имитирующей miR-219-5p, miR-219-1-3p или контрольную неспецифическую dsRNA (premiR NC #1) с использованием pearentra Lipofectamine TM RNAiMAX. Количество жизнеспособных клеток через 24–96 ч после трансфекции оценивали с помощью анализа пролиферации клеток, используя бромдезоксиуридин (Brdu). Точки – средние значения трех измерений в этих экспериментах; * p < 0,05 по сравнению с клетками, трансфицированными premiR NC # 1, в статистическом анализе с помощью *U*-критерия Манна–Уитни (*a*). Трансфекция 10 нМ miR-219-5p и miR-219-1-3p через 48 ч вызывала снижение уровня транскриптов циклина A2 и MUC4 на 43% и 51% соответственно в клетках U87MG по сравнению с клетками, трансфицированными 10 нМ контрольного олигонуклеотида (*b*). Уровни экспрессии генов циклина A2 и MUC4 определяли с помощью ПЦР-РВ с использованием β -актина в качестве контроля. Данные представлены в виде среднего значения ± SD независимых экспериментов (* p < 0,05, ** p < 0,01)

клетках U87MG, трансфицированных молекулами, имитирующими miR-219-5p и miR-219-1-3p. Наши результаты показали, что трансфекция клеток miR-219-5p и miR-219-1-3p через 48 ч приводит к снижению уровня mRNA циклина A2 и MUC4 (рис. 5, c; p < 0,01) по сравнению с клетками, трансфицированными miRNA, служащей в качестве отрицательного контроля.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последние годы были проведены несколько исследований с целью определения профиля экспрессии miRNA при GBM [14, 15]. В этих работах было продемонстрировано, что в тканях GBM картина экспрессии генов miRNA отличается от таковой в нормальных тканях. Было высказано предположение, что нарушение регуляции экспрессии miRNA может быть связано с патогенезом GBM. В настоящей работе нами была выявлена пониженная экспрессия miR-219-5р и miR-219-1-3р в GBM по сравнению с прилегающими нормальными тканями. Результат низкого уровня экспрессии гена miR-219-5p согласуется с предыдущими исследованиями [16]. Но хотя было показано снижение уровня экспрессии гена miR-219-1-3р при раке поджелудочной железы [12], не было данных об уровне экспрессии гена miR-219-1-3р в тканях GBM.

Мы также обнаружили, что низкий уровень экспрессии генов miR-219-5р и miR-219-1-3р ассоциирован с размером опухоли пациентов с GBM и индексом KPS (шкала Карновского). Ранее была определена связь между низким уровнем экспрессии гена miR-219-1 (miR-219-5р) и клинико-патологическими характеристиками пациента, такими как продвинутая стадия по классификации ВОЗ и индекс КРЅ [10]. Поскольку в нашу группу пациентов входили люди с наиболее агрессивными стадиями глиомы (стадия IV или GBM) не относящимися к глиомам, классифицированным ВОЗ (I, II, III и IV), мы не могли использовать классификацию ВОЗ в качестве переменной величины в нашей работе по изучению экспрессии генов. КРЅ является простым методом определения функционального статуса. Он может быть использован для оценки эффективности лечения рака, качества жизни пациентов и прогноза. Величина индекса Карновского (KPS) варьирует от 100 до 0, где 100 означает «отсутствие признаков заболевания» и 0 — «смерть». В связи с обнаружением ассоциации между уровнем экспрессии генов miR-219-5р и miR-219-1-3р и индексом KPS можно предположить, что снижение уровня экспрессии генов наших кандидатных miRNA имеет отношение к прогнозу исхода заболевания пациента.

Мы обнаружили гиперметилирование CpGостровков в промоторном участке miR-219-1 в тканях GBM по сравнению с нормальными близлежащими тканями, что может объяснять, по крайней мере частично, эпигенетическое молчание miR-219-1 в тканях GBM. Появляется все больше данных о том, что гиперметилирование промоторного участка DNA может участвовать в подавлении генов-супрессоров опухолей в отдельных раковых клетках [17]. Интересно, что в некоторых исследованиях было показано, что экспрессия многих miRNA, выступающих в раковых клетках в качестве опухолевых супрессоров, снижается при гиперметилировании их промоторов [18-20]. Вероятно, опосредованное метилированием DNA подавление miRNA-cynрессоров опухолей может вносить свой вклад в качестве нового механизма на разных стадиях рака. Отклоняющееся от нормы метилирование DNA miR-219-1 связывалось со случаями, не относящимся к раку, в том числе при хронической боли, связанной с воспалением, и длительными рабочими сменами в ночное время [21, 22]. Однако до сих пор не было исследований метилирования DNA в случае miR-219-1 (miR-219-5р и miR-219-1-3р) при GBM. Поэтому в настоящее время наша работа является единственным исследованием, направленным на изучение статуметилирования miR-219-1 у пациентов ca с GBM. Причина, по которой мы выбрали miR-219-1 в качестве гена-кандидата для изучения эпигенетической модификации, заключается в том, что анализ промоторов с помощью программы methprimer (www.urogene.org/methprimer/) выявил большой CpG-островок внутри её промоторного участка. Поэтому было предположено, что гиперметилирование промоторного участка этой miRNA может иметь отношение к снижению уровня её экспрессии. Поскольку регуляция экспрессии miRNA с помощью метилирования молекулы DNA носит сложный характер, необходимы дальнейшие исследования паттернов метилирования miRNA при GBM.

В нашем исследовании показано, что обработка клеток мультиформной глиобластомы линии U87MG препаратом 5-аza-dC привела к повышению уровня экспрессии miR-219-5p и miR-219-1-3p и снижению уровня экспрессии генов, кодирующих циклин A2 и MUC4 соответственно. Была предсказана тесная связь между нарушением экспрессии циклина A2, нестабильностью хромосом и пролиферацией опухолевых клеток, а повышенная экспрессия гена

циклина А2 была обнаружена при различных типах рака [23]. Также было показано, что повышенная экспрессия мембраносвязанного гликопротеина MUC4 может привести к прогрессированию рака эпителия, агрессивному поведению опухоли, снижению эффективности методов лечения и плохому исходу [24]. Поскольку нарушение процесса метилирования DNA может привести к снижению экспрессии miRNA, вполне разумно, что деметилирующий агент, 5aza-dC, имеет отношение к восстановлению уровня miR-219-1, что может, в свою очередь, привести к снижению уровня мишеней для действия miRNA (циклина A2 и MUC4, которые являются мишенями miR-219-5р и miR-219-1-3р соответственно). 5-аza-dC, аналог нуклеозида, включается в DNA быстрорастущих опухолевых клеток во время репликации и ингибирует метилирование DNA, улавливая DNA-метилтрансферазы на DNA, что приводит к их истощению внутри клетки [25].

В настоящем исследовании было показано, что уровни белков циклин A2 и MUC4 снижались только при обработке клеток высокими концентрациями 5-аza-dC (5 мкМ). Низкие концентрации деметилирующего агента (1 мкМ) не оказывали влияния на уровни белков-мишеней. Кроме того, не было выявлено корреляции между различными концентрациями 5-aza-dC и снижением уровня белков-мишеней. Другими словами, уровни белков циклин A2 и MUC4 не снижались в 5 раз по сравнению с 1-кратным снижением уровней белка на 1 мкМ 5-aza-dC. В целом не было выявлено строгой корреляции между уровнем белков в клетке и обилием соответствующих mRNA. Часто величина корреляции составляет ~0,40, и это означает, что только ~40% различий в концентрации белка можно объяснить, зная значение концентрации mRNA [26]. Чтобы объяснить оставшиеся ~60% вариаций, нужно учесть вклад некоторой комбинации посттранскрипционной регуляции и шума измерения.

Полученные нами результаты подтвердили, что miR-219-5р и miR-219-1-3р оказывают антипролиферативное действие в отношении линии клеток U87MG. С помощью метода усиления функции (gain-of-function approach) Jiang et al. [10] трансфицировали клетки глиомы имитаторами miR-219-5р и определяли пролиферацию, миграцию и инвазию клеток. Эти авторы показали, что эктопическая miR-219-5p вызывает снижение скорости роста клеток, и пришли к заключению, что miR-219-5р принимает участие в негативной регуляции клеточного роста. В аналогичном исследовании Lahdoui et al. [12] после обнаружения повышенной экспрессии miR-219-1-3р в линии клеток рака поджелудочной железы также выявили подавление клеточной пролиферации, ассоциированное с пониженной миграцией клеток. MiRNA оказывают огромное влияние на развитие и прогрессирование рака путём подавления репрессии mRNA онкогена и/или опухолевого супрессора или блокирования трансляции белка. Воздействуя на свои мишени (онкогены или опухолевые супрессоры), miRNA действуют как онкогенные (влияя на опухолевый супрессор) или подавляющие развитие опухоли (влияя на онкоген) молекулы [27]. Поскольку онкогенные функции mRNA-мишеней miR-219-5р и miR-219-1-3р, циклина А2 (в плоскоклеточных клетках пищевода) и MUC4 (в клетках опухоли поджелудочной железы) были описаны в предыдущих работах [23, 24], было предположено, что наши кандидатные miRNA в качестве молекулсупрессоров опухолей способны останавливать клеточную пролиферацию раковых клеток, включая GBM. Наиболее очевидные отличия между нашим исследованием и предыдущими исследованиями заключаются в следующем: 1) в предыдущих работах не предоставлены доказательства существования механизма, лежащего в основе низкого уровня экспрессии miR-219-5р и miR-219-1-3р и 2) не было данных, касающихся восстановления активности супрессированной кандидатной miRNA с использованием эпигенетических факторов, и последующего влияния восстановления этой активности на способность miRNA подавлять развитие опухоли.

Есть несколько ограничений в нашем исследовании, которые могут быть рассмотрены в будущих исследованиях. Во-первых, это исследование было разработано на относительно небольшом размере выборки, что ограничило нас в получении более точных результатов, особенно в области взаимосвязи между характеристиками пациента и экспрессией генов miRNA. Поэтому для подтверждения полученных нами результатов потребуется проведение других исследований с использованием выборки большего размера. Во-вторых, мы исследовали только онкогенные мишени кандидатных miRNA, которых коснулось метилирование DNA. В связи с тем, что у каждой отдельной miRNA имеются многочисленные онкогенные или подавляющие опухоль мишени, необходимо провести обширный анализ, чтобы картировать сеть взаимосвязей между эпигенетической модификацией miRNA и экспрессией их mRNA-мишеней. Наконец, в настоящей работе мы использовали близлежащую нормальную ткань в качестве контроля. Отсутствие обширных исследований, ограниченность данных и малоизвестность гло-

бального профиля экспрессии генов этого типа контрольных субъектов в GBM не позволяет нам сделать однозначные выводы. Следовательно, для получения более реалистичных результатов в будущих исследованиях необходимо подготовить транскриптомное профилирование нормальной прилегающей ткани при GBM.

В заключение мы изучили роль эпигенетической регуляции miR-219-1 в патогенезе GBM человека. По нашему мнению, наши исследования впервые показали, что 1) miR-219-5p и miR-219-1-3p представляют собой чувствительные к метилированию miRNA при развитии GBM; 2) восстановление уровня экспрессии кандидатных miRNA с помощью деметилирующих агентов приводит к снижению уровня онкогенных mRNA-мишеней и соответствующих белков. Полученные результаты показывают, что картина лечения, основанная на анализе экспрессии miRNA, может служить в качестве основы для разработки новых потенциальных методов лечения GBM, и мы ожидаем в ближайшем будущем проведения дальнейших исследований и разработок в области эпигенетических лекарств.

Финансирование. Выполнение данной работы было поддержано IUMS (IRNA University of Medical Sciences) (проект № 24756).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соответствие этическим стандартам. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствовали этическим стандартам институционального и/или национального исследовательского комитета, а также Хельсинкской декларации 1964 года и более поздним поправкам к ней или сопоставимым этическим стандартам. От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2008. Estimated Incidence, Mortality and 5-Year Prevalence: Both Sexes. Available online: http://globocan.iarc.fr (accessed on 16 October 2013).
- Dolecek, T. A., Propp, J. M., Stroup, N. E., and Kruchko, C. (2012) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009, *Neuro Oncol.*, 14, v1-v49.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system, *Acta. Neuropathol.*, 114, 97-109.
- 4. Wen, P. Y., and Kesari, S. (2008) Malignant gliomas in adults, *N. Engl. J. Med.*, **359**, 492-507.
- 5. Bartel, D. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, **116**, 281-297.
- Vidigal, J. A., and Ventura, A. (2015) The biological functions of miRNAs: lessons from *in vivo* studies, *Trends Cell. Biol.*, 25, 137-147.
- 7. Reddy, K. B. (2015) MicroRNA (miRNA) in cancer, *Cancer Cell Int.*, **15**, 38.
- Liu, X., Chen, X., Yu, X., Tao, Y., Bode, A. M., et al. (2013) Regulation of microRNAs by epigenetics and their interplay involved in cancer, *J. Exp. Clin. Cancer. Res.*, 32, 96.
- 9. Konno, M., Koseki, J., Asai, A., Yamagata, A., Shimamura, T., et al. (2019) Distinct methylation levels of mature microRNAs in gastrointestinal cancers, *Nat. Commun.*, **10**, 3888.
- Jiang, B., Li, M., Ji, F., and Nie, Y. (2017) MicroRNA-219 exerts a tumor suppressive role in glioma via targeting Sal-like protein 4, *Exp. Ther. Med.*, 14, 6213-6221.
- Ma, Q. (2019) MiR-219-5p suppresses cell proliferation and cell cycle progression in esophageal squamous cell carcinoma by targeting CCNA2, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 24, 4.
 Lahdaoui, F., Delpu, Y., Vincent, A., Renaud, F.,
- Lahdaoui, F., Delpu, Y., Vincent, A., Renaud, F., Messager, M., et al. (2015) miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer, *Oncogene*, 34, 780-788.

- 13. Lee, R. S., Sohn, S., Shin, K. H., Kang, M. K., Park, N. H., and Kim, R. H. (2017) Bisphosphonate inhibits the expression of cyclin A2 at the transcriptional level in normal human oral keratinocytes, *Int. J. Mol. Med.*, **40**, 623-630.
- Piwecka, M., Rolle, K., Belter, A., Barciszewska, A. M., Żywicki, M., et al. (2015) Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues, *Mol. Oncol.*, 9, 1324-1340.
- Ondracek, J., Fadrus, P., Sana, J., Besse, A., Loja, T., et al. (2017) Global microRNA expression profiling identifies unique microRNA pattern of radioresistant glioblastoma cells, *Anticancer Res.*, 37, 1099-1104.
- Rao, S. A. M., Arimappamagan, A., Pandey, P., Santosh, V., Hegde, A. S., et al. (2013) miR-219-5p inhibits receptor tyrosine kinase pathway by targeting EGFR in glioblastoma, *PLoS One*, 8, e63164, doi: 10.1371/journal.pone.0063164.
- Guo, M., Peng, Y., Gao, A., Du, C., and Herman, J. G. (2019) Epigenetic heterogeneity in cancer, *Biomark Res.*, 7, 23.
- Ghasemi, A., Fallah, S., and Ansari, M. (2016) MiR-153 as a tumor suppressor in glioblastoma multiforme is downregulated by DNA methylation, *Clin. Lab.*, **62**, 573-580.
- Wang, L. Q., and Chim, C. S. (2015) DNA methylation of tumor-suppressor miRNA genes in chronic lymphocytic leukemia, *Epigenomics*, 7, 461-473.
 Serra, P. L., and Esteller, M. (2012) DNA methylation-
- Serra, P. L., and Esteller, M. (2012) DNA methylationassociated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer, *Oncogene*, 31, 1609-1622.
- Pan, Z., Zhu, L. J., Li, Y. Q., Hao, L. Y., Yin, C., et al. (2014) Epigenetic modification of spinal miR-219 expression regulates chronic inflammation pain by targeting CaMKIIγ, J. Neurosci., 16, 9476-9483.
- Shi, F., Chen, X., Fu, A., Hansen, J., Stevens, R., et al. (2013) Aberrant DNA methylation of miR-219 promoter in long-term night shiftworkers, *Environ. Mol. Mutagen*, 54, 406-413.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm, *Nat. Rev. Cancer*, 9, 153-166.

- Xia, P., Choi, A. H., Deng, Z., Yang, Y., Zhao, J., and Wang, Y. (2017) Cell membrane-anchored MUC4 promotes tumorigenicity in epithelial carcinomas, *Oncotarget*, 8, 14147-14157.
- 25. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P. A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects epigenetic therapy, *Nature*, **429**, 457-463.
- 26. De, Sousa, Abreu, R., Penalva, L. O., Marcotte, E., and Vogel, C. (2009) Global signatures of protein and mRNA expression levels, *Mol. Biosyst.*, **5**, 1512-1526.
- Svoronos, A. A., Engelman, D. M., and Slack, F. J. (2016) OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of MicroRNAs in cancer, *Cancer Res.*, 76, 3666-3670.

EPIGENETIC MODIFICATION OF microRNA-219-1 AND ITS ASSOCIATION WITH GLIOBLASTOMA MULTIFORME

A. Ghasemi¹, A. Mohammadi², and S. Fallah^{2*}

¹ Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences (TUMS), 14176-13151 Tehran, Iran

² Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences (IUMS), 14496-14535 Tehran, Iran; E-mail: fallah.s@iums.ac.ir

MicroRNA-219-1 (miR-219-1) acts as a tumor suppressor in a variety of cancer but, the regulatory epigenetic mechanism involved in its gene expression level has not been studied. Using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) and bisulfite genomic sequencing technology, promoter methylation level of miR-219-1 and gene expression levels of miR-219-5p and miR-219-1-3p were determined respectively, in glioblastoma multiforme (GBM) (n = 31), their adjacent normal tissues (n = 31), and GBM U87 cell line. Following treatment of GBM U87 cells with 5-aza-2'-deoxycitidine (5-aza-dC), miR-219-1 promoter methylation, their target mRNA and protein levels were determined by genomic bisulfite modification, real-time-PCR and ELISA techniques, respectively. Our results showed that gene expression levels of miR-219-5p and miR-219-1-3p were significantly lower in GBM patients relative to their adjacent normal tissues (p < 0.01). MiR-219-1 promoter had a high level of methylation in GBM tissues (p < 0.01) and a negative correlation was observed between miRNAs gene expression and methylation levels in GBM tissues (p < 0.01). Treatment of GBM U87 cells by 5-aza-dC decreased the methylation level of miR-219-1, target mRNA and protein levels, cyclin A2 and mucin 4 (MUC4), and increased the expression levels of miR-219-5p and miR-219-1-3p (p < 0.01). Using external miR-219-5p and miR-219-1-3p, the expression of cyclin A2 and MUC4 were suppressed and proliferative activities of the U87MG cell line was reduced (p < 0.01). These findings suggested that DNA methylation has a crucial role in the regulation of miR-219-1 gene and hyper-methylated miR-219-1 may be involved in GBM pathogenesis.

Keywords: miR-219-1, epigenetic, GBM

УДК 577.24::57.052.6

РЕГУЛЯЦИЯ БЕЛКОВ ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ И Nrf2-ОПОСРЕДОВАННОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ: ДВОЙНАЯ РОЛЬ КИНАЗЫ ГЛИКОГЕНСИНТАЗЫ 3

Обзор

© 2021 Г.А. Шиловский^{1,2,3*}, Т.С. Путятина², Г.В. Моргунова², А.В. Селиверстов³, В.В. Ашапкин¹, Е.В. Сорокина², А.В. Марков², В.П. Скулачев¹

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная noчта: gregory_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,

биологический факультет, 119234 Москва, Россия

³ Институт проблем передачи информации РАН, 127051 Москва, Россия

Поступила в редакцию 14.07.2020 После доработки 11.01.2021 Принята к публикации 11.01.2021

В обзоре рассматриваются некоторые генетические и молекулярные пути, связывающие циркадный хронометраж с метаболизмом и образующие системы положительной и отрицательной обратной связи - регуляторные петли. Путь Nrf2 (транскрипционного фактора 2 семейства NFE) считается компонентом антивозрастной программы – хранителем периода здоровой жизни и долголетия. Nrf2 обеспечивает адаптацию к стрессу путем положительной регуляции клеточной антиоксидантной защиты и других метаболических процессов, контролируя экспрессию более 200 генов-мишеней при различных видах стресса. Система киназы гликогенсинтазы 3 (GSK3) представляет собой «регулирующий клапан», контролирующий небольшие колебания уровней Nrf2, в отличие от Keap1, предотвращающего большие колебания уровня Nrf2 в отсутствии окислительного стресса и инактивирующегося при окислительном стрессе. Кроме того, GSK3 модифицирует коровые белки циркадных ритмов (Bmall, Clock, Per, Cry, Rev-erbα). При этом модификация GSK3 приводит к инактивации и деградации белков, положительно регулирующих биоритмы (Bmall, Clock), и наоборот, ведет к активации и ядерной транслокации негативно регулирующих биоритмы белков (Per, Rev-erba). Исключением является Cry, опосредующий, видимо, тонкую настройку биологических часов. Функция GSK3 представляется одним из узловых пунктов перекрестной регуляции циркадных ритмов и антиоксидантной защиты. Обсуждается перекрестное взаимодействие между мощнейшей антиоксидантной защитой клетки (системой Nrf2) и системой биоритмов у млекопитающих (включая влияние сверхэкспрессии/нокаута GSK3 на биоритмы и влияние нокаута/сверхэкспрессии генов циркадных биоритмов на работу системы Nrf2). Понимание механизмов взаимодействия регуляторных каскадов, связывающих программы поддержания гомеостаза и ответа клетки на окислительный стресс, способствует выяснению молекулярных механизмов, лежащих в основе старения и долголетия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: GSK3, Nrf2, окислительный стресс, старение, биологические ритмы, программы старения и антистарения, антиоксиданты.

DOI: 10.31857/S0320972521040059

введение

Долголетие как таковое не является первоочередной эволюционной «задачей» для живых организмов. С эволюционной точки зрения первоочередными являются проблемы адаптации к окружающей среде, связанные с нуждами выживания, обеспечения пищей и размноже-

* Адресат для корреспонденции.

Принятые сокращения: AΦK – активные формы кислорода; БА – болезнь Альцгеймера; ТФ – транскрипционный фактор; ARE – антиоксидант-респонс(ив)ный элемент (antioxidant response element); CK – казеинкиназа (casein kinase); Cry – белок криптохром; Cul3 – куллин 3 (cullin); D3T – H3-1,2-дитиол-3-тион; GSK3 – киназа гликогенсинтазы 3; Keapl – Kelch-подобный ЕСН-ассоциированный белок 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1); LPS – липополисахарид; MEF – эмбриональные фибробласты мыши; Nrf1 – транскрипционный фактор 1 семейства NFE (NFE2-related factor 1); Nrf2 – транскрипционный фактор 2 семейства NFE (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NFE2-related factor 2); NQO1 – NAD(P)H:хиноноксидоредуктаза; Per – белок Period; Rev-erbα – белок Reverse erythroblastosis virus α; RORE – RAR-related orphan receptor response element; SCN – супрахиазматическое ядро гипоталамуса; β-TrCP – белок, содержащий β-трансдуциновые повторы (β-transducin repeat containing protein), WT – дикий тип.

ния. Регуляция поддержания гомеостаза и репарации представляет собой сложную сеть взаимозависимых реакций, а эффективность этих процессов ухудшается с возрастом [1-9]. В ряде случаев старение может иметь адаптивное значение [4, 5].

Важной задачей биогеронтологии является изучение путей пересечения программ старения/антистарения с программами адаптации и поддержания гомеостаза, в том числе через систему регуляции биоритмов. Взаимодействие программ антистарения с противоположными им по действию программами старения определяет форму кривых выживания и их изменение в ходе биологической, а у человека – еще и культурной – эволюции. Радикальные изменения динамики смертности человека произошли в последние 150 лет в связи с научно-технической революцией. Они привели к резкому увеличению продолжительности жизни и приближению кривой выживания к прямоугольной форме, резко отличающей ее от кривых выживания шимпанзе, охотников-собирателей и даже жителей развитых стран Европы в XVIII-XIX вв. [1]. В то же время существуют и внутренние факторы, определяющие продолжительность жизни и ход кривых выживания. К ним относятся программы старения и антистарения, являющиеся, по современным представлениям, совокупностью сигнальных генных каскадов [1-6]. Если долгожительство поддерживается отбором (например, вследствие того, что «гены долголетия», будучи связаны с каким-либо адаптивным признаком, могут благодаря этому закрепляться в популяции), организмы могут вырабатывать специальные защитные и репарационные системы, замедляющие хронический феноптоз. Поскольку продолжительность жизни является такой же устойчивой видовой характеристикой, как размеры тела или плодовитость, ее длительность (т.е. момент наступления гибели), а также регулирующие ее механизмы должны быть хотя бы частично запрограммированы в геноме [4, 7, 8]. Долгоживущие виды обычно обладают более мощной системой восстановления повреждений, в том числе антиоксидантной защиты. Такие системы, ответственные за репарацию и другие восстановительные процессы, будут способствовать замедлению старения и долголетию. При старении активность работы таких систем в базальных условиях (а также их способность реагировать на повреждения) обычно снижается. Соответственно, системы, снижающие/подавляющие работу систем антистарения, и/или системы, работа которых связана с развитием заболеваний (в том числе возрастных), клеточным старением или клеточной гибелью,

будут относиться к программе старения [1]. Транскрипционный фактор (T Φ) Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, транскрипционный фактор 2 семейства NFE) является, согласно одному из авторов данной статьи (В.П.С.) [1], представителем одной из наиболее явных клеточных программ антистарения (рис. 1). Nrf2 регулирует транскрипцию антиоксидантных и детоксифицирующих ферментов, которые в совокупности представляют собой мощную защитную систему клетки [1–6]. Однако функции Nrf2 этим не ограничиваются, он также является основным регулятором клеточного гомеостаза, который контролирует экспрессию более 1% генов человека, связанных с реакциями биотрансформации, редокс-гомеостазом, энергетическим метаболизмом, репарацией ДНК и протеостазом [2]. Активность Nrf2 оказывает огромное влияние на самые разные физиологические и патологические процессы, поэтому он подвергается строгой регуляции в основном на уровне стабильности белка. Также особо отмечалось, что такие защитные системы могут находиться под контролем регуляторов (ингибиторов, играющих роль представителей программы старения) не только напрямую, но и через регуляцию белков биоритмов (циркадных, ультрадианных и других), т.е. через «Большие биологические часы» (рис. 1) [1].

В этом обзоре мы проанализировали данные о молекулярных механизмах взаимодействия защитной системы Nrf2, ингибитора Nrf2 – киназы гликогенсинтазы 3 (GSK3), а также коровых белков циркадных биоритмов в контексте программ старения и антистарения.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР Nrf2

Транскрипционный фактор 2 как представитель программ антистарения. Nrf2 активируется окислительными стрессорами и электрофильными агентами, он обеспечивает адаптацию к стрессу путем положительной регуляции клеточной антиоксидантной защиты и других метаболических процессов, контролируя экспрессию более 200 генов-мишеней при различных видах стресса. Продукты этих генов регулируют множество защитных функций, в том числе - детоксикацию лекарств, пентозофосфатный шунт и аутофагию [3]. Кроме того, Nrf2 непосредственно ингибирует индуцированную экспрессию различных генов, участвующих в воспалении, посредством связывания с их проксимальными регуляторными областями [10]. В клетках мышей с нокаутом гена, кодирующего Nrf2 (*Nfe2l2*), повышен уровень активных форм кислорода



Рис. 1. Большие биологические часы регулируют антиоксидантный статус клетки, воздействуя на транскрипционный фактор Nrf2, управляющий экспрессией более чем 200 цитопротекторных ферментов, ответственных за детоксикацию и антиоксидантную защиту. Большие биологические часы способствуют адаптации организма, регулируя циркадные ритмы с помощью мелатонина и белков циркадных ритмов. Активация Nrf2 вызывается действием активных форм кислорода. В то же время активируемая многими сигнальными путями киназа гликогенсинтазы 3 (GSK3) оказывает подавляющие действие, ингибируя транскрипционный фактор Nrf2. Препараты, содержащие соли лития, оказывают положительное действие, подавляя активность GSK3, ингибитора Nrf2. Светлыми линиями обозначены эффекты, стимулирующие активность Nrf2 (и последующую экспрессию антиоксидантных ферментов), в том числе и воздействие веществ, подавляя катализ, линией с тупым концом обозначено ингибирующее действие обозначено прямое стимулирующее воздействие, включая катализ, линией с тупым концом обозначено ингибирующее действие. AФК - активные формы кислорода; Bach1 – белок BTB domain and CNC homolog 1; GSK3 – киназа гликогенсинтазы 3; Keap1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (Kelch-like ECH-аssociated protein 1); Nrf2 – NFE2-related factor 2 (транскрипционный фактор 2 семейства NFE); β -TrCP – белок, содержащий β -трансдуциновые повторы (β -transducin repeat containing protein)

(АФК) [11], и они более чувствительны к окислительному стрессу [12]. С возрастом уровень Nrf2 уменьшается, а также ухудшается его способность к активации в ответ на стресс [1, 2, 6, 13]. Активность Nrf2 положительно коррелирует с продолжительностью жизни [2]. Все это позволяет считать его компонентом особой антивозрастной программы - хранителем периода здоровой жизни и долголетия [2]. Системы, подавляющие активность Nrf2, представляют собой компоненты программы старения [1]. Основными из них являются системы регуляции, вызывающие протеасомную деградацию белка Nrf2: система Kelch-подобного ЕСН-ассоциированного белка-1 (Keap1) и система киназы гликогенсинтазы 3 (GSK3) и белка, содержащего β-трансдуциновые повторы (β-TrCP) (рис. 1 и 2).

Еще одним белком, подавляющим действие Nrf2, является с-Мус [14]. Кроме того, белок Bach1, не являясь ингибитором Nrf2, конкурирует с ним за связывание с последовательностью ARE (антиоксидант-респонсивный элемент, antioxidant response element) [15] (рис. 1). Кроме упомянутой выше GSK3, воздействие других киназ (например, Fyn-киназы) также может приводить к инактивации Nrf2 и его экспорту из ядра [16, 17] (рис. 2). Активность Nrf2 в клетке не поддерживается на постоянном уровне. Его содержание подвержено осцилляции, а также циркадным (суточным) и ультрадианным колебаниям. Активаторы, которые стабилизируют Nrf2 от протеолиза, увеличивают его количество в цитоплазме, а последующее выравнивание концентраций (т.е. повышение уровня Nrf2 в ядре) активирует транскрипционный ответ ARE. После увеличения уровня белка Nrf2 и индукции ARE-содержащих генов происходит активация GSK3, которая, в свою очередь, фосфорилирует Nrf2 и таким образом способствует его протеасомной деградации с участием белка β-TrCP [18].

Биоритмы имеют важное адаптивное значение и зависят от многих факторов, в том числе от редокс-статуса. Нарушение регуляции циркадных ритмов является одним из характерных возрастных расстройств, поэтому поддержание правильного функционирования системы суточных часов представляется перспективным способом продления жизни [19]. Основой механизма циркадных часов являются ТФ Сlock и Bmal1. Они гетеродимеризуются через свои PAS-домены и индуцируют экспрессию контролируемых часами генов, связываясь с последовательностью E-box в их промоторах [20, 21]. Периодичность



Рис. 2. Молекулярные механизмы циркадных биоритмов и осцилляций «цитоплазма-ядро» транскрипционного фактора Nrf2, управляющего экспрессией цитопротекторных ферментов. Характерной чертой регулируемых Nrf2 генов является наличие последовательности ARE в их промоторе, тогда как для большинства генов белков циркадных биоритмов - последовательности E-box (также есть и в промоторе гена Nfe2l2, кодирующего Nrf2). Ген Bmal1 содержит в промоторе последовательность RORE. Пунктирными линиями со стрелкой обозначено перемещение того или иного белка (в ядро и из ядра), а сплошными линиями – прямое воздействие, включая катализ. Сплошной линией с тупым концом обозначено ингибирующее действие. Сплошной линией с разрывом отмечено опосредованное влияние (например, стимулирующее влияние мелатонина на экспрессию белков биоритмов и Nrf2). Кружочки с буквой р означают присоединение к белку фосфатной группы. Наличие двух таких кружочков после взаимодействия модифицируемого белка с той или иной киназой означает, что реакция идет по механизму двойного фосфорилирования (подробнее см. в тексте). АсТ – ацетилтрансфераза; ARE – антиоксидант-респонс(ив)ный элемент (antioxidant response element); Bmal1 – белок brain and muscle ARNT-like 1; Clock – белок Circadian locomoter output cycles kaput; Cry – белок криптохром; GSK3 – киназа гликогенсинтазы 3; Keap1 – Kelch-подобный ЕСН-ассоциированный белок 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1); Nrf2 – транскрипционный фактор 2 семейства NFE (NFE2-related factor 2); Per – белок Period; Rev-erba – белок Reverse erythroblastosis virus α; RORE – RAR-related orphan receptor response element; β-TrCP – белок, содержащий β-трансдуциновые повторы $(\beta$ -transducin repeat containing protein)

экспрессии генов суточных ритмов обеспечивают белки Per1 и Per2. Они транслоцируются в ядро, образуя стабильные комплексы (включающие в себя также белки криптохромы Cry1 и Cry2), подавляющие транскрипцию посредством связывания с позитивными факторами Clock/Bmal1. В результате формируется чередование подъемов и спадов содержания мPHK, а затем и самих белков Per1 и Per2 с фазой, равной приблизительно 24 часа [22, 23], замыкающее

тем самым петлю отрицательной обратной связи [24, 25]. С белками-регуляторами суточных ритмов связаны многие метаболические пути — например, важный системный регулятор обмена веществ АМРК (АМР-активируемая протеинкиназа) [26], которая фосфорилирует белок Сгу1, и этим способствует его деградации [27].

Транскрипционный фактор Nrf2 как осциллятор. Регуляция активации Nrf2 в ядре и цитоплазме. Сложность в понимании процессов регуля-

ции биоритмов отчасти связана с существованием у Nrf2, как и у АФК, своих собственных ритмов. Показано, что при действии активаторов Nrf2 стимуляция экспрессии ARE-зависимых генов происходит не за счет стабилизации и общего повышения уровня Nrf2, а в результате повышения частоты и уменьшения амплитуды транслокационных циклов Nrf2 между цитоплазмой и ядром клетки [28]. В предложенной Xue et al. [28] «колебательной модели» GSK3 играет регуляторную роль, обеспечивая инактивацию и расщепление Nrf2. Согласно этой модели, Keap1 и Nrf2 удерживаются вместе за счет протеин-треонинфосфатазы PGAM5 (протеинтреонинфосфатаза 5 из семейства фосфоглицератмутаз), которая связывает Keap1 и Nrf2 с внешней митохондриальной мембраной [29]. В условиях окислительного (а точнее, электрофильного) стресса Nrf2 высвобождается из комплекса с Keap1, фосфорилируется [3] и транслоцируется в ядро с помощью импортинов $\alpha 5$ и $\beta 1$ [30]. В ядре Nrf2 активирует гены-мишени, связываясь с промоторной последовательностью ARE [3, 14]. После этого Nrf2 фосфорилируется Fyn-киназой [16] и ацетилируется, а затем удаляется из ядра через экспортный канал ядерной мембраны exportin-1/crm1 [28]. GSK3β при этом является регулирующим звеном, непосредственно фосфорилирующим Nrf2, вызывая деградацию белка Nrf2 с помощью β-TrCP [3, 31, 32]. Xue et al. [28] также показали, что удержание Nrf2 в ядре клетки с помощью блокатора экспортных каналов crm1, лептомицина В, приводит к снижению ARE-зависимой транскрипционной активности с цикличностью колебаний примерно 2 часа. В модели это объясняется ацетилированием и инактивацией Nrf2 в ядре (рис. 2). Согласно оценкам Xue et al. [28], Nrf2 совершает 2–3 колебания до деградации в нестимулированных клетках и большее количество - в клетках, подвергнутых окислительному стрессу.

В колебательной модели Nrf2 есть альтернативный регуляторный механизм. Функциональная активность ядерного Nrf2 может регулироваться активностью деацетилаз, циркадным контролем экспрессии гена *Nfe2l2*, кодирующего Nrf2, и различными конформациями комплекса Nrf2 с Keap1 [28]. Показано, что в отсутствии окислительного стресса взаимодействие Keap1 и Nrf2 происходит циклически с образованием сначала «открытой» конформации, в которой Nrf2 связывается с одной из двух субъединиц Keap1, и затем — «закрытой» конформации, в которой Nrf2 связывается с обеими субъединицами Keap1 [33]. Колебательная модель основана на активации Nrf2 путем высвобождения из комплекса с Keap1, поскольку скорость этого процесса влияет на частоту колебаний и цитопротекторный транскрипционный ответ. При действии индукторов Nrf2 (оксидантов и электрофильных агентов) комплексы Nrf2/Keap1 фиксируются в закрытой конформации, из которых Nrf2 не высвобождается. В результате прекращается регенерация свободного Keap1, и вновь синтезируемые молекулы Nrf2 не разрушаются. Также модель предполагает наличие и других способов активации Nrf2, например, деацетилирование Nrf2 ядерными деацетилазами [28].

Перекрестное взаимодействие систем транскрипционного фактора Nrf2 и биоритмов. Экспрессия Nrf2 имеет циркадный ритм с периодом 23,7 часа [34]. Циркадные вариации и гендерные различия в уровнях транскриптов антиоксидантных генов могут влиять на реакцию организма в ответ на окислительный стресс в разное время суток [35]. Early et al. [36] установили, что удаление Bmall в макрофагах нарушает активность Nrf2, способствуя накоплению АФК и провоспалительного цитокина IL-1β. Также они показали, что нокдаун Nrf2 уменьшает индукционный ответ на добавление липополисахарида (LPS) трех основных генов-мишеней Nrf2 – гемоксигеназы (Hmox1), глутатионредуктазы (Gsr) и NAD(P)H:хинон-оксидоредуктазы 1 (Nqo1). При индукции LPS уровень экспрессии этих генов в макрофагах Bmal1^{-/-} ниже, чем в макрофагах Bmal1^{+/+}. Подобно большинству генов, кодирующих коровые белки циркадных биоритмов, ген Nfe2l2, кодирующий Nrf2, также содержит последовательность Е-box. Гетеродимер Bmall/Clock связывается с этой последовательностью, активируя транскрипцию Nrf2, и, как следствие, его мишеней – *Hmox1*, Gsr и Ngo1. Также Early et al. [36] обнаружили, что базальный уровень АФК в перитонеальных миелоидных клетках значительно увеличивается во второй половине дня, что обратно коррелирует с суточным ритмом экспрессии Bmal1 и Nrf2.

По сравнению с Bmal1^{+/+} в макрофагах Bmal1^{-/-} увеличен как базовый, так и индуцированный LPS уровень AΦK (таблица). Молекулярные часы контролируют экспрессию Nrf2 и его способность регулировать IL-1β в миелоидных клетках.

Рекоvic-Vaughan et al. [34] выявили, что уровень белка Nrf2 меняется ритмично. Ритмическая экспрессия белка Nrf2 обнаружена также в клеточных лизатах и в ядрах фибробластов Rat1 (таблица). Это доказывает клеточно-автономную устойчивую ритмическую экспрессию Nrf2. Мутация в кор-последовательности E-box в промоторе гена Nrf2 (*Nfe2l2*) полностью устраняет его индукцию комплексами Clock/Bmal1. В легких у мышей дикого типа мРНК Nrf2 проявляет четкую ритмическую экспрессию, которой не наблюдается у мышей Clock^{Δ 19}. Обнаружено также зависимое от времени связывание Clock/Bmal1 в области E-box промотора гена Nrf2 (*Nfe2l2*). Эти результаты показывают, что ген *Nfe2l2*, кодирующий Nrf2, непосредственно регулируется компонентами ядерных часов

in vitro и *in vivo* через консервативный элемент E-box в его промоторе. Данные, приведенные в таблице, полученные на эмбриональных фибробластах, нокаутированных по *Nfe2l2* мышей, подтверждают непосредственный Nrf2-зависимый ритмический контроль нижестоящих мишеней (таблица).

У мышей дикого типа (WT) индукция Nrf2 с помощью D3T (H3-1,2-дитиол-3-тион) приво-

Цель	Воздействие	Объект	Эффект	Ссылка				
А. РИТМЫ Nrf2 И ДРУГИХ МАРКЕРОВ РЕАКЦИИ НА СТРЕСС								
БР	БР	печень мыши	экспрессия индуцируемых Nrf2 генов выше днем, чем ночью; пик Nrf2, Nqo1 и Dbp – ранним вечером; пик Keap1, Gclc и Rev-erbα – ближе к середине дня	[35]				
Ритм АФК	БР	макрофаги	базальный уровень АФК увеличен на ~25% ($p \le 0.05$, <i>t</i> -тест) во второй половине дня (по сравнению со време- нем перед утром) и отрицательно коррелирует с суточ- ным ритмом экспрессии Bmall и Nrf2	[36]				
Ритм Nrf2	БР	мыши	пик белка Nrf2 – в циркадное время 3–7 (СТ3–СТ7), провал происходит в СТ15–СТ19	[34]				
Ритм Nrf2	БР	фибробласты Rat1	ритм экспрессии белка Nrf2 обнаружен в клеточных лизатах ($p < 0,01$, односторонний ANOVA для оценки эффекта времени) и в ядрах ($p < 0,001$, <i>t</i> -test)	[34]				
БР	H ₂ O ₂ , D3T	MEF	H_2O_2 (100 мкМ) и D3T(100 мкМ) увеличивают амплитуду (соответственно в ~2,5 и в ~5 раз, <i>t</i> -тест, <i>p</i> < 0,05), но не продолжительность периода	[37]				
Б. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ СИСТЕМЫ БИОРИТМОВ И Nrf2								
Ритм Nrf2	нокдаун БР	мыши	экспрессия мРНК Nrf2 в легких мышей WT (но не в Clock ^{$\Delta 19$}) имеет четкий ритм ($p < 0,05$, односторонний ANOVA); нокдаун Bmal1 снижает уровень мРНК Nrf2 ($p < 0,05$)	[34]				
Уровень АФК	нокаут гена БР	макрофаги	в макрофагах Bmal1 ^{-/-} выше по сравнению с Bmal1 ^{+/+} уровень АФК — как базовый (в 4 раза, $p \le 0,01$), так и индуцированный LPS (в ~2,3 раза, $p \le 0,05$)	[36]				
Уровень Nrf2	нокаут гена БР	MEF	у синхронизированных MEF мышей Cry1 ^{-/-} /Cry2 ^{-/-} повышены уровни экспрессии Nrf2 и его генов-мишеней	[34]				
БР	нокаут Nrf2	MEF	нокаут Nrf2 в MEF снижает амплитуду ритма и продолжительность периода (соответственно в ~5 раз и на ~15%, <i>t</i> -тест, $p < 0.05$)	[37]				
БР	сверхэкспрессия Nrf2	гепатоциты мыши MMH-D3	сверхэкспрессия Nrf2 уменьшает амплитуду ритма (в ~ 2 раза) и продолжительность периода (на $\sim 2\%$, <i>t</i> -тест, $p < 0,05$) по сравнению с WT	[37]				
Экспрессия гена БР	нокаут Nrf2	MEF	в Nrf2 ^{-/-} МЕГ пик накопления белка Rev-erbα был отсрочен (но не исчез) на 4 ч относительно WT; нокдаун Nrf2 в MEF снижает уровень экспрессии Rev-erbα на ~45–50%	[37]				

Взаимовлияние генетической и химической активации систем биоритмов и Nrf2

Примечание: БР – биоритмы; Dbp – Albumin site D-binding protein; D3T – H3-1,2-дитиол-3-тион; Gclc – каталитическая субъединица глутамат-цистеинлигазы; LPS – липополисахарид; MEF – эмбриональные фибробласты мыши; Nqo1 – NAD(P)H:хиноноксидоредуктаза; WT – дикий тип.

дит к активации E-box- и D-box-содержащих часовых генов (Rev-ErbA, Rev-ErbB, Dbp, Per3) [37]. Полная активация этих генов требует наличия сигнального пути Keap1/Nrf2, так как у мышей Nrf2^{-/-} она значительно ослаблена. Потеря Nrf2 приводит к нарушению циркадного ритма в эмбриональных фибробластах мышей Nrf2^{-/-}, это является прямым эффектом и указывает на роль Nrf2 в регуляции амплитуды ритма и продолжительности периода (таблица) [37]. Таким образом, Nrf2 регулирует экспрессию коровых белков и стабилизирует циркадные циклы часов, связывает редокс-потенциал и определение времени [37]. Нокаут гена, кодирующего Nrf2 (Nfe2l2), в печени мышей приводит к изменению длины циркадного периода. Эти эффекты Nrf2 реализуются, вероятно, через регуляцию экспрессии Cry2 и Rev-erba. По-видимому, Nrf2 и белки биоритмов образуют блокирующую петлю, которая интегрирует клеточные редокс-сигналы в циркадный ритм [37]. Nrf2 входит в группу CncC (семейство ТФ Cap'n'collar). В исследовании Spiers et al. [38] было показано, что конститутивная сверхэкспрессия CncC у Drosophila положительно влияет на функцию нейронов через модификацию синаптических механизмов, а подавление экспрессии Keap1, являющегося ингибитором CncC, улучшает синаптическую функцию и увеличивает продолжительность жизни. Результаты исследования Hansen et al. [39] свидетельствуют, что соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона (GSH/GSSG) контролирует Nrf2 исключительно в цитоплазматическом компартменте, но не регулирует связывание Nrf2 с ARE в ядре. И наоборот, так как избыточная экспрессия тиоредоксина 1 (Trx-1) не влияет на диссоциацию Nrf2 и его перемещение в ядро, предполагается, что ядерный Trx-1 ответственен за регуляцию Nrf2 не в цитоплазматических событиях (диссоциация/ядерная транслокация), а именно на уровне взаимодействия Nrf2 с ДНК [39].

КИНАЗА ГЛИКОГЕНСИНТАЗЫ 3

Далее мы перейдем к рассмотрению протеинкиназы GSK3β, ее роли как ингибитора Nrf2 и других белков, механизмам ее действия и участия в регуляции клеточных функций.

GSK3 (ATP:protein phosphotransferase, EC 2.7.1.37) – внутриклеточная серин/треониновая протеинкиназа с молекулярной массой 47 кДа, синтезируемая во всех тканях организма [40, 41], представлена двумя паралогами (α и β), обычно называемыми в литературе изоформа-

ми (хотя с точки зрения биохимии более точным было бы обозначение «изоферменты»). Кроме обычной, GSK3β1, у GSK3β известна удлиненная GSK3β2-форма с высоким уровнем экспрессии при развитии мозга [42].

Уникальное положение GSK3β в регуляции клеточных функций связано с тем, что данный фермент влияет на активность более чем 100 белков и сам, в свою очередь, зависит от большого количества стимулов. Например, активация Akt1 фосфорилирует и ингибирует GSK3β [43].

GSK3 влияет на большинство клеточных процессов, включая рост, дифференцировку и смерть, и модулирует ответ на гормональные, пищевые и стрессовые стимулы. Вызванная стрессом транслокация GSK3β может приводить к взаимодействию с митохондриальными белками, включая PI3K-Akt, PGC-1a, HK II, РКСє, компоненты дыхательной цепи и субъединицы mPTP. Митохондриальный пул GSK3β оказывает регуляторное влияние на биогенез, энергетику, проницаемость и подвижность митохондрий, а также на апоптоз [44]. Важной функцией GSK3β является ингибирование белка β -катенина и участие в сигнальном пути Wnt, играющем важную роль в процессах эмбриогенеза, роста и дифференцировки клеток [41], а также процессов нейрогенеза и синаптической пластичности [45]. GSK3β регулирует клеточный цикл, ингибируя циклин D1, необходимый для вступления клетки в S-фазу [46]. Она также принимает участие в регуляции обмена глюкозы, ингибируя белки IRS и кинезины [47].

Фосфорилирование GSK3 по серину-9 (S9), вероятно, наиболее подвержено колебаниям. Эти колебания могут быть быстрыми, как при деполяризации/реполяризации нейронов, или медленными, как при изменении уровней циркулирующих гормонов, регулирующих GSK3, и циркадных ритмов в супрахиазматическом ядре (SCN) и печени [48].

GSK3 β конститутивно активируется путем аутофосфорилирования по Y216 и инактивируется путем фосфорилирования по S9. Активная GSK3 β с фосфорилированием по Y216 составляет не менее половины общей GSK3 β в культивируемых клетках [49]. В мозге мышей GSK3 β присутствует в основном в активной форме, тогда как доля неактивной (с фосфорилированием по S9) невелика [50]. Фосфорилирование в положении Y216, необходимое для активации фермента, может обеспечиваться киназами Pyk2 и Fyn либо в результате аутокаталитического процесса [51]. Фосфорилирование по S9 ингибирует активность GSK3 β , это является основным механизмом ее регуляции. Большое количество киназ фосфорилирует GSK3β в этом положении: протеинкиназы A, B и C, киназы PrkG1, ILK, p70S6K и p90SRK; а дефосфорилирует — протеинфосфатаза 2A (PP2A) [52]. Однако в мозге основным путем регуляции GSK3β, видимо, является ингибирование при фосфорилировании митоген-активируемой протеинкиназой p38 по S389 [53].

GSK3 как представитель программы старения. Косвенное подтверждение роли GSK3 β в программе старения можно найти в работе Krishnankutty et al. [49], в которой изучались три фракции GSK3 β в нейронах и мозге мыши: фосфорилированная по Y216 (активная форма фермента), фосфорилированная по S9 и Y216 и нефосфорилированная (две последние формы неактивны). И хотя в гиппокампе общий уровень GSK3 β с возрастом не изменялся, доля неактивного фосфорилированного по S9 фермента при старении снижалась и была вдвое ниже у самок в возрасте 1,5 года, чем у трехнедельных особей [49].

GSK3*β* и клеточное старение. Показано, что в стационарной культуре первичных нейронов коры головного мозга мыши при практически неизменном общем уровне GSK3^β заметно изменяется соотношение ее изоформ. Доля фосфорилированной по S9 (т.е. неактивной) формы GSK3β была максимальной (более 30%) через 3 дня культивирования без пересева, а затем постепенно снижалась, достигая 15% через 12 дней культивирования. Активность GSK3β, фосфорилированной по Y216, наоборот, постепенно увеличивалась «с возрастом» [49]. «Старые» фибробласты человека WI-38 (число удвоений клеточной популяции (УКП) в диапазоне 58-64), в отличие от клеток «среднего возраста» (диапазон УКП – 38–41) и «молодых» (диапазон УКП – 26–30), проявляют типичные для старения признаки, включая увеличенный размер, уплощенную форму и повышенный уровень активности, ассоциированной со старением β-галактозидазы. Также в ядрах «старых» клеток повышен уровень белков GSK3α и GSK3β.



Рис. 3. Негативные эффекты активации GSK3

Ингибитор GSK3, литий, снижает ее активность и возрастное накопление р53, связанное с сенесцентным состоянием, а также заставляет клетки переходить в обратимое состояние покоя. Эти результаты показывают, что часть клеточного пула р53, которая активируется в стареющих клетках, модулируется ассоциацией с GSK3β в ядре, способствующей активности р53 и клеточному старению [54]. Аналогично, базальный уровень фосфорилированного (т.е. неактивного) белка GSK3 у старых (18 мес.) сирийских хомячков (Mesocricetus auratus) намного ниже, чем у молодых (1-3 мес.) [55]. У старых хомячков литий не влияет на период ритма двигательной активности и уровень фосфорилированной GSK3, в отличие от его эффекта у более молодых животных [55]. Все вышеперечисленное косвенно подтверждает предложенную роль GSK3β как bona fide представителя программы старения.

GSK3*β* и возрастные патологии. Еще одним подтверждением участия GSK3^β в программе старения можно считать изменение ее активности при возрастных заболеваниях (рис. 3). В нейронах она избирательно фосфорилирует ассоциированный с микротрубочками тау-белок в участках, которые являются гиперфосфорилированными в мозге при болезни Альцгеймера (БА) [56]. Такой гиперфосфорилированный тау-белок имеет сниженную аффинность к микротрубочкам и накапливается в виде спиральных филаментов, являющихся главным компонентом нейрофибриллярных клубков и нитей в мозге при БА. Нейрофибриллярные клубки обнаруживаются при таких заболеваниях, как боковой амиотрофический склероз, паркинсонизм, деменция, корково-базальная дегенерация, травматическое повреждение мозга, синдром Дауна, постэнцефалитический паркинсонизм и болезнь Ниманна-Пика. В ткани мозга пациентов с БА уровень белка GSK3β повышен на 50% [56]. Ингибирование GSK3β уменьшает когнитивные дефициты, ассоциированные с БА и другими вышеупомянутыми заболеваниями. Активность GSK3β увеличена в клеточной (при депривации ростовых факторов) и животной (церебральная ишемия) моделях нейродегенерации [57]. Провоспалительный эффект GSK3β обусловлен стимуляцией продукции IL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-12 и подавлением синтеза IL-10 [48] через Toll-like рецепторы моноцитов [58].

Механизмы действия GSK3. Предварительное фосфорилирование и GSK3. Фосфорилирование, осуществляемое GSK3, требует предварительного фосфорилирования субстрата другой киназой в положении +4 по отношению к сайту фос-

форилирования GSK3, что соответствует часто встречающемуся (но не универсальному) консенсусу (S/TXXXS/T) для GSK3 [50, 59, 60]. Зачастую такая двойная модификация приводит к последующему убиквитинированию и опосредуемой соответствующими адаптерами (например, белками F-box) протеасомной деградации.

Деградация белков: фосфорилирование и убиквитинирование. Белки F-box ответственны за распознавание субстрата, причем каждый такой белок распознает отдельную группу субстратов [61]. В зависимости от структуры субстратассоциированной области белки F-box подразделяются на 3 категории: с повторами WD40 (Fbxw); с богатыми лейцином повторами (Fbxl) и с другими доменами (Fbxo). Считается, что Fbxl3 отвечает за убиквитин-зависимую деградацию белка биоритмов Cry; мутация Fbxl3 у мышей приводит к удлинению циркадного периода примерно до 26 часов [62, 63]. β-TrCP (также известный как Fbxw1) узнает белок биоритмов Per после фосфорилирования казеинкиназой 1 (СК1) (но не GSК3) [64]. Мишени β-TrCP часто содержат мотив разрушения DSGXXS; фосфорилирование обоих серинов в этой последовательности значительно увеличивает узнавание β-TrCP [65]. Поскольку эта последовательность напоминает консенсус-мишень GSK3 (SXXXX(X)S), то много субстратов GSK3 являются β-TrCP-связывающими белками. Такую последовательность содержат, например β-катенин и Nrf2 [60].

Далее мы рассмотрим более подробно роль и последствия модификации протеинкиназой GSK3 белков циркадных биоритмов и Nrf2.

Регуляция активности Nrf2 с помощью GSK3. GSK3 фосфорилирует специфические остатки серина в Neh6-домене Nrf2 для создания домена деградации, который затем распознается адаптером убиквитинлигазы β -TrCP и убиквитинируется с последующей деградацией протеасомным комплексом с участием куллина-1 (Cull) и белка RING-box 1 (Rbx1). В альтернативном сценарии GSK3 β репрессирует Nrf2 посредством активации тирозинкиназ (независимо от β -TrCP). GSK3 β фосфорилирует киназу Fyn по Y213. Активированная Fyn накапливается в ядре, где фосфорилирует Nrf2 (у мышей и крыс по Y568, а у человека – по Y576), что приводит к экспорту и деградации Nrf2 [16] (рис. 2).

Сuadrado [3] предложил модель, называемую «двойной регулятор потока», чтобы объяснить, как Keap1 и β-TrCP координируют стабильность Nrf2. В условиях окислительного стресса или под воздействием соединений, реагирующих с тиолом, уровень Nrf2 в ядре увеличивается, стимулируя экспрессию содержащих эле-

мент антиоксидантного ответа (ARE) генов. В отсутствии стресса убиквитинирование Nrf2 преимущественно осуществляется с помощью куллина-3 (Cul3) с использованием Keap1 в качестве субстратного адапторного белка для комплекса лигазы ЕЗ и белка Rbx1 (Rbx1/ E3/Cul3) [3] (рис. 2). Обнаружено, что домен Neh6 Nrf2 содержит две связывающие β-TrCP последовательности [31]. Фосфорилирование GSK3 по S338 (и S342) в домене Neh6 усиливает связывание с β-TrCP [31, 32]. Предварительное фосфорилирование Nrf2, по-видимому, опосредуется киназами семейства СМGС (CDK/ MAPK/GSK3/CLK), в которых гибкая часть полипептида, называемая Т-петлей, блокирует каталитический сайт, когда он не фосфорилирован сигнальной киназой. Однако, в отличие от большинства СМGС-киназ, GSK3 в основном фосфорилируется по своей Т-петле в положениях Y279 (GSK3а) или Y216 (GSK3β). В результате GSK3 способна к катализу в базальных условиях, т.е. при отсутствии сигнального стимула [50, 66, 67]. Это обеспечивает дополнительную регуляторную точку для контроля стабильности Nrf2 [15, 31]. Согласно другим данным, предварительно фосфорилировать Nrf2 может киназа DYRK [68]. Ингибирование как GSK3, так и осуществляющей предварительное фосфорилирование киназы, стабилизирует Nrf2 [68]. Интересно, что родственный Nrf2 TФ, Nrf1, также деградируется протеасомой β-TrCP-зависимым образом через мотив DSGLS, но в этом случае мотив распознавания фосфорилируется СК2, а не GSK3 [68]. β-Катенин имеет ту же самую предварительно фосфорилирующую киназу, что и гликогенсинтаза [68]. Таким образом, скорость убиквитинирования и деградации каждого из этих субстратов частично определяется регуляцией их специфических предварительно фосфорилирующих киназ и GSK3/CK2 (рис. 2).

В опухолевых клетках, в которых Keap1 (и, следовательно, убиквитинлигазный комплекс Rbx1/E3/Cul3) не способен взаимодействовать с Nrf2, GSK3 сохраняет способность подавлять активность Nrf2. В этом случае и в эмбриональных фибробластах мыши Keap1^{-/-} ингибирование GSK3 с помощью CT99021 увеличивает активность Nrf2 [31].

GSK3 и биоритмы. Циркадный ритм представляет собой консервативную систему биохронометрирования, которая адаптирует поведенческие и физиологические процессы к 24часовым циклам окружающей среды [25, 69]. Регуляторное воздействие со стороны циркадного осциллятора супрахиазматического ядра осуществляется посредством нейрональных связей с гонадолиберинэргическими нейронами, а также гуморальным путем — посредством гормона эпифиза, мелатонина [69, 70]. Секрецию мелатонина эпифизом стимулирует свет [71]. Известно, что система восприятия света, ведущая к SCN, различается у различных представителей семейства землекоповых (Bathyergidae) (характеризующихся замедленным старением и высоким коэффициентом долголетия) в зависимости от продолжительности жизни и степени социальности [72].

Действие мелатонина опосредуется через его мембранные рецепторы (МТ1 и МТ2) или через независимые от рецепторов механизмы, включая Nrf2 [73, 74]. Мелатонин связывается не только с мембранными рецепторами, но и с белкамирецепторами на поверхности ядра, а также действует на уровне хроматина, непосредственно влияя на синтез белков. Показано, что гены ядерных рецепторов Ror α , Ror β , Ror γ (так называемых орфанных ядерных ретиноидных рецепторов Ror/Rzr) экспрессируются в разных органах и тканях, включая SCN гипоталамуса, сетчатку глаза и эпифиз [75]. Их лигандами являются холестерин и его производные, но не мелатонин [75]. Мелатонин стимулирует экспрессию генов биоритмов через RORE-элементы гена *Bmal1* [25] и экспрессию Nrf2 – через цепочку промежуточных звеньев [74, 75] (отмечено на рис. 2 линией, содержащей разрыв). Не подвергается сомнению и существование ядерных рецепторов мелатонина [75]. Например, показано, что мелатонин является лигандом ядерного рецептора витамина D (VDR) с $K_d = 21,2 \pm 1,9$ мкМ [76].

GSK3α и GSK3β экспрессируются в SCN гипоталамуса [48], при этом уровень мPHK GSK3α в SCN мыши выше, чем уровень мPHK GSK3β [77]. GSK3 обеспечивает обратную связь, влияющую на функцию молекулярных часов в нейронах SCN [78]. При этом экспрессия в SCN белка GSK3α и фосфорилированной формы GSK3β имеет суточный ритм [77].

С наступлением ночи активность GSK в нейронах SCN крысы падает (увеличивается количество клеток, окрашиваемых иммуногистохимически как фосфорилированная, неактивная форма GSK3 β , достигая максимума в течение 4 часов). Ближе к рассвету активность GSK β , наоборот, возрастает. Иммунофлуоресцентное окрашивание SCN мышей показало, что свет значительно увеличивает активность GSK3 (т.е. снижает уровень фосфорилированной GSK3 β) уже через 30–60 мин после светового импульса [79]. В контроле поздней ночью содержание фосфорилированной формы GSK3 снижается (а ее активность, соответственно, возрастает). В опытной группе такого снижения не происходит (т.е. содержание активной формы GSK3 не увеличивается). Таким образом, световой импульс подавляет активность GSK3, в результате чего происходит сглаживание ее колебаний [80]. Даже у мышей, содержащихся в постоянной темноте в течение, по меньшей мере, двух недель, в экстрактах гиппокампа наблюдается выраженный эндогенный циркадный ритм в фосфорилировании GSK3β, но не GSK3α [81]. У дрозофилы активность Sgg (гомолог GSK3) в малых вентральных боковых нейронах (доминирующих в регуляции общей ритмической двигательной активности взрослых особей) играет критическую роль в поддержании нормальной ритмичности [82].

Субстраты GSK3, связанные с циркадными ритмами. GSK3 взаимодействует с Per2 in vitro и in vivo, фосфорилирует Per2 in vitro и способствует его перемещению в ядро (рис. 2), но вызывает протеасомную деградацию его партнера, Cry2 [48, 83, 84], фосфорилируя вместе с другой сериновой киназой, DYRK1A, белок Cry2 соответственно по S557 и S553 [24, 85]. Также GSK3 фосфорилирует Bmal1 (S17/T21), что приводит к его последующему убиквитинированию и деградации [86] и Clock (S427/S431) [87] (рис. 2). С помощью тестов на активацию/ингибирование киназной активности GSK3 показано, что эта киназа регулирует фосфорилирование/деградацию Clock через особый кластер остатков серина (фосфодегрон) [87].

При оценке фосфорилирования GSK3β по S9 (такое фосфорилирование, как уже упоминалось, подавляет активность киназы), активность GSK3β максимальна с поздней ночи до раннего утра, при этом она повышает уровень фосфорилирования Cry2 по S557, тем самым способствуя ритмической деградации белка Cry2 [87]. Кроме того, GSK3 фосфорилирует Rev-erba (белок, подавляющий экспрессию Bmal1, и, соответственно, индуцируемую им экспрессию генов биоритмов), однако эта модификация приводит не к деградации, а к активации белка Rev-erba и его транслокации в ядро [88].

Среди подавляющих экспрессию циркадных белков выделяются Cry2 и Per2. Iitaka et al. [48] обнаружили, что GSK3 β взаимодействует с Per2 *in vitro* и *in vivo* и может фосфорилировать Per2 *in vitro*, что не приводит к деградации Per2, но способствует ядерной транслокации (в отличие от фосфорилирования казеинкиназой) (рис. 2). Сверхэкспрессия GSK3 β вызывает сдвиг фаз Per2, которые изменяют период примерно на 15% (3–4 часа) или приводят к полной потере циркадных ритмов, способствуя появлению экстремальных фенотипов. Существует также

несколько дополнительных молекулярных мерегулирующих ханизмов. циклическую экспрессию генов Per1 и Per2 [23]. Уровень белков Per регулируется несколькими факторами, обеспечивающими его стабильность и, по всей видимости, способность проникать в ядро. С другой стороны, фосфорилирование Per СКІє обеспечивает цитоплазматическую деградацию Per, не связанного с Cry (в отличие от фосфорилирования с помощью GSK3), предотвращая преждевременное накопление Per в цитоплазме. Белок Per менее стабилен при отсутствии Cry и может легко подвергаться убиквитинированию и протеасомной деградации [22].

Ортолог GSK3 y Drosophila, Shaggy (Sgg), играет центральную роль в определении длины циркадного периода у мух. Его мутация у дрозофилы вызывает удлинение периода циркадных часов, тогда как сверхэкспрессия - сокращает его [89]. Sgg фосфорилирует Tim (Timeless, аналог белка Cry у дрозофилы) и регулирует ядерную транслокацию гетеродимера Per/Tim [89]. Однако следует отметить, что и Tim, и mCry2 являются партнерами димеризации белков Per в часовых структурах мухи и мыши соответственно, и, вполне возможно, GSK3 вносит свой вклад в часовой механизм путем регулирования компонентов, которые действуют вместе с белками Per [24]. GSK3 фосфорилирует и регулирует стабильность основных (коровых) белков циркадного ритма (Bmall, Clock, Per, Cry, Reverba) у млекопитающих [25] (рис. 2).

Консервативность белков биоритмов и GSK3 на эволюционном древе. Используя базу данных Ensembl 100, мы проверили наличие ортологов у позвоночных, а также у дрозофилы Drosophila melanogaster и нематоды Caenorhabditis elegans для генов GSK3A (ENSG00000105723), GSK3B (ENSG0000082701), *CLOCK* (ENSG00000134852), CRY1 (ENSG0000008405), CRY2 (ENSG00000121671), а также BHLHE41 (DEC2) (ENSG00000123095) и NPAS1 (Neuronal PAS domain-containing) (ENSG00000130751) (в круглых скобках указан идентификатор гена у человека, согласно базе данных Ensembl). Эти гены кодируют белки, связанные с регуляцией биоритмов. Ген GSK3B весьма консервативен даже у беспозвоночных (при сравнении человека и нематоды идентичны 71,27% позиций), и он практически полностью идентичен у человека и макаки. Ген GSK3A не имеет ортологов у птиц, а также у некоторых рептилий и у химеры Callorhinchus *milii*. В частности, ортологичный для *GSK3A* ген не обнаружен у черепах Chelydra serpentina (каймановая черепаха), Terrapene carolina triunguis (каролинская коробчатая черепаха), Gopherus agassizii (пустынный западный гофер) и Gopherus

5 БИОХИМИЯ том 86 вып. 4 2021

evgoodei (черепаха Гуда). Ортологичный для NPAS1 ген не обнаружен у всех птиц и некоторых рептилий: змей Laticauda laticaudata (кольчатый плоскохвост), Notechis scutatus (тигровая змея) и Pseudonaja textilis (восточная коричневая змея); крокодила Crocodylus porosus (гребнистый крокодил); ящериц Anolis carolinensis (североамериканский красногорлый анолис), Podarcis muralis (обыкновенная стенная ящерица), Pogona vitticeps (бородатая агама), Salvator merianae (аргентинский чёрно-белый тегу) и Varanus komodoensis (комодский варан); черепах Chelydra serpentina (каймановая черепаха), Gopherus evgoodei (черепаха Гуда), Pelodiscus sinensis (дальневосточная черепаха) и Terrapene carolina triunguis (каролинская коробчатая черепаха). Также ортолог NPAS1 не найден у шпорцевой лягушки *Xenopus tropicalis.*

Гены GSK3B, CLOCK, CRY1, CRY2 и DEC2 имеют ортологи у большинства позвоночных. Даже у дрожжей Saccharomyces cerevisiae найдены два гена, ортологичные гену GSK3B, но не были найдены ортологи для остальных рассмотренных генов. У нематоды *С. elegans* не обнаружены ортологи для генов CRY1, CRY2 и DEC2, а у плодовой мушки D. melanogaster – для генов *CRY1* и *CRY2*. Белок Clock сравнительно плохо выравнивается против белков нематоды C. elegans и плодовой мушки D. melanogaster (идентичны 10-20% позиций). Таким образом, можно предположить, что основную функцию в регуляции суточных (циркадных) ритмов играет не GSK3α, которая отсутствует у большого числа видов (например, у птиц и многих рептилий), и нокаут которой не приводит к тяжелым нарушениям фенотипа, а GSK3^β, которая с небольшими различиями присутствует у животных на всех ступенях эволюционной лестницы, и нокаут которой приводит к эмбриональной летальности. Поскольку регуляция биоритмов имеется у всех животных (в том числе рептилий и птиц), дальше речь пойдет в основном о функции GSK3 β .

Препараты – ингибиторы GSK3. Литий. Показано, что ионы лития удлиняют период циркадных ритмов у многих видов, включая одноклеточные организмы, насекомых, мышей и людей [77, 90, 91]. Литий (в концентрации 1–10 мМ) ингибирует GSK3 β *in vitro* и *in vivo* у всех изученных видов [92–95]. Он снижает активность GSK3 β /Sgg и удлиняет период двигательной активности мух даже в постоянной темноте (без внешних световых активаторов) [96]. Литий в низких концентрациях (~1 мМ) действует в основном на амплитуду (предположительно, через GSK3 β), тогда как в более высоких концентрациях (~10 мМ) он способствует удлинению периода [97]. *SB415286.* Аналогичное дневное подавление наблюдали с другим ингибитором GSK3 (SB415286; 1 мМ), который уменьшает частоту спонтанных спайковых разрядов нейронов на 66% по сравнению с контролем [98].

Бензофуран-3-ил-(индол-3-ил)малеимиды. В настоящее время разработаны ингибиторы GSK3 β нового поколения (бензофуран-3-ил-(индол-3-ил)малеимиды), которые имеют значения IC₅₀ в диапазоне 4—680 нМ в отношении GSK3 β человека. Один из них (с IC₅₀, равной 67 ± 6 нМ) обладает приемлемой селективностью и растворимостью в дозе 10—29 мкг/кг. В экспериментах на мышах такие ингибиторы обладают антипсихотической активностью, аналогично литию и вальпроату, при лечении биполярного расстройства и других маниакально-депрессивных состояний [99].

Генетическая активация/инактивация GSK3. Ингибирующее фосфорилирование GSK3α и GSK3β в SCN меняется с 24-часовой периодичностью. У трансгенных мышей с мутациями по обеим формам GSK3 α/β (GSK3 $\alpha^{21A/21A}/\beta^{9A/9A}$), приводящим к их перманентной активации, нарушена ритмичность поведения, в том числе значительно снижена амплитуда ритма, удлинен активный период и увеличены периоды активности днем [100]. Сверхэкспрессия GSK3 ускоряет наступление пика экспрессии гена mPER2 примерно на 2 часа [48]. Генетическая инактивация обоих аллелей GSK3β в сочетании с делецией одного аллеля GSK3 в синхронно-осциллирующих эмбриональных фибробластах мыши (3/4 GSK $3\alpha/\beta$ KO MEF), наоборот, приводит к значительной задержке в периодичности эндогенного часового механизма, особенно в отношении циклической экспрессии Per2 [83]. Lavoie et al. [101] показали, что период циркадной двигательной активности у GSK3^{β+/-} мышей удлинен (23,83 \pm 0,05 ч) по сравнению с мышами WT (23,54 ± 0,10 ч). SB216763 (ингибитор GSK3 α /GSK3 β) сокращает период на 1,8 ч в концентрации 10 мкМ и на 7,3 ч – в концентрации 40 мкМ [102]. Подавление экспрессии GSK3β с помощью малой интерферирующей PHK (siRNA) или ингибиторами GSK3 (CHIR 99021 и 1-азакенпауллон) укорачивают период циркадного ритма [103]. Другой ингибитор GSK3 (кенпауллон, 25 мкМ) вызывает фазовую задержку транскрипции Per2 [83].

У трансгенных мышей synRas с конститутивно активированным V12-Ha-Ras в нейронах повышен уровень экспрессии GSK3β и снижено ингибирующее фосфорилирование GSK3β (по S9) в SCN. Наоборот, подавление активности Ras путем блокирования его функции антителами в осциллирующих клеточных культурах карциномы мочевого пузыря человека линии Т-24 снижает уровень белка GSK3β, увеличивает фосфорилирование GSK3β и удлиняет период активности промотора Bmal1 [104].

Активность GSK3^β является основной для поддержания циркадного двигательного поведения, необходимого для правильной организации сна и бодрствования. У трансгенных мышей со сверхэкспрессией GSK3β при неизменной общей продолжительности суточных периодов бодрствования, медленного (non-rapid eye movement, NREM) и быстрого (rapid eye movement, REM) сна увеличивалось число эпизодов каждого из этих периодов, т.е. циклы бодрствования и сна становились более фрагментарными [105]. Известно, что структура сна важна для адаптации и имеет большое эволюционное значение. Так, например, сон человека более эффективен по длине, глубине сна и числу быстрых фаз сна (REM) по сравнению со сном других приматов [106]. В целом обнаруженные изменения структурной организации циклов сна и бодрствования при суперэкспрессии GSK3β сходны с нарушениями, наблюдаемыми при маниакально-депрессивных и некоторых нейродегенеративных заболеваниях. По-видимому, успешное использование лития у маниакально-депрессивных больных основано именно на его ингибирующем действии в отношении GSK3β. Не исключено также, что эпизоды гиперактивности у таких больных объясняются влиянием GSK3β на дофамин- и серотонинергические системы мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Долгоживущие виды обычно обладают более совершенной/большой/мощной системой восстановления повреждений, в том числе антиоксидантной защиты. Еще Frolkis [107] предлагал системы, ответственные за репарацию и другие восстановительные процессы, называть системами антистарения (витаукта), так как они способствуют долголетию. При старении активность работы таких систем в базальных условиях (а также их способность реагировать на повреждения) обычно снижается. Соответственно, системы, снижающие/подавляющие работу систем антистарения, и/или системы, работа которых связана с развитием заболеваний (в том числе возрастных), клеточным старением или клеточной гибелью, будут относиться к программе старения [1, 108]. На основе антагонистической плейотропии постулируется наличие генов, усиливающих репродуктивный успех в молодом возрасте, несмотря на их отсроченные негативные эффекты в старости [108]. С возрастом активность таких систем может не только не снижаться, но даже увеличиваться. В частности, для упоминаемых в данной работе обеспечивающих убиквитин-зависимую протеасомную деградацию Nrf2 белков GSK3 и Keap1 показано увеличение их активности с возрастом [2], в то время как активность Nrf2 снижается. В совокупности, экспериментальные данные, рассмотренные в обзоре, показывают, что Nrf2 и GSK3 являются компонентами антагонистических и тесно взаимодействующих программ антистарения и старения соответственно [1].

Определенным устойчивым, но пластичным ритмом циркадной активности характеризуются не только белки, ответственные за биоритмы (в большинстве своем $T\Phi$), но и регулирующая их GSK3, а также антиоксидантная система, индуцируемая Nrf2, «дирижирующего» транскрипцией огромного количества белков, ответственных за антиоксидантную защиту клетки. Молекулярные часы обеспечивают регуляторный механизм, позволяющий организму готовиться и реагировать на ежедневные изменения внешней среды. Система Nrf2 индуцируется окислителями (электрофилами). При этом запускается синтез антиоксидантных/детоксифицирующих ферментов, защищающих клетку от повреждения. Однако гормон биоритмов, мелатонин, несмотря на то что сам обладает антиоксидантными свойствами, также индуцирует активацию Nrf2 [74], но не напрямую, а опосредованно. Это косвенно поддерживает представление о системе циркадных биоритмов как способствующей адаптации.

В случае Nrf2 ситуация осложняется существованием не только циркадных ритмов активности (т.е. колебаний во времени), но и пространственных, а именно осциллирующих ядерных и цитоплазматических пулов Nrf2. Более того, в качестве «дирижера» системы антиоксидантной защиты Nrf2 опосредует противодействие эффекту токсичных веществ и окислителей, влияя тем самым на упомянутую пластичность экспрессии циркадных белков (таблица).

GSK3, видимо, может считаться характерным представителем программ старения, так как, в отличие от Nrf2, активность GSK3 растет с возрастом как *in vivo*, так и *in vitro*, а также при патологиях. GSK3 участвует в самых разных метаболических путях, в том числе ассоциированных с возрастными болезнями (сахарный диабет второго типа, рак), а также нейродегенеративными патологиями. Кроме того, GSK3 участвует в клеточной гибели и воспалении. Ингибиторы GSK3 в настоящее время представляются перспективными терапевтическими целями для борьбы с этими заболеваниями.

Интерес к этой киназе в рамках нашей статьи продиктован ее регуляторным влиянием на Nrf2, осуществляемым, по меньшей мере, тремя способами: i) GSK3 напрямую связана с деградацией Nrf2, способствуя его убиквитинированию и протеасомной деградации (а не просто инактивации, как другие киназы); ii) GSK3 фосфорилирует Fyn-киназу, которая перемещается в ядро, модифицирует там Nrf2, после чего Nrf2 удаляется из ядра; и ііі) GSK3 фосфорилирует белки положительной ветви регуляции циркадных биоритмов Bmall и Clock, также вызывая их протеасомную деградацию, что снижает экспрессию Nrf2 (следует отметить, что в промоторах как генов негативных регуляторов биоритмов CRY1, CRY2 и Rev-erba, так и в самом гене Nfe2l2, кодирующем Nrf2, содержится Еbox, вследствие чего их транскрипция позитивно регулируется комплексом Clock/Bmal1 [23, 36]). Таким образом, система, работа которой подробно рассматривается в этой статье, опосредуемая GSK3 и β-TrCP, представляет собой «регулирующий клапан», который контролирует небольшие колебания уровня Nrf2, обеспечивая тонкую настройку ультрадианной и циркадной (Bmal1-опосредованной) регуляции Nrf2 [3, 36]. Вместе с данными о циркадной и Bmal1опосредованной регуляции Nrf2 это показывает, что Nrf2 и часовые гены образуют регуляторную петлю, которая интегрирует клеточные редокссигналы в циркадный ритм [37].

Эффекты фосфорилирования протеинкиназой GSK3 различных субстратов весьма разнообразны: изменение активности ферментов, локализации белков, взаимодействий между белками, а также стабильность белков [60]. Фосфорилирование белков GSK3 часто приводит к их последующему убиквитинированию и протеасомной деградации. Распознавание убиквитинированного белка протеасомой в случае с Nrf2, Cry2, Clock и Bmal1 происходит с помощью белка-адаптера, например β -TrCP [60]. Этому предшествует фосфорилирование того же самого белка другой киназой. Фосфорилирование белков с помощью GSK3 не всегда приводит к последующему расщеплению. Например, для негативных белков-регуляторов биоритмов Reverbα и Per2 фосфорилирование GSK3, наоборот, приводит к повышению стабильности. Сгу является единственным из негативных регуляторов циркадных биоритмов, фосфорилирование которого GSK3 приводит не к перемещению в ядро (как для Rev-erbα и Per), а к деградации (как для белков позитивной регуляции циркадных биоритмов Bmall и Clock). Существует предположение, что белок Сгу опосредует подстройку биологических часов под внешний

523

ритм освещенности, кроме всего прочего, являясь ингибитором транскрипции Рег и регулируя уровень белка Рег [22]. Таким образом, GSK3 взаимодействует с разными эффектами практически со всеми коровыми белками биоритмов (Bmall, Clock, Per, Cry, Rev-erba), влияя на длительность той или иной фазы, а также с Nrf2, регулируя антиоксидантный статус клетки [3, 15, 18, 25, 29–32, 36, 37, 89].

Генетические и молекулярные исследования показывают важность цепей обратной связи, регулируя тем самым уровень экспрессии генов. Через метаболизм NAD⁺ биоритмы связаны и с биоэнергетикой клетки. Показано, что NAD+зависимая деацетилаза SIRT1 с циркадной периодичностью связывается с комплексом Clock/Bmall и регулирует циркадные транскрипционные программы посредством деацетилирования основных белков часов (Bmall, Per2) и хроматин-ассоциированных белков [109, 110]. Окислительный стресс может вызывать перезапуск молекулярных часов [111]. Также изменяют ритмическое поведение и тканевые часы модуляции пентозофосфатного пути [112].

Изучение белков, находящихся на пересечении сигнальных и регуляторных путей, и сравнение их биохимическими и биоинформатическими методами у коротко- и долгоживущих видов позволяет выявлять молекулярные механизмы, лежащие в основе процессов и явлений, регулирующих тайминг онтогенеза (включая белки часов [20–25, 37, 113] и гормон эпифиза мелатонин, его предшественники и производные [69–75, 114]) и определяющих долголетие (включая острый и хронический феноптоз, неотению и т.д.) [7–9, 115], в том числе и потенциально возможное подавление «цитокинового шторма» при COVID-19 [116, 117].

Длительность периода клеточных часов точно настраивается с помощью сети передачи сигналов фосфорилирования, опосредованной множественными протеинкиназами, из которых наиболее универсальной, по крайней мере по количеству субстратов, является GSK3. Именно поэтому функция GSK3 представляется узловым пунктом перекрестной регуляции циркадных ритмов и антиоксидантной защиты, что и является основной темой этой статьи. Попытки воздействия на два пути (идущие от «Больших биологических часов» к системе Nrf2 на рис. 1) одновременно представлены, например, получением препарата, являющегося гибридом сульфорафана (известного активатора Nrf2) и мелатонина (регулятора суточных биоритмов) [118, 119], а также веществ, являющихся одновременно ингибиторами GSK3 и активаторами Nrf2 (2,4-дигидропирано[2,3-с]пиразолов) [120]. Можно предположить, что подобные препараты в перспективе могут быть использованы не только для лечения нейродегенеративных патологий, но и для увеличения продолжительности здоровой жизни и долголетия.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-13037).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе не было никаких исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Skulachev, V. P., Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Popov, N. A., Markov, A. V, et al. (2020) Perspectives of *Homo* sapiens lifespan extension: focus on external or internal resources? *Aging (Albany NY)*, **12**, 5566-5584, doi: 10.18632/aging.102981.
- Lewis, K. N., Wason, E., Edrey, Y. H., Kristan, D. M., Nevo, E., and Buffenstein, R. (2015) Regulation of Nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 3722-3727, doi: 10.1073/ pnas.1417566112.
- Cuadrado, A. (2015) Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3/β-TrCP, *Free Radic. Biol. Med.*, 88, 147-157, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.029.
- Skulachev, M. V., Severin, F. F., and Skulachev, V. P. (2015) Aging as an evolvability-increasing program which can be switched off by organism to mobilize additional resources for survival, *Curr. Aging Sci.*, **8**, 95-109, doi: 10.2174/ 1874609808666150422122401.

- 5. Galimov, E. R., Lohr, J. N., and Gems, D. (2019) When and how can death be an adaptation? *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1433-1437, doi: 10.1134/S0006297919120010.
- Duan, W. S., Zhang, R. Y., Guo, Y. S., Jiang, Y. F., Huang, Y. L., et al. (2009) Nrf2 activity is lost in the spinal cord and its astrocytes of aged mice, *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 45, 388-397, doi: 10.1007/s11626-009-9194-5.
- Skulachev, V. P., Holtze, S., Vyssokikh, M. Y., Bakeeva, L. E., Skulachev, M. V., et al. (2017) Neoteny, prolongation of youth: from naked mole rats to "naked apes" (humans), *Physiol. Rev.*, 97, 699-720, doi: 10.1152/physrev.00040.2015.
- Skulachev, V. P. (2019) Phenoptosis as a phenomenon widespread among many groups of living organisms including mammals [Commentary to the paper by E. R. Galimov, J. N. Lohr, and D. Gems (2019), *Biochemistry* (*Moscow*), 84, 1433-1437], *Biochemistry* (*Moscow*), 84, 1438-1441, doi: 10.1134/S0006297919120022.
- 9. Vyssokikh, M. Y., Holtze, S., Averina, O. A, Lyamzaev, K. G., Panteleeva, A. A., et al. (2020) Mild depolarization

of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 6491-6501, doi: 10.1073/pnas.1916414117.

- Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., et al. (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription, *Nat. Commun.*, 7, 11624, doi: 10.1038/ncomms11624.
- Aw Yeang, H. X., Hamdam, J. M., Al-Huseini, L. M., Sethu, S., Djouhri, L., et al. (2012) Loss of transcription factornuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) leads to dysregulation of immune functions, redox homeostasis, and intracellular signaling in dendritic cells, *J. Biol. Chem.*, 287, 10556-10564, doi: 10.1074/jbc. M111.322420.
- He, X., Kan, H., Cai, L., and Ma, Q. (2009) Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 46, 47-58, doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.10.007.
- Xu, S. F., Ji, L. L., Wu, Q., Li, J., and Liu, J. (2018) Ontogeny and aging of Nrf2 pathway genes in livers of rats, *Life Sci.*, 203, 99-104, doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.018.
- 14. Levy, S., and Forman, H. J. (2010) C-Myc is a Nrf2-interacting protein that negatively regulates phase II genes through their electrophile responsive elements, *IUBMB Life*, **62**, 237-246, doi: 10.1002/iub.314.
- Tebay, L. E., Robertson, H., Durant, S. T., Vitale, S. R., Penning, T. M., and Dinkova-Kostova, A. T. (2015) Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease, *Free Radic. Biol. Med.*, 88, 108-146, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.021.
- Jain, A. K., and Jaiswal, A. K. (2007) GSK3β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2, *J. Biol. Chem.*, 282, 16502-16510, doi: 10.1074/jbc.M611336200.
- Huang, H. C., Nguyen, T., and Pickett, C. B. (2000) Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 12475-12480, doi: 10.1073/pnas.220418997.
- Tong, K. I., Kobayashi, A., Katsuoka, F., and Yamamoto, M. (2006) Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism, *Biol. Chem.*, 387, 1311-1320, doi: 10.1515/BC.2006.164.
- Bonaconsa, M., Malpeli, G., Montaruli, A., Carandente, F., Grassi-Zucconi, G., and Bentivoglio, M. (2014) Differential modulation of clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus, liver and heart of aged mice, *Exp. Gerontol.*, 5, 70-79, doi: 10.1016/j.exger.2014.03.011.
- Bunger, M. K., Wilsbacher, L. D., Moran, S. M., Clendenin, C., Radcliffe, L. A., et al. (2000) Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals, *Cell*, **103**, 1009-1017, doi: 10.1016/s0092-8674(00)00205-1.
- Wijnen, H., and Young, M. W. (2006) Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms, *Annu. Rev. Genet.*, 40, 409-448, doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090603.
- Okamura, H. (2003) Integration of mammalian circadian clock signals: from molecule to behavior, *J. Endocrinol.*, 177, 3-6, doi: 10.1677/joe.0.1770003.
- 23. Kennaway, D. J. (2005) The role of circadian rhythmicity in reproduction, *Hum. Reprod. Update*, **11**, 91-101, doi: 10.1093/humupd/dmh054.
- Harada, Y., Sakai, M., Kurabayashi, N., Hirota, T., and Fukada, Y. (2005) Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta, *J. Biol. Chem.*, 280, 31714-3172110, doi: 1074/jbc.M506225200.

- Alessandro, M. S., Golombek, D. A., and Chiesa, J. J. (2019) Protein kinases in the photic signaling of the mammalian circadian clock, *Yale J. Biol. Med.*, 92, 241-250.
- Morgunova, G. V., and Klebanov, A. A. (2019) Age-related AMP-activated protein kinase alterations: from cellular energetics to longevity, *Cell Biochem. Funct.*, 37, 169-176, doi: 10.1002/cbf.3384.
- Suter, D. M., and Schibler, U. (2009) Physiology. Feeding the clock, *Science*, **326**, 378-379, doi: 10.1126/science. 1181278.
- Xue, M., Momiji, H., Rabbani, N., Bretschneider, T., Rand, D. A., and Thornalley, P. J. (2015) Frequency modulated translocational oscillations of Nrf2, a transcription factor functioning like a wireless sensor, *Biochem. Soc. Trans.*, 43, 669-673, doi: 10.1042/BST20150060.
- Lo, S. C., and Hannink, M. (2008) PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria, *Exp. Cell Res.*, **314**, 1789-1803, doi: 10.1016/j.yexcr. 2008.02.014.
- Theodore, M., Kawai, Y., Yang, J., Kleshchenko, Y., Reddy, S. P., Villalta, F., and Arinze, I. J. (2008) Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2, *J. Biol. Chem.*, 283, 8984-8994, doi: 10.1074/jbc.M709040200.
- Chowdhry, S., Zhang, Y., McMahon, M., Sutherland, C., Cuadrado, A., and Hayes, J. D. (2013) Nrf2 is controlled by two distinct beta-TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity, *Oncogene*, **32**, 3765-3781, doi: 10.1038/onc.2012.388.
- Rada, P., Rojo, A. I., Chowdhry, S., McMahon, M., Hayes, J. D., and Cuadrado, A. (2011) SCF/{beta}-TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner, *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 1121-1133, doi: 10.1128/ MCB. 01204-10.
- Baird, L., Llères, D., Swift, S., and Dinkova-Kostova, A. T. (2013). Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 15259-15264, doi: 10.1073/pnas.1305687110.
- 110, 15259-15264, doi: 10.1073/pnas.1305687110.
 24. Pekovic-Vaughan, V., Gibbs, J., Yoshitane, H., Yang, N., Pathiranage, D., et al. (2014) The circadian clock regulates rhythmic activation of the NRF2/glutathione-mediated antioxidant defense pathway to modulate pulmonary fibrosis, *Genes Dev.*, 28, 548-560, doi: 10.1101/gad. 237081.113.
- Xu, Y.Q., Zhang, D., Jin, T., Cai, D. J., Wu, Q., et al. (2012) Diurnal variation of hepatic antioxidant gene expression in mice, *PLoS One*, 7, e44237, doi: 10.1371/ journal.pone. 0044237.
- Early, J. O., Menon, D., Wyse, C. A., Cervantes-Silva, M. P., Zaslona, Z., et al. (2018) Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1β in macrophages via NRF2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 8460-8468, doi: 10.1073/pnas. 1800431115.
- Wible, R. S, Ramanathan, C., Sutter, C. H., Olesen, K. M., Kensler, T. W., et al. (2018) NRF2 regulates core and stabilizing circadian clock loops, coupling redox and timekeeping in *Mus musculus*, *Elife*, 7, e31656, doi: 10.7554/eLife.31656.
 Spiers, J. G., Breda, C., Robinson, S., Giorgini, F., and
- Spiers, J. G., Breda, C., Robinson, S., Giorgini, F., and Steinert, J. R. (2019) Drosophila Nrf2/Keap1 mediated redox signaling supports synaptic function and longevity and impacts on circadian activity, *Front. Mol. Neurosci.*, 12, 86, doi: 10.3389/fnmol.2019.00086.
- Hansen, J. M., Watson, W. H., and Jones, D. P. (2004) Compartmentation of Nrf2 redox control: regulation of cytoplasmic activation by glutathione and DNA binding by thioredoxin-1, *Toxicol. Sci.*, 82, 308-317, doi: 10.1093/ toxsci/kfh231.

- Embi, N., Rylatt, D. B., and Cohen, P. (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase, *Eur. J. Biochem.*, **107**, 519-527, doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb06059.x.
- Doble, B. W., and Woodgett, J. R. (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase, *J. Cell. Sci.*, **116**, 1175-1186, doi: 10.1242/jcs.00384.
- Mukai, F., Ishiguro, K., Sano, Y., and Fujita, S. C. (2002) Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta, *J. Neurochem.*, **81**, 1073-1083, doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00918.x.
- Souder, D. C., and Anderson, R. M. (2019) An expanding GSK3 network: Implications for aging research, *GeroScience*, 41, 369-382, doi: 10.1007/s11357-019-00085-z.
- Yang, K., Chen, Z., Gao, J., Shi, W., Li, L., et al. (2017) The key roles of GSK-3beta in regulating mitochondrial activity, *Cell. Physiol. Biochem.*, 44, 1445-1459, doi: 10.1159/000485580.
- Jaworski, T., Banach-Kasper, E., and Gralec, K. (2019) GSK-3β at the intersection of neuronal plasticity and neurodegeneration, *Neural Plast.*, **2019**, 4209475, doi: 10.1155/2019/4209475.
- Alt, J. R. (2000) Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation, *Genes Dev.*, 14, 3102-3114, doi: 10.1101/ gad.854900.
- Morfini, G., Szebenyi, G., Elluru, R., Ratner, N., and Brady, S. T. (2002) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesinbased motility, *EMBO J.*, 21, 281-293, doi: 10.1093/ emboj/21.3.281.
- Iitaka, C., Miyazaki, K., Akaike, T., and Ishida, N. (2005) A role for glycogen synthase kinase-3β in the mammalian circadian clock, *J. Biol. Chem.*, 280, 29397-29402, doi: 10.1074/jbc.M503526200.
- Krishnankutty, A., Kimura, T., Saito, T., Aoyagi, K., Asada, A., et al. (2017) *In vivo* regulation of glycogen synthase kinase 3β activity in neurons and brains, *Sci. Rep.*, 7, 8602, doi: 10.1038/s41598-017-09239-5.
- Kaidanovich-Beilin, O., and Woodgett, J. R. (2011) GSK3: functional insights from cell biology and animal models, *Front. Mol. Neurosci.*, 4, 40, doi: 10.3389/ fnmol.2011.00040.
- Lesort, M., Jope, R. S., and Johnson, G. V. (1999) Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase, *J. Neurochem.*, **72**, 576-584, doi: 10.1046/j.1471-4159. 1999.0720576.x.
- Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Marion, S., Lefkowitz, R. J., et al. (2011) An Akt/β-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior, *Cell*, **122**, 261-273, doi: 10.1016/j.cell.2005. 05.012.
- Thornton, T. M., Pedraza-Alva, G., Deng, B., and Wood, C. D., Aronshtam, A., et al. (2008) Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation, *Science*, **320**, 667-670, doi: 10.1126/science. 1156037.
- 54. Zmijewski, J. W., and Jope, R. S. (2004) Nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 during replicative senescence of human fibroblasts, *Aging Cell*, 3, 309-317, doi: 10.1111/j.1474-9728.2004.00117.x.
- Iwahana, E., Hamada, T., Uchida, A., and Shibata, S. (2007) Differential effect of lithium on the circadian oscillator in young and old hamsters, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354, 752-756, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.042.
- Hoshi, M., Takashima, A., Noguchi, K., Murayama, M., Sato, M., et al. (1996) Regulation of mitochondrial pyru-

vate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2719-2723, doi: 10.1073/pnas.93.7.2719.

- Salcedo-Tello, P., Ortiz-Matamoros, A., and Arias, C. (2011) GSK3 function in the brain during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration, *Int. J. Alzheimers Dis.*, **11**, 1-12, doi: 10.4061/2011/189728.
- Martin, M., Rehani, K., Jope, R. S., and Michalek, S. M. (2005) Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3, *Nat. Imunnol.*, 6, 777-784, doi: 10.1038/ni1221.
- 59. Sutherland, C. (2011) What are the *bona fide* GSK3 substrates? *Int. J. Alzheimers Dis.*, **2011**, 505-607, doi: 10.4061/2011/505607.
- Robertson, H., Hayes, J. D., and Sutherland, C. A. (2018) A partnership with the proteasome; the destructive nature of GSK3, *Biochem. Pharmacol.*, 147, 77-92, doi: 10.1016/ j.bcp.2017.10.016.
- 61. Jin, J., Cardozo, T., Lovering, R. C., Elledge, S. J., Pagano, M., and Harper, J. W. (2004) Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins, *Genes Dev.*, **18**, 2573-2580, doi: 10.1101/gad.1255304.
- 62. Siepka, S. M., Yoo, S. H., Park, J., Song, W., Kumar, V., et al. (2007) Circadian mutant overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression, *Cell*, **129**, 1011-1023, doi: 10.1016/j.cell.2007. 04.030.
- Godinho, S. I., Maywood, E. S., Shaw, L., Tucci, V., Barnard, A. R., et al. (2007) The after-hours mutant reveals a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period, *Science*, **316**, 897-900, doi: 10.1126/science.1141138.
- Shirogane, T., Jin, J., Ang, X. L., and Harper, J. W. (2005) SCFβ-TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein, *J. Biol. Chem.*, 280, 26863-26872, doi: 10.1074/jbc.M502862200.
- 65. Najumuddin, Fakhar, M., Gul, M., and Rashid, S. (2018) Interactive structural analysis of βTrCP1 and PER2 phosphoswitch binding through dynamics simulation assay, *Arch. Biochem. Biophys.*, 651, 34-42, doi: 10.1016/j.abb. 2018.05.020.
- Cole, A., Frame, S., and Cohen, P. (2004) Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event, *Biochem. J.*, 377, 249-255, doi: 10.1042/BJ20031259.
- Beurel, E., Grieco, S. F., and Jope, R. S. (2015) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases, *Pharmacol. Ther.*, 148, 114-131, doi: 10.1016/ j.pharmthera.2014.11.016.
- Tsuchiya, Y., Taniguchi, H., Ito, Y., Morita, T., Karim, M. R., and Ohtake, N. (2013) The casein kinase 2-NRF1 axis controls the clearance of ubiquitinated proteins by regulating proteasome gene expression, *Mol. Cell. Biol.*, 33, 3461-3472, doi: 10.1128/MCB.01271-12.
- Zee, P. C., Attarian, H., and Videnovic, A. (2013) Circadian rhythm abnormalities, *Continuum (Minneap. Minn)*, 19, 132-147, doi: 10.1212/01.CON.0000427209.21177.aa.
- Patel, S. A., Velingkaar, N. S., and Kondratov, R. V. (2014) Transcriptional control of antioxidant defense by the circadian clock, *Antioxid. Redox Signal.*, 20, 2997-3006, doi: 10.1089/ars.2013.5671.
- Golombek, D. A., and Rosenstein, R. E. (2010) Physiology of circadian entrainment, *Physiol. Rev.*, **90**, 1063-1102, doi: 10.1152/physrev.00009.2009.
- Oosthuizen, M. K., Bennett, N. C., and Cooper, H. M. (2005) Fos expression in the suprachiasmatic nucleus in response to light stimulation in a solitary and social species of African mole-rat (family Bathyergidae), *Neuroscience*, 133, 555-560, doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.01.017.

- Slominski, R. M., Reiter, R. J., Schlabritz-Loutsevitch, N., Ostrom, R. S., and Slominski, A. T. (2012) Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 351, 152-166, doi: 10.1016/j.mce.2012.01.004.
- 74. Fang, J., Yan, Y., Teng, X., Wen, X., Li, N., et al. (2018) Melatonin prevents senescence of canine adipose-derived mesenchymal stem cells through activating Nrf2 and inhibiting ER stress, *Aging (Albany NY)*, **10**, 2954-2972, doi: 10.18632/aging.101602.
- Slominski, A. T., Zmijewski, M. A., and Jetten, A. M. (2016) RORα is not a receptor for melatonin (response to DOI: 10.1002/bies.201600018), *Bioessays*, 38, 1193-1194, doi: 10.1002/bies.201600204.
- Fang, N., Hu, C., Sun, W., Xu, Y., Gu, Y., et al. (2020) Identification of a novel melatonin-binding nuclear receptor: vitamin D receptor, *J. Pineal. Res.*, 68, e12618, doi: 10.1111/jpi.12618.
- 77. Iwahana, E., Akiyama, M., Miyakawa, K., Uchida, A., Kasahara, J., et al. (2004) Effect of lithium on the circadian rhythms of locomotor activity and glycogen synthase kinase-3 protein expression in the mouse suprachiasmatic nuclei, *Eur. Neurosci.*, **19**, 2281-2287, doi: 10.1111/j.0953-816X.2004.03322.x.
- Besing, R. C., Paul, J. R., Hablitz, L. M., Rogers, C. O., Johnson, R. L., et al. (2015) Circadian rhythmicity of active GSK3 isoforms modulates molecular clock gene rhythms in the suprachiasmatic nucleus, *Biol. Rhythms*, 30, 155-160, doi: 10.1177/0748730415573167.
- Paul, J. R., McKeown, A. S., Davis, J. A., Totsch, S. K., Mintz, E. M., et al. (2017) Glycogen synthase kinase 3 regulates photic signaling in the suprachiasmatic nucleus, *Eur. J. Neurosci.*, 45, 1102-1110, doi: 10.1111/ejn.13549.
- Červená, K., Pačesová, D., Spišská, V., and Bendová, Z. (2015) Delayed effect of the light pulse on phosphorylated ERK1/2 and GSK3β Kinases in the ventrolateral suprachiasmatic nucleus of rat, *Mol. Neurosci.*, **56**, 371-376, doi: 10.1007/s12031-015-0563-0.
- Besing, R. C., Rogers, C. O., Paul, J. R., Hablitz, L. M., Johnson, R. L., et al. (2017) GSK3 activity regulates rhythms in hippocampal clock gene expression and synaptic plasticity, *Hippocampus*, 27, 890-898, doi: 10.1002/ hipo.22739.
- Top, D., Harms, E., Syed, S., Adams, E. L., and Saez, L. (2016) GSK-3 and CK2 kinases converge on timeless to regulate the master clock, *Cell Rep.*, 16, 357-367, doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.005.
- Kaladchibachi, S. A., Doble, B., Anthopoulos, N., Woodgett, J. R., and Manoukian, A. S. (2007) Glycogen synthase kinase 3, circadian rhythms, and bipolar disorder: a molecular link in the therapeutic action of lithium, *J. Circadian Rhythms*, 5, 3, doi: 10.1186/1740-3391-5-3.
- Leloup, J. C., and Goldbeter, A. (2011) Modelling the dual role of Per phosphorylation and its effect on the period and phase of the mammalian circadian clock, *IET Syst. Biol.*, 5, 44, doi: 10.1049/iet-syb.2009.0068.
- Kurabayashi, N., Hirota, T., Sakai, M., Sanada, K., and Fukada, Y. (2010) DYRK1A and glycogen synthase kinase 3beta, a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping, *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 1757-1768, doi: 10.1128/MCB.01047-09.
- Sahar, S., Zocchi, L., Kinoshita, C., Borrelli, E., and Sassone-Corsi, P. (2010) Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3beta-mediated phosphorylation, *PLoS One*, 5, e8561, doi: 10.1371/journal. pone.0008561.
- Spengler, M. L., Kuropatwinski, K. K., Schumer, M., and Antoch, M. P. (2009) A serine cluster mediates BMAL1dependent CLOCK phosphorylation and degradation, *Cell Cycle*, 8, 4138-4146, doi: 10.4161/cc.8.24.10273.

- Yin, L., Wang, J., Klein, P. S., and Lazar, M. A. (2006) Nuclear receptor Rev-erbalpha is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock, *Science*, **311**, 1002-1005, doi: 10.1126/science.1121613.
- Martinek, S., Inonog, S., Manoukian, A. S., and Young, M. W. (2001) A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock, *Cell*, 105, 769-779, doi: 10.1016/s0092-8674(01)00383-x.
- 90. Li, J., Lu, W. Q., Beesley, S., Loudon, A. S., and Meng, Q. J. (2012) Lithium impacts on the amplitude and period of the molecular circadian clockwork, *PLoS One*, 7, e33292, doi: 10.1371/journal.pone.0033292.
- 91. Sawai, Y., Okamoto, T., Muranaka, Y., Nakamura, R., Matsumura, R., et al. (2019) *In vivo* evaluation of the effect of lithium on peripheral circadian clocks by realtime monitoring of clock gene expression in near-freely moving mice, *Sci. Rep.*, **9**, 10909, doi: 10.1038/s41598-019-47053-3.
- 92. Jope, R. S. (2003) Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol. Sci.*, 24, 441-443, doi: 10.1016/S0165-6147(03)00206-2.
- Freland, L., and Beaulieu J. M. (2012) Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks, *Front. Mol. Neurosci.*, 5, 14, doi: 10.3389/fnmol.2012. 00014.
- 94. Siebel, A. M., Vianna, M. R., and Bonan, C. D. (2014) Pharmacological and toxicological effects oflithium in zebrafish, ACS Chem. Neurosci., 5, 468-476, doi: 10.1021/ cn500046h.79.
- Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., et al. (2014) Lithium salts – simple but magic, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 740-749, doi: 10.1134/S0006297914080021.
- 96. Padiath, Q. S, Paranjpe, D., Jain, S., and Sharma, V. K. (2004) Glycogen synthase kinase 3beta as a likely target for the action of lithium on circadian clocks, *Chronobiol. Int.*, 21, 43-55, doi: 10.1081/cbi-120027981.
- 97. Wei, H., Landgraf, D., Wang, G., and McCarthy, M. J. (2018) Inositol polyphosphates contribute to cellular circadian rhythms: Implications for understanding lithium's molecular mechanism, *Cell. Signal.*, 44, 82-91, doi: 10.1016/j.cellsig.2018.01.001.
- 98. Paul, J. R., DeWoskin, D., McMeekin, L. J., Cowell, R. M., Forger, D. B., and Gamble, K. L. (2016) Regulation of persistent sodium currents by glycogen synthase kinase 3 encodes daily rhythms of neuronal excitability, *Nat. Commun.*, 7, 13470, doi: 10.1038/ncomms13470.
- 99. Kozikowski, A. P., Gunosewoyo, H., Guo, S., Gaisina, I. N., Walter, R. L., et al. (2011) Identification of a glycogen synthase kinase-3β inhibitor that attenuates hyperactivity in CLOCK mutant mice, *ChemMedChem*, 6, 1593-1602, doi: 10.1002/cmdc.201100188.
- 100. Paul, J. R., Johnson, R. L., Jope, R. S., and Gamble, K. L. (2012) Disruption of circadian rhythmicity and suprachiasmatic action potential frequency in a mouse model with constitutive activation of glycogen synthase kinase 3, *Neuroscience*, **226**, 1-9, doi: 10.1016/j.neuroscience. 2012.08.047.
- 101. Lavoie, J., Hébert, M., and Beaulieu, J. M. (2013) Glycogen synthase kinase-3β haploinsufficiency lengthens the circadian locomotor activity period in mice, *Behav. Brain Res.*, 253, 262-265, doi: 10.1016/j.bbr.2013. 08.001.
- 102. Kon, N., Sugiyama, Y., Yoshitane, H., Kameshita, I., and Fukada, Y. (2015) Cell-based inhibitor screening identifies multiple protein kinases important for circadian clock oscillations, *Commun. Integr. Biol.*, 8, e982405, doi: 10.4161/19420889.2014.982405.
- 103. Hirota, T., Lewis, W. G., Liu, A. C., Lee, J. W., Schultz, P. G., and Kay, S. A. (2008) A chemical biology approach

reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of GSK-3beta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 20746-2075, doi: 10.1073/pnas. 0811410106.

- 104. Serchov, T., Jilg, T., Radtke, I., Stehle, J. H., and Heumann, R. (2016) Ras activity oscillates in the mouse suprachiasmatic nucleus and modulates circadian clock dynamics, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 1843-1855, doi: 10.1007/ s12035-015-9135-0.
- Ahnaou, A., and Drinkenburg, W. H. (2011) Disruption of glycogen synthase kinase-3-beta activity leads to abnormalities in physiological measures in mice, *Behav. Brain Res.*, 221, 246-252, doi: 10.1016/j.bbr.2011.03.004.
 Samson, D. R., and Nunn, C. L. (2015) Sleep intensity
- 106. Samson, D. R., and Nunn, C. L. (2015) Sleep intensity and the evolution of human cognition, *Evol. Anthropol.*, 24, 225-237, doi: 10.1002/evan.21464.
- Frolkis, V. V. (1982) *Aging and Life-Prolonging Processes*, Springer Verlag, Wien, New York.
 Williams, G. C. (1957) Pleiotropy, natural selection and
- 108. Williams, G. C. (1957) Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence, *Evolution*, **11**, 398-411, doi: 10.1111/j.1558-5646.1957.tb02911.x.
- Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., et al. (2008) SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation, *Cell*, 134, 317-328, doi: 10.1016/j.cell.2008.06.050.
 Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S.,
- 110. Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., et al. (2008) The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control, *Cell*, **134**, 329-340, doi: 10.1016/j.cell.2008.07.002.
- 111. Tamaru, T., Hattori, M., Ninomiya, Y., Kawamura, G., Varès, G., et al. (2013) ROS stress resets circadian clocks to coordinate pro-survival signals, *PLoS One*, 8, e82006, doi: 10.1371/journal.pone.0082006.
- 112. Rey, G., Valekunja, U. K., Feeney, K. A., Wulund, L., Milev, N. B., et al. (2016) The pentose phosphate pathway

regulates the circadian clock, *Cell Metab.*, **24**, 462-473, doi: 10.1016/j.cmet.2016.07.024.

- 113. Young, M. W., and Kay, S. A. (2001) Time zones: a comparative genetics of circadian clocks, *Nat. Rev. Genet.*, 2, 702-715, doi: 10.1038/35088576.
- 114. Chaban, A. K., and Voronezhskaya, E. E. (2008) Involvement of transient larval neurons in osmoregulation and neurogenesis in the freshwater snails, *Lymnaea stagnalis* and *Helisoma trivolvis, Acta Biol. Hung.*, **59** (Suppl.), 123-126, doi: 10.1556/ABiol.59.2008.Suppl.20.
- 115. Dilman, V. M. (1986) Ontogenetic model of ageing and disease formation and mechanisms of natural selection, *J. Theor. Biol.*, **118**, 73-81, doi: 10.1016/S0022-5193(86)80009-1.
- 116. Zinovkin, R. A., and Grebenchikov, O. A. (2020) Transcription factor Nrf2 as a potential therapeutic target for prevention of cytokine storm in COVID-19 patients, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 833-837, doi: 10.1134/ s00062920070111.
- 117. Cuadrado, A., Pajares, M., Benito, C., Jiménez-Villegas, J., Escoll, M., et al. (2020) Can activation of NRF2 be a strategy against COVID-19? *Trends Pharmacol. Sci.*, **41**, 598-610, doi: 10.1016/j.tips.2020.07.003.
- 118. Egea, J., Buendia, I., Parada, E., Navarro, E., Cuadrado, P., et al. (2015) Melatonin-sulforaphane hybrid ITH12674 induces neuroprotection in oxidative stress conditions by a "drug-prodrug" mechanism of action, *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 1807-1821, doi: 10.1111/bph.13025.
- 119. Cecon, E., Oishi, A., and Jockers, R. (2018) Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias, *Br. J. Pharmacol.*, **175**, 3263-3280, doi: 10.1111/bph.13950.
- 120. Gameiro, I., Michalska, P., Tenti, G., Cores, Á., Buendia, I., et al. (2017) Discovery of the first dual GSK3β inhibitor/Nrf2 inducer. A new multitarget therapeutic strategy for Alzheimer's disease, *Sci. Rep.*, 7, 45701, doi: 10.1038/srep45701.

A CROSSTALK BETWEEN THE BIORHYTHMS AND GATEKEEPERS OF LONGEVITY: TWO AFFILIATIONS OF GLYCOGEN SYNTHASE KINASE-3

Review

G. A. Shilovsky^{1,2,3*}, T. S. Putyatina², G. V. Morgunova², A. V. Seliverstov³, V. V. Ashapkin¹, E. V. Sorokina², A. V. Markov², and V. P. Skulachev¹

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: gregory_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

³ Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, 127051 Moscow, Russia

This review discusses genetic and molecular pathways that link circadian timing with metabolism, resulting in the emergence of positive and negative regulatory feedback loops. The Nrf2 pathway is believed to be a component of the antiaging program responsible for the healthspan and longevity. Nrf2 enables stress adaptation by activating cell antioxidant defense and other metabolic processes via control of expression of over 200 target genes in response to various types of stress. The GSK3 system represents a "regulating valve" that controls fine oscillations in the Nrf2 level, unlike Keap1, which prevents significant changes in the Nrf2 content in the absence of oxidative stress and which is inactivated by the oxidative stress. Furthermore, GSK3 modifies core circadian clock proteins (Bmal1, Clock, Per, Cry, and Rev-erb α). Phosphorylation by GSK3 leads to the inactivation and degradation of circadian rhythm-activating proteins (Bmal1 and Clock) and *vice versa* to the activation and nuclear translocation of proteins suppressing circadian rhythms (Per and Rev-erb α) with the exception of Cry protein, which is likely to be implicated in the fine tuning of biological clock. Functionally, GSK3 appears to be one of the hubs in the cross-regulation of circadian rhythms and antioxidant defense. Here, we present the data on the crosstalk between the most powerful cell antioxidant mechanism, the Nrf2 system, and the biorhythm-regulating system in mammals, including the impact of GSK3 overexpression and knockout on the Nrf2 signaling. Understanding the interactions between the regulatory cascades linking homeostasis maintenance and cell response to oxidative stress will help in elucidating molecular mechanisms that underlie aging and longevity.

Keywords: GSK3, Nrf2, oxidative stress, aging, biological rhythms, aging and antiaging programs, antioxidants
УДК 577.2

МИКРОБНЫЙ АРСЕНАЛ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ЗАЩИТЫ. ГЛАВА II Обзор

© 2021 А.Б. Исаев^{1*}, О.С. Мушарова^{1,2}, К.В. Северинов^{1,3*}

¹ Сколковский институт науки и технологий, 143028 Москва, Россия; электронная почта: tcft18@gmail.com ² Институт молекулярной генетики РАН, 119334 Москва, Россия

³ Waksman Institute of Microbiology, Piscataway, NJ 08854, USA; e-mail: severik@waksman.rutgers.edu

Поступила в редакцию 30.08.2020 После доработки 29.01.2021 Принята к публикации 29.01.2021

Бактериофаги, или фаги, представляют собой вирусы, которые инфицируют бактериальные клетки (в рамках этого обзора мы также рассмотрим вирусы, которые инфицируют архей). Постоянная угроза заражения фагами является одной из основных движущих сил эволюции бактериальных геномов. Чтобы противостоять инфекции, бактерии выработали многочисленные защитные стратегии, позволяющие избежать распознавания фагами или прямо препятствующие размножению фагов внутри клетки. Исследования бактериофагов и бактериальных систем защиты были исторически тесно переплетены с развитием методов классической молекулярной биологии и генной инженерии. В настоящее время благодаря распространению фаговой терапии, широкому применению технологий CRISPR-Cas и развитию биоинформатических подходов, которые облегчают задачу обнаружения новых систем, исследования в области биологии фагов переживают возрождение. В настоящем обзоре описываются различные стратегии, используемые микробами для того, чтобы противостоять фаговой инфекции. Вторая глава посвящена системам адаптивного иммунитета, механизмам абортивной инфекции, защитным системам, связанным с мобильными генетическими элементами, и новым системам, которые были открыты в последние годы с помощью метагеномного майнинга.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бактериофаги, иммунные системы, CRISPR-Cas, абортивная инфекция, токсин-антитоксин, PICI, прокариотический белок Argonaute, CBASS.

DOI: 10.31857/S0320972521040060

введение

В первой главе обзора были рассмотрены стратегии, позволяющие клеткам-хозяевам избегать распознавания фагами, механизмы врождённого иммунитета, блокирующие ранние стадии инфекции, а также системы защиты, использующие химические модификации для различения собственных и чужеродных молекул ДНК. В этой главе мы продолжим описание разнообразия микробных противовирусных систем.

CRISPR-Cas СИСТЕМЫ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА

В отличие от систем врождённого иммунитета, основанных на модификации ДНК, в которых распознавание мишени зависит от взаимо-

* Адресат для корреспонденции.

Принятые сокращения: CRISPR-Cas – кластеризованные регулярно прерываемые повторы и ассоциированные с ними белки (Clustered Regularly Interspaced Repeats and CRISPR-associated proteins); PAM – мотив, смежный с протоспейсером (Protospacer Adjacent Motif); HEPN – нуклеотид-связывающий домен, характерный для высших эукариот и прокариот (Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding domain); R-M – рестрикция-модификация (Restriction-Modification); MGE – мобильный генетический элемент; pAgo – прокариотический белок Argonaute (Prokaryotic Argonaute); Abi – абортивная инфекция; TA – токсин-антитоксин; RTase – обратная транскриптаза; CBASS – антифаговая сигнальная система на основе циклических олигонуклеотидов (Cyclic-Oligonucleotide-Based Anti-Phage Signalling System); cGAMP – циклический гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфат (Cyclic Guanosine Monophosphate– Adenosine Monophosphate); CD-NTase – cGAS/DncV-подобная нуклеотидил-трансфераза (cGAS/DncV-like Nucleotidy] Transferase); Cap – белок, ассоциированный с CD-NTase (CD-NTase associated protein); DUF – домен с неизвестной функцией (Domain of Unknown Function); PICI – индуцированные фагами хромосомные островки (Phage-Inducible Chromosomal Islands); PLE – фаго-индуцируемый хромосомный островоподобный элемент (Phage-inducible Chromosomal Island-like Element); SaPI – островок патогенности *Staphylococcus aureus*; DRT – обратные транскриптазы, ассоциированные с защитой (Defence-аssociated RTase); MOI – множественность заражения; STING – стимулятор генов интерферона (Stimulator of Interferon Genes); TIR – Toll/интерлейкин-1 рецептор (Toll/interleukin-1 receptor).

действия защитных белков с заранее определенной последовательностью в геноме фага, у прокариот также имеются системы адаптивного иммунитета CRISPR-Cas (кластеризованные регулярно прерываемые повторы и ассоциированные с ними белки (Clustered Regularly Interspaced Repeats and CRISPR-associated proteins)). В этом случае распознавание нуклеиновой кислоты осуществляется за счёт отжига комплементарной молекулы РНК, и система может приобретать и хранить информацию для интерференции с новыми последовательностями. Способность сохранять информацию о предыдущих инфекциях является общей чертой, характерной для систем CRISPR-Cas и иммунной системы высших эукариот, в том числе и человека. В отличие от иммунитета млекопитающих, CRISPR-Cas-опосредованный адаптивный иммунитет передаётся по наследству. Система CRISPR-Cas состоит из CRISPR-кассет (количество кассет в геномах прокариот варьируется от одной до нескольких десятков) и ассоциированных с ними генов *cas* [1–3]. CRISPR-кассета представляет собой кластер из коротких повторяющихся фрагментов геномной ДНК, разделённых уникальными спейсерными последовательностями, по крайней мере некоторые из которых происходят из чужеродной ДНК. Перед CRISPR-кассетой находится АТ-богатая лидерная область [1]. Гены cas кодируют белковые компоненты эффекторного комплекса систем CRISPR-Cas. Системы CRISPR-Cas участвуют в двух различных процессах: адаптации и интерференции. CRISPR-адаптация – это процесс интеграции новых спейсеров в CRISPR-кассету.

В ходе процесса CRISPR-адаптации происходит удлинение кассеты на последовательность одного нового спейсера и одного повтора. Белки адаптационого комплекса гомологичны во всех системах CRISPR-Cas. Транскрипция CRISPRкассет приводит к образованию пре-крРНК, которая затем процессируется с образованием коротких крРНК. В результате процессинга каждая крРНК содержит спейсер, окруженный частичными повторами. Связанная с белками Cas, крРНК образует эффекторный комплекс, способный специфически распознавать протоспейсер, т.е. последовательность ДНК или РНК, комплементарную спейсерной части крРНК. Вслед за распознаванием протоспейсера происходит деградация молекулы-мишени, содержащей протоспейсер. Процесс распознавания мишени и её деградации называется CRISPR-интерференцией (рис. 1, а).

Разнообразие механизмов CRISPR-интерференции. Классификация систем CRISPR-Cas ocнована на белковом составе эффекторных комплексов. На настоящий момент системы CRISPR-Cas можно разделить на 2 класса, 6 типов и 33 подтипа [4]. Системы класса 1 (типы I, III и IV) используют мульти-субъединичные эффекторы, в то время как эффекторы класса 2 (типы II, V и VI) являются белками, образованными одной субъединицей (таблица). Различные типы систем CRISPR-Cas можно отличить друг от друга по наличию специфических «сигнатурных белков», участвующих в деградации молекулы ДНК (белки Cas3, Csf1, Cas10, Cas9, Cpfl и C2c2 для типов I, IV, III, II, V и VI соответственно [4]).

Класс	Тип	Подтипы	Специфич- ный белок	Процессинг пре-крРНК	Мишень	Различение собственной и чужеродной НК	Эффекторы
Класс I	I	A, B, C, D, E, F1, F2, F3, G	Cas3	Cas6	днк	РАМ	Cascade, крРНК, Cas3
	ш	A, B, C, D, E, F	Cas10	Cas6, Cas10, Csm2, Csm5 (III-A)	ДНК, РНК	CRISPR повтор	Cmr/Csm, крРНК, Cas10
	IV	A1, A2, A3, B, C, D, E	Csf1	Csf5	ДНК?	?	Csf1, Csf3, Csf5, Csf2, крРНК
Класс II	II	A, B, C1, C2	Cas9	РНКаза III	днк	PAM	Cas9, крРНК,
	v	A, B1, B2, E, V-C, V-D, V-F1, V-F2, V-F3, V-G, V-H, V-I, V-U1, V-U2, V-U3, V-U4, V-U5	CpfI	CpfI	днк	PAM	Срf1, крPHK, traкpPHK
	VI	A, B1, B2, C, D	C2c2	Cas13	РНК	?	С2с2, крРНК

Разнообразие механизмов интерференции и классификация систем CRISPR-Cas



Рис. 1. Механизм адаптивного иммунитета CRISPR-Cas у прокариот. a - Фрагменты, происходящие из чужеродной ДНК, могут быть встроены в CRISPR-кассету в процессе CRISPR-адаптации. CRISPR-кассета удлиняется на один новый спейсер и один повтор. Транскрипция CRISPR-кассет приводит к образованию пре-крРНК, которая затем расщепляется с образованием коротких крРНК, и при этом каждая крРНК содержит спейсер, расположенный между частичными повторами. Гены*cas*кодируют белковые компоненты эффекторного и адаптационного комплексов. Эффекторный комплекс состоит из крРНК, связанной с белками Cas, и взаимодействует с протоспейсером, т.е. последовательностью ДНК, комплементарной последовательности спейсера крРНК. Распознавание протоспейсера эффекторным комплексом CRISPR приводит к деградации молекулы ДНК-мишени. Белковый состав модуля интерференции бывает различным, и он используется как основной критерий в классификации систем CRISPR-Cas. Системы CRISPR-Cas подразделяют на два класса, шесть типов и несколько подтипов. Два класса отличаются друг от друга по составу интерференционного комплекса: системы CRISPR-Cas класса 1 являются мульти-субъединичными, а системы класса 2 содержат только один белок.*б*– В процессе праймированной адаптации новые спейсеры предпочтительно отбираются из ДНК, таргетируемой эффекторным комплексом. (С цветными вариантами рис. 1–7 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/.)

Системы CRISPR-Cas класса I включают три типа: I, III и IV. Подробно изучены эффекторные комплексы систем типа I и III. Сходство архитектуры эффекторных комплексов указывает на общее происхождение этих систем [5]. Эффектор типа I представлен большим мультисубъединичным белковым комплексом, называемым Cascade, который содержит субъединицы белка RAMP (Repeat-Associated Mysterious Protein) в стехиометрии Cse1₁/Cse2₂/Cas7₆/ Cas5₁/Cas6₁. Cascade связывает процессированную крРНК длиной 61 нуклеотид с 32-нуклеотидным спейсером [6–9]. Отжиг крРНК, свя-

спейсером приводит к локальному плавлению дцДНК-мишени и образованию R-петли — гетеродуплекса между спейсером крРНК и таргетной цепью протоспейсера ДНК, в то время как нетаргетная нить ДНК протоспейсера вытесняется и остаётся в однонитевой форме. Обязательным условием распознавания мишени является наличие короткого, состоящего из двухтрех нуклеотидов мотива, прилегающего к протоспейсеру (РАМ, Protospacer Adjacent Motif), расположенному на 3'-конце цепи-мишени, то есть после протоспейсера. Наличие РАМ приво-

занной с Cascade, с комплементарным прото-

дит к тому, что системы CRISPR-Cas не атакуют собственный геном, так как РАМ никогда не находится вблизи спейсеров в локусах CRISPR. После формирования R-петли нуклеаза/хеликаза Cas3 рекрутируется к комплексу [10]. Сначала Cas3 вносит одноцепочечный разрыв в нетаргетную цепь протоспейсера на 11–15 нуклеотидов ниже РАМ, а затем начинает раскручивать и расщеплять ДНК в направлении 3'→5'.

В системах типа III эффектор обладает сходной с Cascade структурой [11, 12]. Однако эффектор типа III распознает не дцДНК, а последовательности РНК, комплементарные спейсерам крРНК [13, 14]. Распознавание транскрибированной РНК-мишени стимулирует неспецифическую ДНК-азную активность сигнатурного HD (гистидин-аспартат) домена нуклеазы Cas10, что приводит к in situ деградации ДНК в транскрипционном пузыре [15-20]. В то же время активируется Palm-домен Cas10, ответственный за синтез вторичных мессенджеров (вариантов циклического олигоаденилата (сОА)), который может активировать вспомогательные рибонуклеазы (например, Csm6/Csx1), неспецифично разрушающие транскрипты клеточного и вирусного происхождения [21-23]. Системы типа III не используют РАМ для предотвращения аутоиммунной реакции, так как эффекторный комплекс не способен таргетировать CRISPR-кассету или крРНК. Однако, чтобы избежать риска расщепления собственной ДНК в случае транскрипции CRISPR-кассеты с противоположной цепи, крРНК включает тэг (метку) – последовательность из 8 нуклеотидов CRISPR-повтора, которая ингибирует активность Cas10 [17]. Если последовательность мишени комплементарна спейсеру и тэгу крРНК, то интерференция не происходит.

Точный механизм CRISPR-иммунитета в системах типа IV пока полностью не изучен. Сигнатурным белком таких систем является Csf1. CRISPR-Cas типа IV были обнаружены локализованными на плазмидах или в геномах профагов, что указывает на возможность переноса аппарата CRISPR-Cas на мобильные генетически элементы (MGE) и обратно [24, 25]. Сигнатурные гены CRISPR-Cas типа IV не сопровождаются генами адаптационного модуля *cas1*, *cas2* [26]. Это приводит к предположению, что белки типа IV могут принимать участие во внутриклеточных процессах, не связанных с адаптивным иммунитетом [27, 28].

Системы CRISPR-Cas класса II включают три типа: тип II, тип V и тип VI. В системах типа II мономерный белок Cas9 в комплексе с крРНК отвечает как за распознавание, так и за деградацию таргетной дцДНК. Cas9 обладает двумя нуклеазными доменами (RuvC и HNH) и способен вносить двухцепочечные разрывы [29, 30]. Он представляет систему с минимальным интерференционным комплексом, и поэтому стал предпочтительным инструментом при проведении работ по редактированию генома с использованием CRISPR-Cas [31–33]. Системы типа V характеризуются наличием эффекторного белка Cpfl. Cpfl содержит домен нуклеазы RuvC, аналогичный Cas9, в то время как домен HNH отсутствует [34]. Эффектор типа V способен разрушать таргетную двуцепочечную ДНК РАМ-специфическим образом [34, 35], в то время как связывание Cpfl с мишенями также приводит к проявлению его неспецифической активности в отношении одноцепочечной ДНК [36]. Большинство систем типа V содержат эффектор Cpf1, тогда как в подтипе V-F он заменён на Cas14. На настоящий момент Cas14 является самым маленьким по размеру из всех известных CRISPR-эффекторов. Cas14а представляет собой CRISPR-эндонуклеазу, таргетирующую оцДНК, и для его активации не требуется РАМ [37]. Некоторые эффекторы подтипа V-U демонстрируют филогенетическое сходство с транспозазами ТпрВ [37, 38]. Система CRISPR-Cas типа VI была предсказана методами биоинформатического анализа в 2015 г. [39]. Вскоре был описан эффекторный белок С2с2 из подтипа VI-А. У Leptotrichia shahii локус VI-А содержит только 3 гена (cas1, cas2, c2c2) и CRISPR-кассету. Нуклеаза С2с2, связанная с крРНК, образует эффекторный комплекс, который способен расщеплять молекулы одноцепочечной РНК. В отличие от всех известных CRISPR-нуклеаз, C2c2 расщепляет РНК за счёт активности домена HEPN (Higher Eukaryotes и Prokaryotes Nucleotide-binding, нуклеотид-связывающий домен высших эукариот и прокариот). Мутация в каталитическом центре домена HEPN приводит к потере активности эффекторного комплекса, хотя при этом сохраняется РНК-связывающая активность мутантного белка [40]. Благодаря способности связываться с молекулами РНК заранее определенным образом, нуклеаза С2с2 может быть использована как эффективный инструмент редактирования РНК и регуляции экспрессии генов.

Особый интерес представляет причина разнообразия эффекторов CRISPR и их филогенетические связи. Структуры эффекторных комплексов систем типа I и III весьма сходны. Принято считать, что эффекторный комплекс системы типа III является более древним. При этом гены *cas* не всегда ассоциированы с CRISPRкассетой и модулем адаптации *cas1–cas2* [41]. В MGE, называемых каспозонами, были обнаружены автономные гомологи Cas1. Белки Cas9 и Cpf1, характерные для типов II и V соответственно, подобны белку, кодируемому транспозоном TnpB, и содержат домен эндонуклеазы RuvC [42]. У белка Cas13 (система типа VI) есть PHK-азные домены HEPN. Таким образом, системы CRISPR-Cas могли эволюционировать в результате заимствования генов модулей интерференции и адаптации от каспозонов, в то время как эффекторные нуклеазы могут происходить из геномов клеток или мобильных генетических элементов.

CRISPR-адаптация. Наиболее консервативными белковыми компонентами систем CRISPR-Cas являются Cas1 и Cas2, чьё участие необходимо на стадии приобретения спейсеров [43]. Как правило, гены cas1 и cas2 локализуются вблизи друг от друга, а кодируемые ими белки образуют стабильный комплекс [44, 45]. Делеция cas1 и cas2 не влияет на CRISPR-интерференцию и созревание крРНК в системах типов I [46–49], II [50, 51] и III [52]. Cas1 является эндонуклеазой [53, 54], которая также способна разрушать структуры Холлидея. In vitro Cas1 может способствовать интеграции и рекомбинации ДНК [55]. Также in vitro Cas2 проявляет нуклеазную активность как в отношении РНК, так и ДНК [56, 57]. Однако для процесса CRISPRадаптации in vivo требуется только нуклеазная активность белка Cas1 [44]. Для адаптации in vivo также важна способность собирать стабильный комплекс Cas1-Cas2. Мутации, которые нарушают образование комплекса in vitro, приобретению препятствуют спейсеров *in vivo* [44]. Во время процесса встраивания нового спейсера комплекс Cas1–Cas2 вносит однонитевой разрыв точно в месте соединения лидерного участка и повтора в CRISPR-кассете, катализируя нуклеофильную атаку 3'-ОН-конца встраиваемого спейсера на 5'-конец первого повтора. Точно также другая цепь надрезается на стыке первого повтора и спейсера, и 5'-конец повтора присоединяется к 3'-концу нового спейсера. В результате встроенный спейсер окружен одноцепочечными повторяющимися последовательностями, которые позднее достраиваются благодаря активности репарационных белков клетки-хозяина [58]. Подобные промежуточные структуры также обнаруживаются в процессе интеграции мобильных элементов с участием транспозазы, и это позволяет предположить, что реакции приобретения спейсера и интеграции транспозонов механически похожи друг на друга [59-62].

Способность адаптационного комплекса Cas1–Cas2 приобретать новые спейсеры, независимо от активности эффекторных комплексов CRISPR, известна как процесс наивной адаптации. Во время этого процесса новые спейсеры могут быть получены как из внехромосомной ДНК, так и из генома клетки-хозяина, и только 50% новых спейсеров содержат консенсусный РАМ. Наивная адаптация необходима для последующего распознавания и уничтожения впервые проникшего в клетку инфекционного агента, и, по-видимому, является универсальной особенностью всех систем CRISPR-Cas. Известно, что этот процесс хотя бы частично зависит от активности комплексов RecBCD клетки-хозяина [63]. RecBCD осуществляет процессинг остановленных репликационных вилок, и предполагается, что образующиеся при этом фрагменты ДНК могут быть использованы комплексом Cas1-Cas2 для вставки в CRISPR-кассету. Отсутствие RecBCD приводит к снижению эффективности процесса наивной адаптации, но не останавливает её. Следовательно, комплекс Cas1-Cas2 может использовать другие источники спейсеров. Вопрос об участии других белков клетки-хозяина в процессе CRISPR-адаптации и регуляции этого процесса стал изучаться только недавно [64-67]. Например, было показано, что ДНК-полимераза I необходима как для наивной, так и для праймированной адаптации (предположительно, для заполнения одноцепочечных повторов, возникающих при встраивании спейсеров) [68]. Dorman и Bhriain [65] предположили, что отрицательная суперспирализация может влиять на различные стадии взаимодействия белков CRISPR с ДНК, включая адаптацию, экспрессию генов cas и локусов CRISPR и фактически интерференцию.

Наличие РАМ позволяет различать геном хозяина, содержащий спейсер в составе CRISPRкассеты, и протоспейсер в составе молекулымишени. Однако мутации РАМ или seed-последовательности могут защитить вирусы от их распознавания и деградации эффекторным комплексом [30,69-72]. Следовательно, система CRISPR-Cas должна обновлять свою «память», чтобы избежать заражения мутировавшими бактериофагами. Для достижения этой цели некоторые типы систем CRISPR-Cas используют праймированную адаптацию – высокоэффективный процесс получения новых спейсеров из уже известных ранее встречавшихся фагов, фрагменты генома которых были сохранены в CRISPR-кассете в качестве иммунологической памяти. Праймированная адаптация была показана для систем CRISPR-Cas I-E [48], I-F [49, 73], І-В [74, 75], І-С [76], І-U [77] и ІІ-А [78]. Праймированная адаптация приводит к высокоэффективному накоплению новых спейсеров, локализованных в иис-положении к «праймирураспознаваемому ющему» протоспейсеру, крРНК в составе эффекторного комплекса [79]. Наблюдаемая эффективность праймированной адаптации (измеряемая как количество удлиненных CRISPR-кассет в популяции) очень низка в том случае, если праймирующий протоспейсер полностью совпадает с крРНК и содержит РАМ, способный к консенсусной интерференции (AAG или ATG – в случае системы I-Е из Escherichia coli) [48, 80]. Эффективность праймированной адаптации стимулируется наличием мутаций РАМ или протоспейсера, которые снижают эффективность интерференции [30, 70, 73]. Тем не менее для праймированной адаптации необходим функциональный белок Cas3, что позволяет предположить существование функциональной связь между CRISPR-интерференцией и праймированной адаптацией [71, 81]. Недавнее исследование *in vitro* предполагает, что Cascade, Cas1–Cas2 и Cas3 образуют единый праймирующий комплекс, активность которого приводит к эффективному отбору новых спейсеров [82]. Чтобы объяснить такую связь, были предложены две альтернативные модели. Согласно одной модели, эффекторы, связавшиеся с протоспейсерами с определенными РАМ, принимают специфическую конформацию, что приводит к привлечению адаптационного комплекса Cas1-Cas2, а также белка Cas3 и последующему направленному сканированию мишени, и отбору новых спейсеров [83]. Напротив, комплексы, которые были сформированы на мишенях с подходящими для интерференции РАМ, не задействуют Cas1-Cas2, приводя только к интерференции [84]. Вторая модель постулирует, что очевидная разница между эффективностью процесса праймированной адаптации с различными мишенями является следствием деградации неоптимальных мишеней [81, 85]. Поскольку большинство MGE способны реплицироваться и имеют собственные механизмы поддержания числа копий, конкуренция между ослабленной CRISPR-интерференцией и подобными системами может привести к ситуации, когда фрагменты геномов MGE присутствуют в клетке в течение достаточно длительного времени, что, предположительно, позволяет произойти более медленной реакции адаптации [86].

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ С УЧАСТИЕМ БЕЛКА Argonaute

У эукариот белки Argonaute (Ago) играют ключевую роль в процессе РНК-интерференции, вовлечённом в регуляцию экспрессии генов и защиту от вирусов. Члены этого семейства белков также широко распространены у бактерий и архей [87, 88]. Функции прокариотических белков Argonaute (pAgo) пока ещё до конца не установлены, но эти белки также способны участвовать в подавлении чужеродного генетического материала [89, 90]. Чтобы распознать мишени в виде нуклеиновых кислот, белки pAgo используют молекулы-гиды, но, в отличие от CRISPR-Cas и эукариотических Ago, гидом часто служит короткая одноцепочечная ДНК [91], хотя также есть примеры РНК-гидов [92]. 5'-Конец гида загружается в домен MID белка pAgo, в то время как З'-конец взаимодействует с доменом PAZ [93]. В экспериментах *in vitro* с белками pAgo из различных организмов было показано, что распознавание комплементарной мишени приводит к её нуклеолитическому расщеплению каталитическим доменом PIWI. В основном pAgo таргетируют молекулы ДНК [94, 95], хотя in vitro некоторые из них могут также расщеплять РНК [96–98]. Пока неясно, может ли таргетирование РНК быть важным для активности рАдо *in vivo*. Тем не менее потенциально существуют все возможные комбинации pAgo-опосредованных взаимодействий ДНК/РНК гида/мишени [89, 93, 99]. In vivo присутствие pAgo влияет на поддержание плазмид и ингибирует трансформацию [92, 100]. Хотя считается, что рАдо также участвуют в противовирусной защите, экспериментально было получено лишь одно доказательство с pAgo из Clostridium butyricum, чья гетерологичная экспрессия в клетках E. coli приводила к понижению титра фага M13 с хроническим жизненным циклом и литического фага P1vir. Однако механизмы pAgo защиты определены не были [90]. Основываясь на архитектуре доменов, белки рАдо делятся на классы, и, что неожиданно, некоторые белки содержат каталитически неактивный домен PIWI [89, 101]. Функции таких белков, если они существуют, ещё предстоит определить.

Одним из основных вопросов, связанных с рАдо-интерференцией, является механизм образования и источник молекул-гидов, а также вопрос, каким образом клетки избегают аутоиммунного ответа. Секвенирование ДНК-гидов, связанных с рАдо *in vivo*, показало, что они в основном происходят из активно реплицирующихся или многокопийных элементов, включая плазмиды и транспозоны [90, 100]. Для различных белков рАдо была показана гид-независимая нуклеазная активность, приводящая к расщеплению ДНК [102, 103]. Неспецифичное по отношению к нуклеотидной последовательности измельчение плазмид может привести к образованию пула фрагментов ДНК различного раз-



Рис. 2. Модель механизма действия рАдо и схематическое изображение белка с загруженным гидом

мера, и некоторые из них могут далее загружаться в качестве молекул-гидов и активировать более эффективную и зависимую от последовательности деградацию комплементарных мишеней [103]. Для генерации гидов белки рАдо могут таргетировать свободные концы ДНК или интермедиаты процесса репликации, которые более часто присутствуют в экзогенной ДНК. Подобно CRISPR-Cas, процесс генерации гидов может зависеть от RecBCD комплексов [90]. Было показано, что, как и в случае *C. butyricum*, pAgo из Thermus thermophilus связывается с гидами, происходящими из областей терминации репликации, и, предположительно, вместе с ДНК-гиразой участвует в контроле репликации клетки-хозяина путём разделения сцепленных хромосом [104]. Компактизация ДНК, характерная, например, для геномов архей, также может быть важна для различения собственного и чужеродного генетического материала белками рАдо [102]. Считается, что РНК-гиды, связанные с pAgo из Rhodobacter sphaeroides, были неспецифично отобраны из фрагментов деградированных транскриптов. Тем не менее белок сохраняет свою специфичность в отношении чужеродной ДНК [92]. Текущая модель механизма действия рАдо показана на рис. 2.

Описанный способ интерференции может быть не очень эффективным против быстро действующих литических фагов. Можно предположить, что защитные механизмы с участием рАдо приспособлены для контроля над менее опасными мобильными элементами или могут быть ассоциированы с другими защитными системами, чтобы усилить защиту от вирусной инфекции. В поддержку последнего предположения выступает тот факт, что гены рАдо внутри защитных островков часто встречаются поблизости от генов нуклеаз или белков Cas [88, 101, 105].

ИНДУЦИРОВАННАЯ КЛЕТОЧНАЯ СМЕРТЬ ИЛИ ОСТАНОВКА КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА – СИСТЕМЫ АБОРТИВНОЙ ИНФЕКЦИИ И ТОКСИН-АНТИТОКСИН

В этом разделе мы рассмотрим абортивную инфекцию (Abi) в широком смысле — как клеточный ответ на инфекцию, который приводит



Рис. 3. Общий принцип абортивного ответа на инфекцию. Показаны примеры эффекторов с различными механизмами действия

к прекращению метаболизма (бактериостатический эффект) или гибели клеток (бактерицидный эффект) до завершения жизненного цикла вируса, что предотвращает образование активных фаговых частиц или снижает выход фагового потомства [106, 107]. Чисто механически системы Abi очень разнообразны. Как правило, они состоят из двух модулей (рис. 3). Один из них обнаруживает фаговую инфекцию и передаёт сигнал. При получении этого сигнала второй (эффекторный) модуль останавливает метаболизм клетки и/или вызывает её самоубийство [107, 108]. Принято считать, что индуцированное состояние подавленного метаболизма даёт больше времени другим защитным механизмам для борьбы с инфекцией. Также считается, что некоторые системы Abi могут быть «последним средством защиты», т.е. они активируют суицидальный ответ на поздних стадиях вирусной инфекции, в случае если фаг избежал действия других иммунных механизмов. Стратегия самоуничтожения инфицированной клетки останавливает распространение инфекции на уровне сообщества и таким образом приносит пользу клональной популяции [109, 110]. Некоторые системы, чьё действие фенотипически напоминает Abi-ответ, могут непосредственно интерферировать с вирусной инфекцией, но сами по себе не вызывают активную гибель клеток. Однако их действие может сопровождаться лизисом клеток, вызванным произведёнными вирусом токсичными компонентами.

Системы Abi. Разнообразие кодируемых плазмидами систем с механизмом Abi исторически исследовалось на грамположительных *Lactococcus* [106, 111]. Из 23 описанных систем, обозначаемых как AbiA–AbiZ, механизм действия был определен лишь в нескольких случаях. Например, белок AbiZ взаимодействует с холином и лизином фага ф31, вызывая преждевременный лизис клетки [112]; AbiK проявляет безматричную ДНК-полимеризационную активность [113]. Считается, что AbiA, AbiK, и AbiF ингибируют репликацию [106, 114], а активность AbiB и AbiQ связана с деградацией мPHK [115, 116]; AbiD1 может вмешиваться в

процесс упаковки вирусной ДНК, ингибируя нуклеазу, разрешающую конкатамеры вирусных геномов [117]. В то же время предполагается, что AbiT и AbiV влияют на экспрессию поздних фаговых белков [118, 119]. Для большинства этих систем неясно, как распознается фаговая инфекция. В клетках Staphylococcus была обнаружена система Abi с сенсорным модулем, основанным на фосфорилировании белков [120]. Фосфорилирование, как эффективный способ усиления сигнала, часто используется в эукариотических противовирусных системах. Серинтреониновая киназа Stk2 стафилококков активируется белком РасК фага ϕ NM1 и фосфорилирует различные белки клетки-хозяина, вызывая ингибирование основных метаболических путей [120].

Множество механизмов Abi было также описано на примере грамотрицательной бактерии *E. coli* [121]. Так, белки Lit и PrrC, кодируемые криптическими профагами, действуют специфично против фага Т4. Протеаза Lit активируется в результате взаимодействия с консервативным пептидом Gol капсидного белка T4 и останавливает процесс трансляции, расщепляя фактор элонгации трансляции EF-Tu [122]. PHKaза PrrC также ингибирует трансляцию, расщепляя tPHK^{Lys}. PrrC взаимодействует с комплексом рестрикции *Есо*ргг системы рестрикции-модификации (R-M) типа I, и активируется только при ингибировании комплекса рестрикции, вызванном кодируемым Т4 пептидом Stp [123]. В качестве другого интересного примера можно привести белок PifA, кодируемый F-плазмидой, который обеспечивает защиту клеток от фага Т7 [124]. Этот мембраносвязанный белок активируется белками gp10 или gp1.2 фага T7 и, нарушая целостность мембраны, вызывает утечку из инфицированной клетки АТР и других малых молекул [124, 125]. Система RexAB, кодируемая профагом λ, также повышает проницаемость мембраны [126, 127]. Считается, что RexA распознает ДНК-белковые интермедиаты вирусных репликационных комплексов и стимулирует связанный с мембраной RexB, который образует ионный канал, что приводит к потере мембранного потенциала и ингибированию энергозависимых процессов [127].

Защитные системы на основе взаимодействия токсин-антитоксин (ТА). Системы токсин-антитоксин представляют собой эгоистичные элементы, состоящие из стабильной субъединицы токсина и нестабильного антитоксина. В условиях стресса деградация антитоксина приводит к повышению активности токсина и остановке клеточного роста [128, 129]. Модули ТА принимают участие в ответе на стресс, формировании

биоплёнок и вносят вклад в антибиотикорезистентность (хотя последнее вызывает споры [129]), но также могут быть вовлечены в Abi противовирусную защиту, поскольку фаговая инфекция часто влияет на метаболизм хозяина таким образом, что может вызывать потерю антитоксина (рис. 4). Модули ТА часто находятся внутри защитных островков, и между системами ТА и Abi существует значительный обмен доменами [130]. Фактически нельзя провести чёткую границу между Abi- и TA-системами, поскольку Abi – это стратегия защиты, а ТА – организационный/механистический принцип. Скорее, некоторые системы Abi можно рассматривать как основанные на механизме ТА, например, даже некоторые системы Abi, которые обсуждались в предыдущем разделе, можно рассматривать в качестве отдельных токсинов, в то время как PrrC/*Eco*prrI можно рассматривать как настоящую пару токсин-антитоксин. В зависимости от природы взаимодействия токсина и антитоксина системы ТА подразделяются на 6 типов. Например, антитоксин может являться молекулой РНК, которая напрямую ингибирует токсичный белок (тип III) или регулирует уровень трансляции мРНК токсина (тип I). В других типах систем ТА антитоксин может быть белком, который ингибирует токсин через белок-белковые взаимодействия (тип II) или компенсирует воздействие токсина на другие мишени (тип IV) [129, 131].

Примером ответа Abi на основе модулей ТА могут служить системы ToxIN и RnIAB. ToxIN, который исходно был идентифицирован как AbiQ в клетках *Lactococcus*, широко распространён в геномах бактерий и функционирует как система ТА типа III, в которой РНК-азная активность токсина ToxN блокируется в результате взаимодействия с РНК-антитоксином ToxI [116, 132, 133]. Система RnIAB из клеток E. coli представляет ТА-модуль типа II, и она защищает клетки от инфицирования фагом Т4 [134]. Токсин RnlA является стабильной РНКазой. Антитоксин RnlB быстро разрушается протеазами клетки-хозяина. Таким образом, если фаговая инфекция препятствует непрерывной экспрессии генов, то предотвращение синтеза RnlB способствует проявлению токсичной активности RnlA, что приводит к распаду внутриклеточной мРНК [134]. Гомологи RnIAB были также обнаружены в плазмидах E. coli, и эта система получила название LsoAB [135]. В качества антитоксина для обеих систем может выступать белок Dmd, кодируемый фагом Т4 [134, 135]. Многие системы ТА обладают обратимым действием и не вызывают гибели клеток. Тем не менее временное прекращение роста может



Рис. 4. Общий принцип абортивной инфекции, основанный на активности модулей ТА. Приведено несколько примеров эффекторов токсинов. (Stringent response – характерный клеточный ответ на стрессовые условия, связанный с синтезом сигнальных молекул алармонов, SAS – Small Alarmone Synthetase)

обеспечить устойчивость к фагам. AbiE, система ТА типа IV, является примером: токсин AbiEii, транскрибируемый с промотора *abiE*, не взаимодействует напрямую с антитоксином AbiEi. Вместо этого AbiEi связывается с промоторной областью и ингибирует транскрипцию всего ТА-оперона [136]. Токсин АbiEii принадлежит к суперсемейству β-подобных ДНК-полимераз и проявляет нуклеотидилтрансферазную активность [136]. Недавно было показано, что MenT₃, являющийся гомологом AbiEii в клетках Mycobacterium tuberculosis, может переносить пиримидины на акцепторную ветвь специфических тРНК [137]. В согласии с этим повышенная экспрессия токсина AbiE в клетках Serratia вызывает прекращение роста клеток и снижение уровня тРНК [138]. У Е. coli система MazEF типа II препятствует размножению фага P1 [139], а TA-система hok/sok типа I снижает размножение фага Т4 [140]. Последняя система основана на холиноподобной активности токсина Hok, в то время как антитоксин *sok* является антисмысловой РНК, вызывающей ингибирование синтеза Нок путём связывания с его мРНК [141]. В целом, роль ТА-систем в защите от фагов плохо охарактеризована, и этот вопрос остаётся противоречивым [142, 143]. Однако, основываясь на обилии систем ТА и их участии в Abi-ответе у модельных бактерий, можно ожидать, что защита от фагов на основе ТА широко распространена среди бактерий [130, 142, 144].

Ретроны как защитные системы. Ретроны – это генетические элементы, которые кодируют обратную транскриптазу (RTase) и некодирующую РНК (нкРНК), которая используется обратной транскриптазой для образования ковалентных гибридов РНК/ДНК [145]. До недавнего времени функциональная роль ретронов оставалась неизвестной, пока ряд работ не продемонстрировал, что ретроны могут являться частью трехкомпонентных систем ТА, участвующих в защите от фагов посредством Abi [146–149]. В нормальных условиях комплекс

обратной транскриптазы с гибридом РНК/ДНК неактивен, в то время как фаговая инфекция вызывает его активацию и передачу сигнала сопряженным эффекторам-токсинам (рис. 5). Антифаговая активность была продемонстрирована для нескольких ретронов, при этом мутации, влияющие на вторичную структуру нкРНК и сайт ветвления или каталитический мотив RTase, устраняли защиту [146, 149]. Внутри защитных островков было обнаружено ~2000 систем, содержащих ретроны, при этом RTase могут быть слиты или находиться в непосредственной близости от АТФаз, рибозилтрансфераз и эндонуклеаз, выступающих в качестве эффекторных белков [146, 149]. Ретрон Ec48 из клеток E. coli «охраняет» фермент RecBCD, который является одним из ключевых барьеров на пути проникновения чужеродной ДНК. Ингибирование RecB вирусными белками (например, Gam фага λ или gp5.9 фага Т7) активирует ретрон и высвобождает активность сопряжённого с системой заякоренного в мембране эффектора, что вызывает преждевременный лизис клеток [146]. Для ретрона Sen2 из клеток Salmonella enterica было показано, что нарушение структуры ДНК части ретрона вызывает активацию токсина RcaT [147, 148]. Деградация или метилирование молекул ДНК, ассоциированных с кодируемыми фагом эндонуклеазой RecE или метилтрансферазой Dam, приводят к активации ответа, в то время как отдельные белки, кодируемые профагами, могут выступать в качестве блокаторов активации ретронов [147].

Антифаговые сигнальные системы на основе циклических олигонуклеотидов (CBASS). Недавно было описано широко распространённое семейство систем, которые вызывают активацию Abi-ответа путём синтеза циклических олигонуклеотидов – CBASS (Cyclic-Oligonucleotide-Based Anti-Phage Signalling System) [107, 150, 151]. CBASS-системы включают cGAS/DncV-



Рис. 5. Общий принцип действия абортивной инфекции на основе ретронов

(CDподобные нуклеотидил-трансферазы NTase), и фаговая инфекция активирует их, запуская синтез вторичного мессенджера (циклический GMP-AMP (сGAMP), циклический триаденилат (сААА) и др.), который далее передаёт сигнал к различным эффекторам, индуцируюшим программируемую гибель клетки (рис. 6) [150–153]. Эти системы обеспечивают ещё одну связь между иммунной защитой эукариот и прокариот, поскольку у животных циклическая GMP-AMP-синтаза (cGAS) участвует в противовирусном и воспалительном ответе через сигнальный путь cGAS-STING, активируемый присутствием ДНК в цитозоле [154]. Гены олигонуклеотид циклаз из семейства CD-NTAse обнаруживаются примерно в 10% геномов прокариот, и более половины из них включены в состав защитных островков. Разнообразие систем CBASS можно классифицировать в зависимости от состава оперона, типа эффектора или продуцируемой сигнальной молекулы [153]. Системы типа I содержат только CD-NTase и эффектор, в то время как другие системы также несут вспомогательные компоненты: гены с убиквитин-ассоциированными доменами в типе II, гены HORMA и Trip13-подобных доменов в типе III или домены модификации нуклеотидов в редко встречающихся CBASS типа IV [153]. Первой экспериментально исследованной системой была CBASS типа II из Vibrio cholerae [151, 155, 156]. Ядро этой системы состоит из двух компонентов: cGAS фермента DncV и фосфолипазы CapV (Cap - белок, ассоциированный с CD-NTase), реагирующей на сGAMP. Этих двух компонентов вполне достаточно для обеспечения защиты от фага Р1, однако для защиты от других фагов требуются два вспомогательных белка, несущих домены Е1, Е2 и ЈАВ, типичные для ферментов убиквитинирования [151]. Сенсорный механизм до сих пор не определен, но было показано, что после заражения фагом клетки продуцируют cGAMP, который вызывает активацию фосфолипазы CapV, разрушающей клеточную мембрану до завершения жизненного цикла вируса. Кроме фосфолипазы, среди известных эффекторов систем CBASS присутствуют эндонуклеазы или белки, несущие трансмембранные домены [153, 157]. Интересна группа эффекторов CBASS, содержащих домен, гомологичный эукариотическому домену STING (Stimulator of Interferon Genes; стимулятор генов интерферона). У бактерий распознавание циклических олигонуклеотидов с помощью STING приводит к активации сопряжённого домена TIR (Toll/interleukin-1 receptor) в составе эффектора и последующей деградации NAD⁺ [158]. Сравнительный анализ структур STING-доменов многоклеточных животных и бактерий позволяет понять его переход от непосредственной эффекторной роли в CBASS к регуляторным функциям в иммунитете высших животных [158].

Многие бактериальные белки CD-NTase неактивны в условиях in vitro [152]. Недавно было показано, что для их активности in vivo требуются вспомогательные белки [159]. У эукариот белки с доменом HORMA связываются со специфическими закрывающими мотивами в белках-мишенях и собираются в сигнальные комплексы [160]. В CBASS типа III из Е. coli и Pseudomonas aeruginosa белки с доменом HORMA активируют CD-NTase, что приводит к продукции вторичного мессенджера циклического триаденилата, который, в свою очередь, активирует неспецифическую эндонуклеазную активность эффектора NucC, обеспечивая защиту от фагов по Abi-механизму [159, 161]. В отсутствии инфекции активность этой системы подавляется Trip13-подобной АТРазой, которая, предположительно, приводит к диссоциации комплекса CD-NTase с HORMA. Считается, что распознавание специфических мотивов в фаговых белках вызывает конформационные изменения в домене HORMA и активирует CD-NTase этого белкового комплекса. Интересно, что эффектор NucC может быть обнаружен как вспомогательная эндонуклеаза в системах CRISPR-Cas типа III, которые также полагаются на сигналинг, связанный с циклическим олигоаденилатом [21, 22, 161]. Другим эффектором CBASS, который может реагировать на различные типы циклических олигонуклеотидов, является белок CapIV из Enterobacter cloacae [162], который стал первым описанным членом целого семейства белков. Белки CapIV распознают вторичные мессенджеры через различные доме-SAVED, состоящие из 2-х CRISPRны родственных субъединиц САRF, которые индуцируют олигомеризацию и способствуют проявлению активности эффекторной эндонуклеазы, ранее известной как DUF4297 [162].

Несмотря на то, что в последние годы было описано большое разнообразие бактериальных CD-NTase и сопряжённых с ними эффекторов, остаётся много вопросов. Как эти системы чувствуют фаговую инфекцию? Каковы функции вспомогательных белков? Все ли CBASSсистемы участвуют в защите от фагов или некоторые из них могут выполнять другие функции? Каковы издержки экспрессии генов CBASS, и есть ли дополнительные механизмы, ограничивающие их возможную токсичность в отношении самой клетки, как в случае негативной регуляции Trip13-подобной ATPaзы?



Рис. 6. Модель CBASS-опосредованного иммунного ответа

ЗАЩИТА, ОПОСРЕДОВАННАЯ ПРОФАГАМИ

Умеренные фаги могут встраивать свои геномы в хромосому клетки-хозяина с образованием профагов [163]. Большинство известных бактерий несут профаги, и взаимодействие профага с хозяином можно рассматривать как мутуалистическое: поскольку выживание профагов зависит от клетки-хозяина, для профага выгодно исключить вторичное инфицирование лизогенизированной клетки [164]. Действительно, профаги часто несут гены, ассоциированные с противовирусной защитой (рис. 7, *a*) [165–168]. Самый простой способ подавления инфицирования гомоиммунными фагами – экспрессия репрессорного белка – фактора транскрипции, который регулирует переключение между литической и лизогенной жизненными стратегиями фага. Так как белки-репрессоры постоянно присутствуют в лизогенной клетке для подавления

БИОХИМИЯ том 86 вып. 4 2021

экспрессии литических генов профага, вторичная литическая инфекция фагом, регулируемым тем же или подобным репрессором, будет подавлена [169]. Хотя защита, ассоциированная с репрессорами, действует в узком диапазоне, систематические исследования профагов в клетках *P. aeruginosa* и *Mycobacterium smegmatis* обнаружили многочисленные защитные гены, которые обеспечивают гетеротипическую защиту [165, 166].

Гены, которые не являются необходимыми для выживания профага, но в то же время способствуют повышению устойчивости клетки-хозяина, были названы как «мороны» (т.е. добавляющие больше («more on») к фенотипу). Мороны могут влиять на многие процессы внутри клетки-хозяина, включая подвижность клеток, устойчивость к антибиотикам, метаболизм и защиту от фагов [170, 171]. Некоторые системы ТА, кодируемые профагами, и белки Sie (исключение суперинфекции), которые можно рассмат-



Рис. 7. Защита, ассоциированная с профагами и мобильными генетическими элементами (MGE). *а* – Кодируемые профагами защитные системы. *б* – Модель индукции PICI и интерференции. *в* – Модель индукции элементов, подобных хромосомным островкам (PLE) и интерференции

ривать в качестве моронов, уже обсуждались. Мороны могут также оказывать влияние на клеточную поверхность, препятствуя распознаванию рецепторов. Например, фаги D3 и ф297 клеток *P. aeruginosa* могут изменять конформацию субъединиц О-антигена в липополисахариде (LPS), кодируя собственную полимеразу О-антигена [172–174], в то время как некоторые профаги клеток *Shigella* и *E. coli* могут блокировать дальнейший рост цепи О-антигена за счёт ацетилирования или глюкозилирования [175, 176].

Профаги микобактерий кодируют различные системы исключения повторной инфекции. Например, фаги Sbash и CarolAnn несут предполагаемые TA-модули с мембраносвязанными эффекторами [177, 178]. Было показано, что другие микобактериофаги кодируют эндонуклеазы рестрикции, мембранные белки Sie или синтазы гуанозинпентафосфата (р)ррGpp, способные защитить клетку-хозяина [166]. Система, кодирующая (р)ррGpp синтазу и её сопряжённый ингибитор, была первоначально найдена у фага Phrann (белки gp29 и gp30), а позже было показано, что подобные системы широко распространены у профагов и представляют новое семейство модулей TA, основанных на передаче сигнала молекулами алармонов [166, 179]. Токсичный компонент – фермент SAS (Small Alarmone Synthetase), который синтезирует ppGpp или ppApp – сигнальные молекулы, характерные для ответа клетки на стрессовые условия, связанные с аминокислотным голоданием (stringent response) – что вызывает прекращение роста [180]. Антитоксины напрямую связываются с синтазой или разрушают сигнальный алармон [179]. Другая система Abi, широко распространённая в профагах грамотрицательных бактерий, состоит из эффектора BstA, который локализуется совместно с реплицирующейся ДНК фагов-мишеней и интерферирует с процессом репликации по неопределённому механизму [181]. Эта система представляет собой интересный пример предотвращения автоиммунного ответа при активации профагов: BstA инактивируется за счёт связывания со специфическим анти-BstA локусом (aba) в геноме фага и, таким образом, не предотвращает развитие литической инфекции.

Мороны могут сильно отличаться друг от друга даже между близкородственными штаммами. Недавнее исследование Р2- и Р4-подобных профагов выявило беспрецедентное разно-

образие компактных защитных систем в специфических локусах их геномов [182]. Помимо известных противовирусных систем, в этих горячих точках были зарегистрированы множественные кластеры генов, которые несут предсказанные защитные домены (TIR, SIR2, нуклеазы, АТРазы) или домены с неустановленной функцией. Защитная активность была подтверждена для 14 новых систем. Например, предполагается, что система PARIS, состоящая из АТРазы и белка DUF4435, обеспечивает абортивный ответ на инфекцию, запускаемый антирестрикционным белком Осг фага Т7, который ингибирует защитные системы хозяина R-M и BREX [182–184]. Идентификация горячих точек разнообразия в других профагах может представлять собой ценный и простой инструмент для обнаружения новых систем защиты от фагов.

ПАРАЗИТЫ ФАГОВ. МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПИРАТСТВО РІСІ И РLE

Мобильные генетические элементы могут случайным образом переноситься фагами в процессе генерализованной трансдукции. Но некоторые MGE приобрели способность контролировать механизмы упаковки фаговой ДНК в капсиды, чтобы использовать их для загрузки собственных геномов – явление, которое иногда называют молекулярным пиратством [185-188]. Индуцируемые фагами хромосомные островки (PICI, Phage Inducible Chromosomal Islands) широко распространены в геномах грамположительных и грамотрицательных бактерий. Их индукция из хромосомы зависит от инфицирования фагами-помощниками, и, с точки зрения хозяина, может рассматриваться как вариант Abi-ответа [189, 190]. Заражённая клетка в конечном итоге лизирует, но выход потомства суперинфицирующего литического фага снижается, и большинство высвобождаемых частиц несут геном РІСІ вместо генома фага [191]. Поскольку элементы PICI не проходят литический цикл самостоятельно и ограничивают распространение фагов-помощников, их присутствие может быть полезным для популяции бактерий.

PICI. Наиболее изученной группой структур PICI, которая была обнаружена у *Staphylococcus*, является SaPI (островки патогенности *Staphylococcus aureus*). Эти хромосомные островки имеют размер менее 15 т.п.н., они кодируют интегразу, эксцизионный белок и репликационные компоненты. Экспрессия этих генов находится под строгим контролем главного репрессора Stl. SaPI часто несут дополнитель-

ные гены, включая токсины и факторы вирулентности, и их присутствие может влиять на патогенность клетки-хозяина [185, 192]. Жизненный цикл SaPI связан с инфицированием фагом-помощником, и обнаружение специфических белков фагов-помощников снимает репрессию, обусловленную действием Stl [193, 194]. После активации SaPI могут мешать репродукции фага-помощника при помощи нескольких различных механизмов (рис. 7, б). Они способствуют сборке миниатюрных капсидов, способных загружать геном SaPI, но исключающих более крупный геном фага-помощника [195]. SaPI также могут препятствовать упаковке вирусного генома, ингибируя малую субъединицу терминазы TerS, в то время как загрузка собственного генома SaPI обеспечивается SaPI-кодируемой терминазой [195]. Наконец, кодируемые SaPI белки могут связываться с вирусными факторами транскрипции, нарушая экспрессию поздних генов [196]. Хотя эти механизмы были описаны в случае стафилококковых SaPI, PICI широко распространены среди бактерий [190, 197], и они могут использовать сходные механизмы для поддержания их паразитического образа существования. Например, PmCI172 из клеток Pasteurella multiocida способствует формированию капсидов небольшого размера, когда клетка инфицирована Ми-подобным фагом-помощником, в то же время EcCICFT073 из клеток E. coli кодирует белок Rpp, который вызывает репрограммирование белка TerS фага λ для упаковки генома PICI [190, 198].

PLE. Другой тип сателлитных MGE, специфичных для V. cholera и препятствующих распространению фага ICP1, называется PLE – фаго-индуцируемый элемент, подобный хромосомным островкам (Phage-inducible Chromosomal Island-like Element) [199]. Аналогично структурам PICI, PLE распознает белки фага-помощника ІСР1, чтобы запустить процесс вырезания из генома клетки, и использует ферменты и структурные компоненты ІСР1. Однако геномная организация PLE имеет свои особенности, и, в отличие от PICI, которые лишь подавляют процесс размножения фагов-помощников, при индукции PLE вовсе не происходит формирования инфекционных частиц ІСР1 (рис. 7, в) [199-202]. Было показано, что в клетках, несущих PLE, репликация ICP1 в значительной степени ингибируется. Также было показано, что отдельные PLE модулируют экспрессию вирусных генов [202, 203]. Дополнительным механизмом, который может способствовать подавлению ІСР1, является продукция кодируемого PLE белка LidI, который нарушает систему интерференции лизиса ІСР1 и ускоряет лизис

клеток [204]. Следует отметить, что ICP1, в свою очередь, кодирует систему CRISPR-Cas, нацеленную на PLE [205].

СИСТЕМЫ С ВЕРОЯТНЫМИ НОВЫМИ МЕХАНИЗМАМИ

Выявление кластеров консервативных генов, обнаруженных внутри защитных островков доступных прокариотических геномов, позволило предсказать множество новых типов систем защиты [149, 206-208]. Недавно была проведена системная проверка этих предсказаний. Процесс включал клонирование 28 кандидатных систем из различных бактерий и их экспрессию в суррогатных хозяевах: грамотрицательной E. coli или грамположительной Bacillus subtilis с последующим скринингом против коллекции фагов различных семейств. В этой работе были подтверждены 10 новых систем, которые были названы в честь мифологических божеств-покровителей [207]. Активность систем Druantia, Kiwa и Zorya была валидирована в клетках E. coli, а активность систем Gabija, Hachiman, Lamassu, Thoeris, Septu, Shedu и Wadjet была продемонстрирована в клетках B. subtilis. Было показано, что множество белковых доменов, не типичных для уже изученных защитных систем, участвуют в противовирусной защите, и это предполагает новые механизмы действия для обнаруженных систем.

Система Zorya активна против фагов как с оцДНК, так и с дцДНК геномами. Эта система кодирует белки ZorA и ZorB, гомологичные компонентам MotAB, формирующим протонные каналы жгутикового мотора бактерий [209]. В системах Zorva типа I белок ZorAB может сопровождаться предсказанной малой нуклеазой ZorE. В системах типа II – хеликазой/АТРзой ZorC и Рfam00691-содержащим белком ZorD. Инфицирование фагом культуры, несущей систему Zorya, провоцирует преждевременный лизис клеток, предположительно, в результате Abi-ответа, опосредованного ZorAB эффектором, приводящим к деполяризации мембраны. Эта точка зрения была далее поддержана данными о том, что мутации аминокислотных остатков, для которых было предсказано участие в протонном транспорте, приводят к снижению защитной функции системы Zorya [207].

Другая исследованная система (Thoeris) состоит из белка ThsA с доменами SIR2 и SLOG и белка ThsB, несущего домен TIR [207, 210]. Недавно были опубликованы структуры обоих белков [211]. Мутации в NAD-связывающем кармане домена SIR2 белка ThsA приводили к потере

активности этого белка in vitro и потере устойчивости клеток к фагу in vivo, проводя связь между защитными свойствами системы Thoeris и гидролизом NAD⁺ [207, 211]. Домен TIR может служить передатчиком сигнала в иммунных путях эукариот [212], также он был выявлен в других прокариотических системах (например, CBASS). В системе Thoeris фаговая инфекция активирует домен TIR белка ThsA, что приводит к синтезу изомера циклической ADP-рибозы. Далее сигнал передаётся на белок ThsB, что приводит к абортивному ответу на инфекцию, связанному с расщеплением NAD⁺ [210]. Множественные копии гена thsB могут быть ассоциированы с одним и тем же геном thsA, при этом диверсификация доменов TIR обеспечивает защиту от более широкого спектра инфицирующих фагов [210].

Было показано, что система Wadjet не активна против фагов, но подавляет трансформацию плазмид [207]. Система Wadjet состоит из четырех компонентов: белков JetABC, гомологичных белкам поддержания структуры хромосомы (SMC), которые участвуют в сегрегации геномов плазмид или клетки-хозяина, и белка JetD с предполагаемым доменом топоизомеразы VI [207, 213]. Феномен подавления поддержания плазмид, связанный с неканоническими белками SMC, был описан у M. smegmatis, где модуляция статуса суперспирализации плазмиды нарушала её сегрегацию в дочерние клетки [214]. Можно предположить, что Wadjet действует аналогичным образом для ограничения распространения чужеродных внехромосомных генетических элементов.

В другом недавнем исследовании применялась аналогичная логика экспериментальной проверки систем-кандидатов, но использовался другой алгоритме предсказания защитных генов. Вместо проведения оценки обилия белковых доменов все последовательности, встречающиеся на расстоянии 10 генов от известных защитных систем, были проанализированы на предмет частоты их локализации в пределах защитных островков. Всего было предсказано более 7000 генов-кандидатов, вовлечённых в защиту от фагов, многие из которых содержали неаннотированные домены или домены с неизвестными функциями. В результате для дальнейших исследований было отобрано 48 предсказанных систем. Противовирусная активность 29 новых систем была подтверждена с помощью гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* [149].

Исследование независимо обнаружило связь ретронов с защитой от фагов. Кроме того, было показано, что обратные транскриптазы, не связанные ретронами, также участвуют в защите, и 6 групп RTase были объединены под общим названием DRT (defence-associated RTase — обратные транскриптазы, ассоциированые с защитой). Некоторые DRT ассоциированы со вспомогательными белками, тогда как DRT типа I сливаются с доменом нитрилазы, который часто вовлечён в метаболизм малых молекул [215]. Мутации предсказанных каталитических аминокислотных остатков RTase или нитрилазы приводили к инактивации системы. Транскриптомный анализ определил, что DRT разных типов не мешают экспрессии ранних вирусных генов, в то время как система типа I влияет на накопление поздних вирусных транскриптов. Механизм защиты DRT остаётся невыясненным.

Более детально была изучена система RADAR (Restriction by Adenosine Deaminase Acting on RNA; рестрикция с участием аденозиндеаминазы, воздействующей на РНК). Ядро этой системы образовано ATPазой RdrA и аденозиндеаминазой RdrB, которые могут сопровождаться вспомогательными белками (SLATT или Csx27, которые также участвуют в защите CRISPR типа VI). Анализ транскриптома инфицированных фагами клеток выявил замены А на G в секвенированных ридах, в соответствии с предсказанным RdrB-опосредованным образованием инозина в РНК клетки-хозяина и вирусной РНК. Было показано, что предпочтительными мишенями для редактирования являются вторичные структуры РНК типа шпилек. Инфицирование культуры клеток RADAR+ фагами при высокой множественности инфекции (MOI) приводит к остановке клеточного цикла, что предполагает защитный ответ через механизм Abi. Такое поведение было приписано редактированию транспортно-матричной РНК (тмРНК) хозяина, которая высвобождает рибосомы, «застрявшие» на мРНК в процессе трансляции. Кроме того, было показано, что экспрессия определенных ДНК-связывающих белков фага Т2 запускает редактирование РНК в неинфицированной культуре клеток, что позволяет предположить механизм активации ответа RADAR [149].

NTPase из суперсемейства STAND участвуют в путях передачи сигнала в процессе программированной гибели клеток эукариот [216], однако роль этих белков в клетках прокариот на протяжении долго времени оставалась невыясненной. В обсуждаемой работе было показано, что несколько STAND NTPase проявляют активность в противофаговой защите, и 5 типов таких систем были объединены под общим названием AVAST (AntiViral ATPases/NTPases из суперсемейства STAND). Было обнаружено, что домены NTPase слиты с различными предполагаемыми эффекторными доменами (такими, как нуклеаза, протеаза или SIR2), и было предположено, что они действуют через механизм Abi. Мутационный анализ подтвердил значимость ATPазы и предполагаемых эффекторов защитной системы AVAST [149].

Функциональные домены других новых систем включают нуклеазы (например, было показано, что DUF4297 из системы Lamassu является нуклеазой, участвующей также в CBASS), хеликазы, SIR2, ДНК-связывающие белки, фосфатазы и ATPазы, а также множество неаннотированных доменов [149, 207, 208, 217]. Например, крупная система Druantia состоит в основном из генов с неизвестными функциями. Эти открытия существенно расширили наши представления о многообразии биохимических активностей, которые могут быть задействованы при защите клеток от вирусов, и должны проложить путь для дальнейших экспериментальных исследований новых механизмов защиты.

выводы

Взаимодействие вирусов со своими хозяевами – это динамичный процесс, который приводит к созданию множества стратегий нападения и защиты. Гены прокариот, связанные с устойчивостью к фагам, являются одними из наиболее быстро эволюционирующих, и высокая скорость обновления прокариотических адаптаций, сопровождаемая вирусными контрадаптациями, часто описывается в терминах гипотезы Красной Королевы – каждая из сторон, принимающих участие в этой гонке вооружений, обязана приобретать новые адаптации лишь для сохранения «статуса кво» [218, 219]. Долгосрочные эволюционные исследования показывают, что скорость накопления мутаций выше в том случае, когда фаг эволюционирует вместе с клеткой-хозяином, по сравнению с ситуацией, когда фаг эволюционирует, в то время как клетка-хозяин сохраняет свой генотип [220, 221]. Одним из примеров, на котором можно оценить динамику этих взаимодействий, является конфронтация элементов PLE клеток V. cholerae с фагом ICP1. Используя образцы V. cholera, собранные начиная с 1940-х годов, можно проследить историю этого соревнования: 5 различных типов PLE последовательно сменяли друг друга, предположительно, избегая защиты со стороны системы CRISPR-Cas, кодируемой фагом ICP1 [199, 205].

Лишь в последние годы мы начали осознавать реальное обилие защитных систем и разнообразие их механизмов действия. Это сразу ставит вопрос о том, как наличие нескольких защитных систем у отдельной бактерии влияет на её выживаемость и устойчивость к фагам? Некоторые защитные системы являются высоко специфичными, в то время как другие могут воздействовать на несколько фагов как, например, некоторые системы Abi, которые улавливают общие нарушения метаболизма хозяина, или системы, основанные на распознавании ДНК, которые могут адаптироваться или мутировать для взаимодействия с новыми последовательностями [3, 222]. Защитные системы оказывают действие на различные стадии жизненного цикла вирусов, и, в целом, можно обозначить три основных линии защиты: системы, которые влияют на поверхность клетки, чтобы предотвратить адсорбцию фага и проникновение его генома; системы, которые разрушают генетический материал фага и системы, которые индуцируют клеточную смерть или остановку клеточного цикла в том случае, если фаг избежал действия первых двух линий защиты. Можно предположить, что одновременное присутствие различных защитных систем в одной клетке повышает шансы клетки на выживание и расширяет круг таргетируемых паразитов. Известно даже, что некоторые защитные системы действуют совместно. Например, деградация ДНК системами R-М типа I приводит к образованию пула фрагментов ДНК, которые могут быть использованы как предшественники спейсеров для системы CRISPR-Cas [64, 223, 224], или системы Abi, такие как PrrC и ретрон Ec48, использующие «охранную» стратегию и активируемые только в том случае, если фаг вмешивается в функции других защитных систем [146]. В то же время наличие защитных систем требует от клетки-хозяина определенных расходов: при отсутствии фаговой инфекции экспрессия защитных генов требует траты энергии, а их неспецифическая активность часто бывает опасна для самой клетки [110, 219, 225]. Таким образом, баланс между преимуществами, которые дают системы противовирусной защиты, и сопутствующими затратами определяет количество защитных систем в геноме и распространенность конкретных систем защиты. В условиях низкого давления со стороны фагов защитные системы могут быть утрачены, и их сохранению в популяции способствуют активный горизонтальный перенос генов (HGT), подавление экспрессии и фазовые вариации [226, 227].

Новые открытия позволили выделить дополнительные особенности систем защиты, ранее не столь очевидные.

 Между различными защитными системами может происходить обмен функциональными модулями, и сходные белковые домены могут быть вовлечены в различные типы защиты [208]. Например, модуль модификации системы Dnd может быть ассоциирован с эффекторами DndFGH или PblABCDE, нуклеаза NucC может быть ассоциирована с CBASS или CRISPR-Cas типа III, а домены TIR обнаруживаются в CBASS и Thoeris и т.д. [161, 210, 228].

– Наличие защитных систем характерно не только для прокариотических геномов. Так, МGE различного вида широко используют системы защиты в конфликтах между собой или для подавления клетки-хозяина [205, 226]. Например, недавно при метагеномном исследовании гигантских фагов было обнаружено множество локусов CRISPR со спейсерами, нацеленными на другие фаги [229].

– Было показано, что белки, характерные для систем иммунитета эукариот, выполняют аналогичные функции у прокариот, например, cGAS, pAgo, STING, TIR, STAND [105, 149, 151, 158, 210]. Недавняя работа Burroughs и Arravind [208] расширяет этот список, показывая, что гомологи Wnt, YEATS, TPR-S и других доменов встречаются в прокариотических островках защиты. Филогенетический анализ этих доменов указывает на прокариотическое происхождение, и это позволяет предположить, что некоторые иммунные механизмы возникли ещё до ответвления эукариот и были унаследованы последними.

Финансирование. Выполнение данной работы проходило при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-14-50560). АИ поддержан грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-34-90160), ОМ поддержана грантом Российского научного фонда (№ 19-74-00118). Оплата открытого доступа английской версии статьи: Сколковский Институт Науки и Технологий.

Вклад авторов. ОМ и АИ написали раздел CRISPR-Cas, АИ подготовил остальную часть статьи, АИ и ОМ подготовили рисунки, КС отредактировал текст.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Андрею Кульбачинскому за критическое прочтение раздела, посвящённого белку pAgo.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jansen, R., Embden, J. D. A., van Gaastra, W., and Schouls, L. M. (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes, *Mol. Microbiol.*, 43, 1565-1575.
- Mojica, F. J. M., and Garrett, R. A. (2013) Discovery and seminal developments in the CRISPR field, In *CRISPR-Cas Systems*, Springer, pp. 1-31.
- Nussenzweig, P. M., and Marraffini, L. A. (2020) Molecular mechanisms of CRISPR-Cas immunity in bacteria, *Annu. Rev. Genet.*, 54, 93-120.
 Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A.,
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., et al. (2020) Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants, *Nat. Rev. Microbiol.*, 18, 67-83.
- Jackson, R. N., and Wiedenheft, B. (2015) A conserved structural chassis for mounting versatile CRISPR RNAguided immune responses, *Mol. Cell*, 58, 722-728.
- Liu, T. Y., and Doudna, J. A. (2020) Chemistry of Class 1 CRISPR-Cas effectors: binding, editing, and regulation, *J. Biol. Chem.*, 295, 14473-14487.
- Reeks, J., Graham, S., Anderson, L., Liu, H., White, M. F., and Naismith, J. H. (2013) Structure of the archaeal Cascade subunit Csa5: relating the small subunits of CRISPR effector complexes, *RNA Biol.*, 10, 762-769.
- Jore, M. M., Lundgren, M., van Duijn, E., Bultema, J. B., Westra, E. R., et al. (2011) Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 529-536.
- 9. Wiedenheft, B., Lander, G. C., Zhou, K., Jore, M. M., Brouns, S.J. J., et al. (2011) Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system, *Nature*, **477**, 486-489.
- Sinkunas, T., Gasiunas, G., Waghmare, S. P., Dickman, M. J., Barrangou, R., et al. (2013) *In vitro* reconstitution of Cascade-mediated CRISPR immunity in *Streptococcus thermophilus*, *EMBO J.*, **32**, 385-394.
- 11. Benda, C., Ebert, J., Scheltema, R. A., Schiller, H. B., Baumgärtner, M., et al. (2014) Structural model of a CRISPR RNA-silencing complex reveals the RNA-target cleavage activity in Cmr4, *Mol. Cell*, **56**, 43-54.
- Rouillon, C., Zhou, M., Zhang, J., Politis, A., Beilsten-Edmands, V., et al. (2013) Structure of the CRISPR interference complex CSM reveals key similarities with cascade, *Mol. Cell*, 52, 124-134.
- Hale, C. R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M. O., Graveley, B. R., Wells, L., et al. (2009) RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex, *Cell*, 139, 945-956.
- 14. Zhang, J., Kasciukovic, T., and White, M. F. (2012) The CRISPR associated protein Cas4 Is a 5' to 3' DNA exonuclease with an iron-sulfur cluster, *PLoS One*, **7**, e47232.
- Elmore, J. R., Sheppard, N. F., Ramia, N., Deighan, T., Li, H., et al. (2016) Bipartite recognition of target RNAs activates DNA cleavage by the Type III-B CRISPR-Cas system, *Genes Dev.*, **30**, 447-459.
- Estrella, M. A., Kuo, F.-T., and Bailey, S. (2016) RNAactivated DNA cleavage by the type III-B CRISPR-Cas effector complex, *Genes Dev.*, **30**, 460-470.
 Kazlauskiene, M., Tamulaitis, G., Kostiuk, G.,
- Kazlauskiene, M., Tamulaitis, G., Kostiuk, G., Venclovas, Č., and Siksnys, V. (2016) Spatiotemporal control of type III-A CRISPR-Cas immunity: coupling DNA degradation with the target RNA recognition, *Mol. Cell*, 62, 295-306.
- Samai, P., Pyenson, N., Jiang, W., Goldberg, G. W., Hatoum-Aslan, A., and Marraffini, L. A. (2015) Co-transcriptional DNA and RNA cleavage during type III CRISPR-Cas immunity, *Cell*, 161, 1164-1174.

- Liu, T., Pan, S., Li, Y., Peng, N., and She, Q. (2017) Type III CRISPR-Cas system: introduction and its application for genetic manipulations, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 26, 1-14.
- Goldberg, G. W., Jiang, W., Bikard, D., and Marraffini, L. A. (2014) Conditional tolerance of temperate phages via transcription-dependent CRISPR-Cas targeting, *Nature*, 514, 633-637.
- Kazlauskiene, M., Kostiuk, G., Venclovas, Č., Tamulaitis, G., and Siksnys, V. (2017) A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems, *Science*, 357, 605-609.
- Niewoehner, O., Garcia-Doval, C., Rostøl, J. T., Berk, C., Schwede, F., et al. (2017) Type III CRISPR-Cas systems produce cyclic oligoadenylate second messengers, *Nature*, 548, 543-548.
- You, L., Ma, J., Wang, J., Artamonova, D., Wang, M., et al. (2019) Structure studies of the CRISPR-Csm complex reveal mechanism of co-transcriptional interference, *Cell*, **176**, 239-253.
- 24. Koonin, E. V, and Makarova, K. S. (2017) Mobile genetic elements and evolution of CRISPR-Cas systems: all the way there and back, *Genome Biol. Evol.*, **9**, 2812-2825.
- 25. Özcan, A., Pausch, P., Linden, A., Wulf, A., Schühle, K., et al. (2019) Type IV CRISPR RNA processing and effector complex formation in Aromatoleum aromaticum, *Nat. Microbiol.*, **4**, 89-96.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., et al. (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems, *Nat. Rev. Microbiol.*, 13, 722-736.
- Koonin, E. V, and Makarova, K. S. (2019) Origins and evolution of CRISPR-Cas systems, *Philos. Trans. R. Soc. B*, 374, 20180087.
- Pinilla-Redondo, R., Mayo-Muñoz, D., Russel, J., Garrett, R. A., Randau, L., et al. (2020) Type IV CRISPR-Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids, *Nucleic Acids Res.*, 48, 2000-2012.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, E2579-E2586.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, 337, 816-821.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., and Zhang, F. (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering, *Cell*, 157, 1262-1278.
- Mali, P., Esvelt, K. M., and Church, G. M. (2013) Cas9 as a versatile tool for engineering biology, *Nat. Methods*, 10, 957-963.
- 33. Sander, J. D., and Joung, J. K. (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 347-355.
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., et al. (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system, *Cell*, 163, 759-771.
- 35. Yamano, T., Zetsche, B., Ishitani, R., Zhang, F., Nishimasu, H., and Nureki, O. (2017) Structural basis for the canonical and non-canonical PAM recognition by CRISPR-Cpf1, *Mol. Cell*, **67**, 633-645.
- Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., et al. (2018) CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity, *Science*, 360, 436-439.

- Harrington, L. B., Burstein, D., Chen, J. S., Paez-Espino, D., Ma, E., et al. (2018) Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes, *Science*, 362, 839-842.
- Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E., and Koonin, E. V (2014) Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems, *Nucleic Acids Res.*, 42, 6091-6105.
- Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., et al. (2015) Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems, *Mol. Cell*, 60, 385-397.
- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., et al. (2016) C2c2 is a singlecomponent programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector, *Science*, **353**, aaf5573, doi: 10.1126/ science.aaf5573.
- 41. Koonin, E. V, and Krupovic, M. (2015) Evolution of adaptive immunity from transposable elements combined with innate immune systems, *Nat. Rev. Genet.*, **16**, 184-192.
- 42. Koonin, E. V, Makarova, K. S., and Zhang, F. (2017) Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems, *Curr. Opin. Microbiol.*, **37**, 67-78.
- Makarova, K. S., and Koonin, E. V (2013) Evolution and classification of CRISPR-Cas systems and cas protein families, in *CRISPR-Cas System*, Springer, pp. 61-91.
- Nuñez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V., Davies, C. W., and Doudna, J. A. (2014) Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 21, 528.
- Nuñez, J. K., Harrington, L. B., Kranzusch, P. J., Engelman, A. N., and Doudna, J. A. (2015) Foreign DNA capture during CRISPR-Cas adaptive immunity, *Nature*, 527, 535-538.
- Brouns, S. J. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J. H., et al. (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes, *Science*, **321**, 960-964.
- 47. Yosef, I., Goren, M. G., and Qimron, U. (2012) Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 5569-5576.
- Datsenko, K. A., Pougach, K., Tikhonov, A., Wanner, B. L., Severinov, K., and Semenova, E. (2012) Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system, *Nat. Commun.*, 3, 1-7.
- Vorontsova, D., Datsenko, K. A., Medvedeva, S., Bondy-Denomy, J., Savitskaya, E. E., et al. (2015) Foreign DNA acquisition by the IF CRISPR-Cas system requires all components of the interference machinery, *Nucleic Acids Res.*, 43, 10848-10860.
- 50. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., et al. (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III, *Nature*, **471**, 602-607.
- Sapranauskas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2011) The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli, Nucleic Acids Res., 39, 9275-9282.
- Hatoum-Aslan, A., Maniv, I., Samai, P., and Marraffini, L. A. (2014) Genetic characterization of antiplasmid immunity through a type III-A CRISPR-Cas system, *J. Bacteriol.*, **196**, 310-317.
- 53. Babu, M., Beloglazova, N., Flick, R., Graham, C., Skarina, T., et al. (2011) A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antivirus immunity and DNA repair, *Mol. Microbiol.*, **79**, 484-502.
- 54. Wiedenheft, B., Zhou, K., Jinek, M., Coyle, S. M., Ma, W., and Doudna, J. A. (2009) Structural basis for

DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense, *Structure*, **17**, 904-912.

- 55. Beloglazova, N., Lemak, S., Flick, R., and Yakunin, A. F. (2015) Analysis of nuclease activity of Cas1 proteins against complex DNA substrates, in *CRISPR*, Springer, pp. 251-264.
- Nam, K. H., Ding, F., Haitjema, C., Huang, Q., DeLisa, M. P., and Ke, A. (2012) Double-stranded endonuclease activity in Bacillus halodurans clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated Cas2 protein, J. Biol. Chem., 287, 35943-35952.
- 57. Dixit, B., Ghosh, K. K., Fernandes, G., Kumar, P., Gogoi, P., and Kumar, M. (2016) Dual nuclease activity of a Cas2 protein in CRISPR-Cas subtype I-B of *Leptospira interrogans*, *FEBS Lett.*, **590**, 1002-1016.
- Savitskaya, E. E., Musharova, O. S., and Severinov, K. V (2016) Diversity of CRISPR-Cas-mediated mechanisms of adaptive immunity in prokaryotes and their application in biotechnology, *Biochemistry (Moscow)*, 81, 653-661.
 Mizuuchi, K., and Adzuma, K. (1991) Inversion of the
- 59. Mizuuchi, K., and Adzuma, K. (1991) Inversion of the phosphate chirality at the target site of Mu DNA strand transfer: evidence for a one-step transesterification mechanism, *Cell*, **66**, 129-140.
- Krupovic, M., Makarova, K. S., Forterre, P., Prangishvili, D., and Koonin, E. V (2014) Casposons: a new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity, *BMC Biol.*, 12, 36.
- Béguin, P., Charpin, N., Koonin, E. V., Forterre, P., and Krupovic, M. (2016) Casposon integration shows strong target site preference and recapitulates protospacer integration by CRISPR-Cas systems, *Nucleic Acids Res.*, 44, 10367-10376.
- Rollie, C., Graham, S., Rouillon, C., and White, M. F. (2018) Prespacer processing and specific integration in a type IA CRISPR system, *Nucleic Acids Res.*, 46, 1007-1020.
- Levy, A., Goren, M. G., Yosef, I., Auster, O., Manor, M., et al. (2015) CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA, *Nature*, **520**, 505-510.
- Weissman, J. L., Stoltzfus, A., Westra, E. R., and Johnson, P. L. F. (2020) Avoidance of Self during CRISPR Immunization, *Trends Microbiol.*, 28, 543-553, doi: 10.1016/j.tim.2020.02.005.
- 65. Dorman, C. J., and Bhriain, N. N. (2020) CRISPR-Cas, DNA supercoiling, and nucleoid-associated proteins, *Trends Microbiol.*, **28**, 19-27.
- 66. Kurilovich, E., Shiriaeva, A., Metlitskaya, A., Morozova, N., Ivancic-Bace, I., et al. (2019) Genome maintenance proteins modulate autoimmunity mediated primed adaptation by the *Escherichia coli* type IE CRISPR-cas system, *Genes (Basel)*, **10**, 872.
- 67. Radovčić, M., Killelea, T., Savitskaya, E., Wettstein, L., Bolt, E. L., and Ivančić-Baće, I. (2018) CRISPR-Cas adaptation in *Escherichia coli* requires RecBCD helicase but not nuclease activity, is independent of homologous recombination, and is antagonized by 5' ssDNA exonucleases, *Nucleic Acids Res.*, 46, 10173-10183.
- Ivančić-Baće, I., Cass, S. D., Wearne, S. J., and Bolt, E. L. (2015) Different genome stability proteins underpin primed and naive adaptation in *E. coli* CRISPR-Cas immunity, *Nucleic Acids Res.*, 43, 10821-10830.
- 69. Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonté, J., Fremaux, C., et al. (2008) Phage response to CRISPRencoded resistance in *Streptococcus thermophilus*, *J. Bacteriol.*, **190**, 1390-1400.
- 70. Semenova, E., Jore, M. M., Datsenko, K. A., Semenova, A., Westra, E. R., et al. (2011) Interference by

clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 10098-10103.

- Fineran, P. C., Gerritzen, M. J. H., Suárez-Diez, M., Künne, T., Boekhorst, J., et al. (2014) Degenerate target sites mediate rapid primed CRISPR adaptation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E1629-E1638.
- Westra, E. R., Semenova, E., Datsenko, K. A., Jackson, R. N., Wiedenheft, B., et al. (2013) Type IE CRISPR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition, *PLoS Genet.*, 9, e1003742.
- Richter, C., Dy, R. L., McKenzie, R. E., Watson, B. N. J., Taylor, C., et al. (2014) Priming in the Type IF CRISPR-Cas system triggers strand-independent spacer acquisition, bi-directionally from the primed protospacer, *Nucleic Acids Res.*, 42, 8516-8526.
- Garrett, S., Shiimori, M., Watts, E. A., Clark, L., Graveley, B. R., and Terns, M. P. (2020) Primed CRISPR DNA uptake in *Pyrococcus furiosus*, *Nucleic Acids Res.*, 48, 6120-6135.
- Li, M., Wang, R., and Xiang, H. (2014) Haloarcula hispanica CRISPR authenticates PAM of a target sequence to prime discriminative adaptation, Nucleic Acids Res., 42, 7226-7235.
- Rao, C., Chin, D., and Ensminger, A. W. (2017) Priming in a permissive type IC CRISPR-Cas system reveals distinct dynamics of spacer acquisition and loss, *RNA*, 23, 1525-1538.
- Almendros, C., Nobrega, F. L., McKenzie, R. E., and Brouns, S. J. J. (2019) Cas4–Cas1 fusions drive efficient PAM selection and control CRISPR adaptation, *Nucleic Acids Res.*, 47, 5223-5230.
- Nussenzweig, P. M., McGinn, J., and Marraffini, L. A. (2019) Cas9 cleavage of viral genomes primes the acquisition of new immunological memories, *Cell Host Microbe*, 26, 515-526.
- Savitskaya, E., Semenova, E., Dedkov, V., Metlitskaya, A., and Severinov, K. (2013) High-throughput analysis of type IE CRISPR/Cas spacer acquisition in *E. coli, RNA Biol.*, 10, 716-725.
- Xue, C., Seetharam, A. S., Musharova, O., Severinov, K., Brouns, S. J., et al. (2015) CRISPR interference and priming varies with individual spacer sequences, *Nucleic Acids Res.*, 43, 10831-10847.
- Künne, T., Kieper, S. N., Bannenberg, J. W., Vogel, A. I. M., Miellet, W. R., et al. (2016) Cas3-derived target DNA degradation fragments fuel primed CRISPR adaptation, *Mol. Cell*, 63, 852-864.
- Dillard, K. E., Brown, M. W., Johnson, N. V., Xiao, Y., Dolan, A., et al. (2018) Assembly and translocation of a CRISPR-Cas primed acquisition complex, *Cell*, 175, 934-946.
- Redding, S., Sternberg, S. H., Marshall, M., Gibb, B., Bhat, P., et al. (2015) Surveillance and processing of foreign DNA by the *Escherichia coli* CRISPR-Cas system, *Cell*, 163, 854-865.
- Sashital, D. G., Wiedenheft, B., and Doudna, J. A. (2012) Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system, *Mol. Cell*, 46, 606-615.
- Semenova, E., Savitskaya, E., Musharova, O., Strotskaya, A., Vorontsova, D., et al. (2016) Highly efficient primed spacer acquisition from targets destroyed by the *Escherichia coli* type IE CRISPR-Cas interfering complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 7626-7631.
- Severinov, K., Ispolatov, I., and Semenova, E. (2016) The influence of copy-number of targeted extrachromosomal genetic elements on the outcome of CRISPR-Cas defense, *Front. Mol. Biosci.*, 3, 45.

- Shabalina, S., and Koonin, E. (2008) Origins and evolution of eukaryotic RNA interference, *Trends Ecol. Evol.*, 23, 578-587.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., van der Oost, J., and Koonin, E. V. (2009) Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements., *Biol. Direct*, 4, 29.
- Willkomm, S., Makarova, K. S., and Grohmann, D. (2018) DNA silencing by prokaryotic Argonaute proteins adds a new layer of defense against invading nucleic acids, *FEMS Microbiol. Rev.*, 42, 376-387.
- Kuzmenko, A., Oguienko, A., Esyunina, D., Yudin, D., Petrova, M., et al. (2020) DNA targeting and interference by a bacterial Argonaute nuclease, *Nature*, 587, 632-637, doi: 10.1038/s41586-020-2605-1.
- Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Tuschl, T., and Patel, D. J. (2008) Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex, *Nature*, 456, 921-926.
 Olovnikov, I., Chan, K., Sachidanandam, R., Newman, D.
- 92. Olovnikov, I., Chan, K., Sachidanandam, R., Newman, D. K., and Aravin, A. A. (2013) Bacterial argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA, *Mol. Cell*, 51, 594-605.
- Lisitskaya, L., Aravin, A. A., and Kulbachinskiy, A. (2018) DNA interference and beyond: structure and functions of prokaryotic Argonaute proteins, *Nat. Commun.*, 9, 1-12.
- 94. Swarts, D. C., Hegge, J. W., Hinojo, I., Shiimori, M., Ellis, M. A., et al. (2015) Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA-guided nuclease that targets cognate DNA, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 5120-5129.
- 95. Kuzmenko, A., Yudin, D., Ryazansky, S., Kulbachinskiy, A., and Aravin, A. A. (2019) Programmable DNA cleavage by Ago nucleases from mesophilic bacteria *Clostridium butyricum* and *Limnothrix rosea*, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 5822-5836.
- 96. Yuan, Y.-R., Pei, Y., Ma, J.-B., Kuryavyi, V., Zhadina, M., et al. (2005) Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage, *Mol. Cell*, 19, 405-419.
- Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Wardle, G. S., et al. (2009) Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes, *Nature*, **461**, 754-761.
 Kaya, E., Doxzen, K. W., Knoll, K. R., Wilson, R. C.,
- 98. Kaya, E., Doxzen, K. W., Knoll, K. R., Wilson, R. C., Strutt, S. C., et al. (2016) A bacterial Argonaute with noncanonical guide RNA specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 113, 4057-4062.
- 99. Willkomm, S., Zander, A., Gust, A., and Grohmann, D. (2015) A prokaryotic twist on argonaute function, *Life*, **5**, 538-553.
- Swarts, D. C., Jore, M. M., Westra, E. R., Zhu, Y., Janssen, J. H., et al. (2014) DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute, *Nature*, 507, 258-261.
- 101. Ryazansky, S., Kulbachinskiy, A., and Aravin, A. A. (2018) The expanded universe of prokaryotic Argonaute proteins, *MBio*, 9, e01935-18, doi: 10.1128/mBio.01935-18.
- 102. Zander, A., Willkomm, S., Ofer, S., Van Wolferen, M., Egert, L., et al. (2017) Guide-independent DNA cleavage by archaeal Argonaute from *Methanocaldococcus jannaschii*, *Nat. Microbiol.*, 2, 1-10.
- 103. Swarts, D. C., Szczepaniak, M., Sheng, G., Chandradoss, S. D., Zhu, Y., et al. (2017) Autonomous generation and loading of DNA guides by bacterial Argonaute, *Mol. Cell*, 65, 985-998.
- 104. Jolly, S. M., Gainetdinov, I., Jouravleva, K., Zhang, H., Strittmatter, L., et al. (2020) *Thermus thermophilus* Argonaute functions in the completion of DNA replication, *Cell*, **182**, 1545-1559.

- 105. Koonin, E. V. (2017) Evolution of RNA- and DNA-guided antivirus defense systems in prokaryotes and eukaryotes: common ancestry vs convergence, *Biol. Direct*, **12**, 1-14.
- 106. Chopin, M.-C., Chopin, A., and Bidnenko, E. (2005) Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme, *Curr. Opin. Microbiol.*, 8, 473-9.
- 107. Lopatina, A., Tal, N., and Sorek, R. (2020) Abortive infection: bacterial suicide as an antiviral immune strategy, *Annu. Rev. Virol.*, 7, 371-384.
- Labrie, S. J., Samson, J. E., and Moineau, S. (2010) Bacteriophage resistance mechanisms, *Nat. Rev. Microbiol.*, 8, 317-327.
- 109. Fukuyo, M., Sasaki, A., and Kobayashi, I. (2012) Success of a suicidal defense strategy against infection in a structured habitat, *Sci. Rep.*, **2**, 238.
- 110. Van Houte, S., Buckling, A., and Westra, E. R. (2016) Evolutionary ecology of prokaryotic immune mechanisms, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 80, 745-763.
- 111. Barrangou, R., and Horvath, P. (2011) Lactic acid bacteria defenses against phages, in *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*, Springer, pp. 459-478.
- 112. Durmaz, E., and Klaenhammer, T. R. (2007) Abortive phage resistance mechanism AbiZ speeds the lysis clock to cause premature lysis of phage-infected *Lactococcus lactis*, *J. Bacteriol.*, **189**, 1417-1425.
- 113. Wang, C., Villion, M., Semper, C., Coros, C., Moineau, S., and Zimmerly, S. (2011) A reverse transcriptase-related protein mediates phage resistance and polymerizes untemplated DNA *in vitro*, *Nucleic Acids Res.*, 39, 7620-7629.
- 114. Tangney, M., and Fitzgerald, G. F. (2002) Effectiveness of the lactococcal abortive infection systems AbiA, AbiE, AbiF and AbiG against P335 type phages, *FEMS Microbiol. Lett.*, **210**, 67-72.
- 115. Parreira, R., Ehrlich, S. D., and Chopin, M. (1996) Dramatic decay of phage transcripts in lactococcal cells carrying the abortive infection determinant AbiB, *Mol. Microbiol.*, **19**, 221-230.
- 116. Samson, J. E., Spinelli, S., Cambillau, C., and Moineau, S. (2013) Structure and activity of AbiQ, a lactococcal endoribonuclease belonging to the type III toxin-antitoxin system, *Mol. Microbiol.*, 87, 756-768.
- 117. Bidnenko, E., Ehrlich, D., and Chopin, M.-C. (1995) Phage operon involved in sensitivity to the *Lactococcus lactis* abortive infection mechanism AbiD1, *J. Bacteriol.*, 177, 3824-3829.
- 118. Bouchard, J. D., Dion, E., Bissonnette, F., and Moineau, S. (2002) Characterization of the two-component abortive phage infection mechanism AbiT from *Lactococcus lactis, J. Bacteriol.*, **184**, 6325-6332.
- Haaber, J., Samson, J. E., Labrie, S. J., Campanacci, V., Cambillau, C., et al. (2010) Lactococcal abortive infection protein AbiV interacts directly with the phage protein SaV and prevents translation of phage proteins, *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 7085-7092.
- 120. Depardieu, F., Didier, J.-P., Bernheim, A., Sherlock, A., Molina, H., et al. (2016) A eukaryotic-like serine/threonine kinase protects staphylococci against phages, *Cell Host Microbe*, **20**, 471-481.
- Snyder, L. (1995) Phage-exclusion enzymes: a bonanza of biochemical and cell biology reagents? *Mol. Microbiol.*, 15, 415-20.
- 122. Yu, Y. T., and Snyder, L. (1994) Translation elongation factor Tu cleaved by a phage-exclusion system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 802-806.
- 123. Levitz, R., Chapman, D., Amitsur, M., Green, R., Snyder, L., and Kaufmann, G. (1990) The optional *E. coli* prr locus encodes a latent form of phage T4-induced anticodon nuclease, *EMBO J.*, 9, 1383-1389.

- 124. Cheng, X., Wang, W., and Molineux, I. J. (2004) F exclusion of bacteriophage T7 occurs at the cell membrane, *Virology*, **326**, 340-352.
- 125. Schmitt, C. K., Kemp, P., and Molineux, I. J. (1991) Genes 1.2 and 10 of bacteriophages T3 and T7 determine the permeability lesions observed in infected cells of *Escherichia coli* expressing the F plasmid gene pifA, *J. Bacteriol.*, **173**, 6507-6514.
- 126. Toothman, P., and Herskowitz, I. (1980) Rex-dependent exclusion of lambdoid phages II. Determinants of sensitivity to exclusion, *Virology*, **102**, 147-160.
- 127. Parma, D. H., Snyder, M., Sobolevski, S., Nawroz, M., Brody, E., and Gold, L. (1992) The Rex system of bacteriophage lambda: tolerance and altruistic cell death, *Genes Dev.*, 6, 497-510.
- 128. Yamaguchi, Y., Park, J.-H., and Inouye, M. (2011) Toxin–antitoxin systems in bacteria and archaea, *Annu. Rev. Genet.*, **45**, 61-79.
- Page, R., and Peti, W. (2016) Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence, *Nat. Chem. Biol.*, 12, 208-214.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., and Koonin, E. V. (2013) Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria, *Nucleic Acids Res.*, 41, 4360-4377.
- Harms, A., Brodersen, D. E., Mitarai, N., and Gerdes, K. (2018) Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin–antitoxin biology, *Mol. Cell*, **70**, 768-784.
- 132. Fineran, P. C., Blower, T. R., Foulds, I. J., Humphreys, D. P., Lilley, K. S., and Salmond, G. P. C. (2009) The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 894-899.
- 133. Short, F. L., Akusobi, C., Broadhurst, W. R., and Salmond, G. P. C. (2018) The bacterial Type III toxin–antitoxin system, ToxIN, is a dynamic protein–RNA complex with stability-dependent antiviral abortive infection activity, *Sci. Rep.*, 8, 1-10.
- 134. Koga, M., Otsuka, Y., Lemire, S., and Yonesaki, T. (2011) Escherichia coli rnlA and rnlB compose a novel toxin–antitoxin system, *Genetics*, 187, 123-130.
- 135. Otsuka, Y., and Yonesaki, T. (2012) Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnlA toxins, *Mol. Microbiol.*, **83**, 669-681.
- 136. Dy, R. L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G. P. C., and Fineran, P. C. (2014) A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a type IV toxin-antitoxin mechanism, *Nucleic Acids Res.*, 42, 4590-4605.
- 137. Cai, Y., Usher, B., Gutierrez, C., Tolcan, A., Mansour, M., Fineran, P. C., et al. (2020) A nucleotidyltransferase toxin inhibits growth of *Mycobacterium tuberculosis* through inactivation of tRNA acceptor stems, *Sci. Adv.*, 6, eabb6651.
- 138. Hampton, H. G., Smith, L. M., Ferguson, S., Meaden, S., Jackson, S. A., and Fineran, P. C. (2020) Functional genomics reveals the toxin–antitoxin repertoire and AbiE activity in *Serratia*, *Microb. Genom.*, 6, mgen000458, doi: 10.1099/mgen.0.000458.
- 139. Hazan, R., and Engelberg-Kulka, H. (2004) *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1, *Mol. Genet. Genomics*, **272**, 227-234.
- 140. Pecota, D. C., and Wood, T. K. (1996) Exclusion of T4 phage by the hok/sok killer locus from plasmid R1, *J. Bacteriol.*, **178**, 2044-2050.
- 141. Hayes, F. (2003) Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest, *Science*, **301**, 1496-1499.
- 142. Koonin, E. V., Makarova, K. S., and Wolf, Y. I. (2017) Evolutionary genomics of defense systems in archaea and bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.*, **71**, 233-261.

- 143. Song, S., and Wood, T. K. (2018) Post-segregational killing and phage inhibition are not mediated by cell death through toxin/antitoxin systems, *Front. Microbiol.*, 9, 814.
- 144. Sberro, H., Fremin, B. J., Zlitni, S., Edfors, F., Greenfield, N., et al. (2019) Large-scale analyses of human microbiomes reveal thousands of small, novel genes, *Cell*, 178, 1245-1259.e14.
- 145. Simon, A. J., Ellington, A. D., and Finkelstein, I. J. (2019) Retrons and their applications in genome engineering, *Nucleic Acids Res.*, 47, 11007-11019.
- 146. Millman, A., Bernheim, A., Stokar-Avihail, A., Fedorenko, T., Voichek, M., et al. (2020) Bacterial retrons function in anti-phage defense, *Cell*, **183**, 1551-1561.e12, doi: 10.1016/j.cell.2020.09.065.
- 147. Bobonis, J., Mitosch, K., Mateus, A., Kritikos, G., Elfenbein, J. R., et al. (2020) Phage proteins block and trigger retron toxin/antitoxin systems, *BioRxiv*, doi: 10.1101/2020.06.22.160242.
- 148. Bobonis, J., Mateus, A., Pfalz, B., Garcia-Santamarina, S., Galardini, M., et al. (2020) Bacterial retrons encode tripartite toxin/antitoxin systems, *BioRxiv*, doi: 10.1101/2020.06.22.160168.
- 149. Gao, L., Altae-Tran, H., Böhning, F., Makarova, K. S., Segel, M., et al. (2020) Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes, *Science*, **369**, 1077-1084.
- 150. Burroughs, A. M., Zhang, D., Schäffer, D. E., Iyer, L. M., and Aravind, L. (2015) Comparative genomic analyses reveal a vast, novel network of nucleotide-centric systems in biological conflicts, immunity and signaling, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 10633-10654.
- 151. Cohen, D., Melamed, S., Millman, A., Shulman, G., Oppenheimer-Shaanan, Y., et al. (2019) Cyclic GMP-AMP signalling protects bacteria against viral infection, *Nature*, 574, 691-695.
- 152. Whiteley, A. T., Eaglesham, J. B., de Oliveira Mann, C. C., Morehouse, B. R., Lowey, B., et al. (2019) Bacterial cGAS-like enzymes synthesize diverse nucleotide signals, *Nature*, 567, 194-199.
- 153. Millman, A., Melamed, S., Amitai, G., and Sorek, R. (2020) Diversity and classification of cyclic-oligonucleotide-based anti-phage signalling systems, *Nat. Microbiol.*, 5, 1608-1615, doi: 10.1038/s41564-020-0777-y.
- 154. Ablasser, A., and Chen, Z. J. (2019) cGAS in action: expanding roles in immunity and inflammation, *Science*, 363, eaat8657, doi: 10.1126/science.aat8657.
 155. Davies, B. W., Bogard, R. W., Young, T. S., and
- 155. Davies, B. W., Bogard, R. W., Young, T. S., and Mekalanos, J. J. (2012) Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence, *Cell*, **149**, 358-370.
- 156. Severin, G. B., Ramliden, M. S., Hawver, L. A., Wang, K., Pell, M. E., et al. (2018) Direct activation of a phospholipase by cyclic GMP-AMP in El Tor *Vibrio cholerae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E6048-E6055.
- 157. Yoon, S. H., and Waters, C. M. (2021) The ever-expanding world of bacterial cyclic oligonucleotide second messengers, *Curr. Opin. Microbiol.*, **60**, 96-103.
- 158. Morehouse, B. R., Govande, A. A., Millman, A., Keszei, A. F. A., Lowey, B., et al. (2020) STING cyclic dinucleotide sensing originated in bacteria, *Nature*, 586, 429-433.
- 159. Ye, Q., Lau, R. K., Mathews, I. T., Birkholz, E. A., Watrous, J. D., et al. (2020) HORMA domain proteins and a Trip13-like ATPase regulate bacterial cGAS-like enzymes to mediate bacteriophage immunity, *Mol. Cell*, 77, 709-722.e7.
- Rosenberg, S. C., and Corbett, K. D. (2015) The multifaceted roles of the HORMA domain in cellular signaling, *J. Cell Biol.*, 211, 745-755.

- Lau, R. K., Ye, Q., Birkholz, E. A., Berg, K. R., Patel, L., et al. (2020) Structure and mechanism of a cyclic trinucleotide-activated bacterial endonuclease mediating bacteriophage immunity, *Mol. Cell*, **77**, 723-733.e6.
- riophage immunity, *Mol. Cell*, 77, 723-733.e6.
 162. Lowey, B., Whiteley, A. T., Keszei, A. F. A., Morehouse, B. R., Mathews, I. T., et al. (2020) CBASS immunity uses CARF-related effectors to sense 3'-5'-and 2'-5'-linked cyclic oligonucleotide signals and protect bacteria from phage infection, *Cell*, 182, 38-49.
- 163. Casjens, S. (2003) Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol. Microbiol.*, **49**, 277-300.
- 164. Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A., and Brüssow, H. (2003) Prophage genomics, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67, 238-276.
- 165. Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., et al. (2016) Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms, *ISME J.*, 10, 2854-2866.
- 166. Dedrick, R. M., Jacobs-Sera, D., Bustamante, C. A. G., Garlena, R. A., Mavrich, T. N., et al. (2017) Prophagemediated defence against viral attack and viral counterdefence, *Nat. Microbiol.*, 2, 1-13.
- 167. Roux, S., Krupovic, M., Daly, R. A., Borges, A. L., Nayfach, S., et al. (2019) Cryptic inoviruses revealed as pervasive in bacteria and archaea across Earth's biomes, *Nat. Microbiol.*, 4, 1895-1906.
- Benler, S., and Koonin, E. V (2020) Phage lysis-lysogeny switches and programmed cell death: danse macabre, *BioEssays*, 42, e2000114, doi: 10.1002/bies.202000114.
- Waldor, M. K., and Friedman, D. I. (2005) Phage regulatory circuits and virulence gene expression, *Curr. Opin. Microbiol.*, 8, 459-465.
- 170. Juhala, R. J., Ford, M. E., Duda, R. L., Youlton, A., Hatfull, G. F., and Hendrix, R. W. (2000) Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdoid bacteriophages, *J. Mol. Biol.*, **299**, 27-51.
- 171. Taylor, V. L., Fitzpatrick, A. D., Islam, Z., and Maxwell, K. L. (2019) The diverse impacts of phage morons on bacterial fitness and virulence, in *Advances in Virus Research*, Elsevier, Vol. 103, pp. 1-31.
- 172. Newton, G. J., Daniels, C., Burrows, L. L., Kropinski, A. M., Clarke, A. J., and Lam, J. S. (2001) Three-component-mediated serotype conversion in Pseudomonas aeruginosa by bacteriophage D3, *Mol. Microbiol.*, **39**, 1237-1247.
- 173. Krylov, S. V, Kropinski, A. M., Shaburova, O. V, Miroshnikov, K. A., Chesnokova, E. N., and Krylov, V. N. (2013) New temperate *Pseudomonas aeruginosa* phage, phi297: specific features of genome structure, *Russ. J. Genet.*, 49, 806-818.
 174. Taylor, V. L., Hoage, J. F. J., Thrane, S. W., Huszczynski,
- 174. Taylor, V. L., Hoage, J. F. J., Thrane, S. W., Huszczynski, S. M., Jelsbak, L., and Lam, J. S. (2016) A bacteriophageacquired O-antigen polymerase (Wzyβ) from *P. aeruginosa* serotype O16 performs a varied mechanism compared to its cognate Wzyα, *Front. Microbiol.*, 7, 393.
- 175. Lehane, A. M., Korres, H., and Verma, N. K. (2005) Bacteriophage-encoded glucosyltransferase GtrII of *Shigella flexneri*: membrane topology and identification of critical residues, *Biochem. J.*, **389**, 137-143.
- 176. Perry, L. L., SanMiguel, P., Minocha, U., Terekhov, A. I., Shroyer, M. L., et al. (2009) Sequence analysis of *Escherichia coli* O157: H7 bacteriophage ΦV10 and identification of a phage-encoded immunity protein that modifies the O157 antigen, *FEMS Microbiol. Lett.*, **292**, 182-186.
- 177. Gentile, G. M., Wetzel, K. S., Dedrick, R. M., Montgomery, M. T., Garlena, R. A., et al. (2019) More evidence of collusion: a new prophage-mediated viral defense

system encoded by mycobacteriophage sbash, *MBio*, **10**, e00196-19, doi: 10.1128/mBio.00196-19.

- 178. Montgomery, M. T., Guerrero Bustamante, C. A., Dedrick, R. M., Jacobs-Sera, D., and Hatfull, G. F. (2019) Yet more evidence of collusion: a new viral defense system encoded by gordonia phage carolann, *MBio*, **10**, 1-18.
- 179. Jimmy, S., Saha, C. K., Kurata, T., Stavropoulos, C., Oliveira, S. R. A., et al. (2020) A widespread toxin-antitoxin system exploiting growth control via alarmone signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 10500-10510.
- Ferullo, D. J., and Lovett, S. T. (2008) The stringent response and cell cycle arrest in *Escherichia coli*, *PLoS Genet.*, 4, e1000300.
- 181. Owen, S. V, Wenner, N., Dulberger, C. L., Rodwell, E. V., Bowers-Barnard, A., et al. (2020) Prophage-encoded phage defence proteins with cognate self-immunity, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.07.13.199331.
- 182. Rousset, F., Dowding, J., Bernheim, A., Rocha, E., and Bikard, D. (2021) Prophage-encoded hotspots of bacterial immune systems, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.01.21. 427644.
- 183. Atanasiu, C., Su, T. J., Sturrock, S. S., and Dryden, D. T. F. (2002) Interaction of the ocr gene 0.3 protein of bacteriophage T7 with EcoKl restriction/modification enzyme, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3936-3944.
- 184. Isaev, A., Drobiazko, A., Sierro, N., Gordeeva, J., Yosef, I., et al. (2020) Phage T7 DNA mimic protein Ocr is a potent inhibitor of BREX defence, *Nucleic Acids Res.*, 48, 5397-5406.
- 185. Penadés, J. R., and Christie, G. E. (2015) The phageinducible chromosomal islands: a family of highly evolved molecular parasites, *Annu. Rev. Virol.*, **2**, 181-201.
- 186. Christie, G. E., and Dokland, T. (2012) Pirates of the Caudovirales, *Virology*, **434**, 210-221.
- Dokland, T. (2019) Molecular piracy: redirection of bacteriophage capsid assembly by mobile genetic elements, *Viruses*, 11, 1003.
- 188. Fillol-Salom, A., Miguel-Romero, L., Marina, A., Chen, J., and Penadés, J. R. (2020) Beyond the CRISPR-Cas safeguard: PICI-encoded innate immune systems protect bacteria from bacteriophage predation, *Curr. Opin. Microbiol.*, 56, 52-58.
- Novick, R. P., Christie, G. E., and Penadés, J. R. (2010) The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.*, 8, 541-551.
- 190. Fillol-Salom, A., Martínez-Rubio, R., Abdulrahman, R. F., Chen, J., Davies, R., and Penadés, J. R. (2018) Phage-inducible chromosomal islands are ubiquitous within the bacterial universe, *ISME J.*, **12**, 2114-2128.
- 191. Mitarai, N. (2020) How pirate phage interferes with helper phage: comparison of the two distinct strategies, *J. Theor. Biol.*, **486**, 110096.
- Novick, R. P. (2019) Pathogenicity islands and their role in staphylococcal biology, *Microbiol. Spectr.*, 7, doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0062-2019.
- 193. Tormo-Más, M. Á., Mír, I., Shrestha, A., Tallent, S. M., Campoy, S., Lasa, I., et al. (2010) Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands, *Nature*, **465**, 779-782.
- 194. Mir-Sanchis, I., Martínez-Rubio, R., Martí, M., Chen, J., Lasa, Í., et al. (2012) Control of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island excision, *Mol. Microbiol.*, **85**, 833-845.
- 195. Ram, G., Chen, J., Kumar, K., Ross, H. F., Ubeda, C., et al. (2012) Staphylococcal pathogenicity island interference with helper phage reproduction is a paradigm of molecular parasitism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 16300-5.
- 196. Ram, G., Chen, J., Ross, H. F., and Novick, R. P. (2014) Precisely modulated pathogenicity island interference with

late phage gene transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 14536-14541.

- 197. Martínez-Rubio, R., Quiles-Puchalt, N., Martí, M., Humphrey, S., Ram, G., et al. (2017) Phage-inducible islands in the Gram-positive cocci, *ISME J.*, 11, 1029-1042.
- 198. Fillol-Salom, A., Bacarizo, J., Alqasmi, M., Ciges-Tomas, J. R., Martínez-Rubio, R., et al. (2019) Hijacking the hijackers: *Escherichia coli* pathogenicity islands redirect helper phage packaging for their own benefit, *Mol. Cell*, 75, 1020-1030.
- 199. O'Hara, B. J., Barth, Z. K., McKitterick, A. C., and Seed, K. D. (2017) A highly specific phage defense system is a conserved feature of the *Vibrio cholerae* mobilome, *PLoS Genet.*, 13, 1-17.
- 200. McKitterick, A. C., and Seed, K. D. (2018) Anti-phage islands force their target phage to directly mediate island excision and spread, *Nat. Commun.*, **9**, 1-8.
- 201. McKitterick, A. C., Hays, S. G., Johura, F. T., Alam, M., and Seed, K. D. (2019) Viral satellites exploit phage proteins to escape degradation of the bacterial host chromosome, *Cell Host Microbe*, **26**, 504-514.e4.
- 202. Barth, Z. K., Silvas, T. V, Angermeyer, A., and Seed, K. D. (2020) Genome replication dynamics of a bacteriophage and its satellite reveal strategies for parasitism and viral restriction, *Nucleic Acids Res.*, 48, 249-263.
- 203. Barth, Z. K., Netter, Z., Angermeyer, A., Bhardwaj, P., and Seed, K. D. (2020) A family of viral satellites manipulates invading virus gene expression and can affect cholera toxin mobilization, *mSystems*, 5, e00358-20, doi: 10.1128/ mSystems.00358-20.
- 204. Hays, S. G., and Seed, K. D. (2020) Dominant *Vibrio cholerae* phage exhibits lysis inhibition sensitive to disruption by a defensive phage satellite, *Elife*, **9**, e53200.
- 205. McKitterick, A. C., LeGault, K. N., Angermeyer, A., Alam, M., and Seed, K. D. (2019) Competition between mobile genetic elements drives optimization of a phageencoded CRISPR-Cas system: insights from a natural arms race, *Philos. Trans. R. Soc. B*, **374**, 20180089.
- 206. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Snir, S., and Koonin, E. V. (2011) Defense islands in bacterial and archaeal genomes and prediction of novel defense systems, *J. Bacteriol.*, **193**, 6039-6056.
- 207. Doron, S., Melamed, S., Ofir, G., Leavitt, A., Lopatina, A., et al. (2018) Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome, *Science*, **359**, eaar4120, doi: 10.1126/science.aar4120.
- Burroughs, A. M., and Aravind, L. (2020) Identification of uncharacterized components of prokaryotic immune systems and their diverse eukaryotic reformulations, *J. Bacteriol.*, 202, e00365-20, doi: 10.1128/JB.00365-20.
- Santiveri, M., Roa-Eguiara, A., Kuhne, C., Wadhwa, N., Berg, H. C., et al. (2020) Structure and function of stator units of the bacterial flagellar motor, *Cell*, 183, 244-257.
- 210. Ofir, G., Herbst, E., Baroz, M., Cohen, D., Millman, A., et al. (2021) Antiviral activity of bacterial TIR domains via signaling molecules that trigger cell death, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.01.06.425286.
- 211. Ka, D., Oh, H., Park, E., Kim, J., and Bae, E. (2020) Structural and functional evidence of bacterial antiphage protection by Thoeris defense system via NAD⁺ degradation, *Nat. Commun.*, **11**, 2816, doi: 10.1038/s41467-020-16703-w.
- 212. Bayless, A. M., and Nishimura, M. T. (2020) Enzymatic functions for Toll/Interleukin-1 receptor domain proteins in the plant immune system, *Front. Genet.*, **11**, 539.
- Badrinarayanan, A., Le, T. B. K., and Laub, M. T. (2015) Bacterial chromosome organization and segregation, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 31, 171-199.

- 214. Panas, M. W., Jain, P., Yang, H., Mitra, S., Biswas, D., et al. (2014) Noncanonical SMC protein in *Mycobacterium smegmatis* restricts maintenance of *Mycobacterium fortui tum* plasmids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 13264-13271.
- Pace, H. C., and Brenner, C. (2001) The nitrilase superfamily: classification, structure and function, *Genome Biol.*, 2, 1-9.
- 216. Mekhedov, S. L., Makarova, K. S., and Koonin, E. V. (2017) The complex domain architecture of SAMD9 family proteins, predicted STAND-like NTPases, suggests new links to inflammation and apoptosis, *Biol. Direct*, **12**, 13.
- 217. Forsberg, K. J., and Malik, H. S. (2018) Microbial genomics: the expanding universe of bacterial defense systems, *Curr. Biol.*, 28, R361-R364.
- 218. Van, V., and Van Valen, L. (1973) *A New Evolutionary Law*, The University of Chicago, Illinois.
- 219. Stern, A., and Sorek, R. (2011) The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes, *Bioessays*, **33**, 43-51.
- 220. Paterson, S., Vogwill, T., Buckling, A., Benmayor, R., Spiers, A. J., et al. (2010) Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution, *Nature*, 464, 275-278.
- 221. Ignacio-Espinoza, J. C., Ahlgren, N. A., and Fuhrman, J. A. (2020) Long-term stability and Red Queen-like strain dynamics in marine viruses, *Nat. Microbiol.*, 5, 265-271.
- 222. Furuta, Y., Kawai, M., Uchiyama, I., and Kobayashi, I. (2011) Domain movement within a gene: a novel evolu-

tionary mechanism for protein diversification, *PLoS One*, **6**, e18819.

- 223. Dupuis, M.-È., Villion, M., Magadán, A. H., and Moineau, S. (2013) CRISPR-Cas and restriction-modification systems are compatible and increase phage resistance, *Nat. Commun.*, 4, 1-7.
- 224. Hynes, A. P., Villion, M., and Moineau, S. (2014) Adaptation in bacterial CRISPR-Cas immunity can be driven by defective phages, *Nat. Commun.*, **5**, 1-6.
- 225. Bernheim, A., and Sorek, R. (2020) The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource, *Nat. Rev. Microbiol.*, **18**, 113-119.
- 226. Koonin, E. V., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., and Krupovic, M. (2020) Evolutionary entanglement of mobile genetic elements and host defence systems: guns for hire, *Nat. Rev. Genet.*, 21, 119-131.
- 227. Høyland-Kroghsbo, N. M., Paczkowski, J., Mukherjee, S., Broniewski, J., Westra, E., et al. (2017) Quorum sensing controls the Pseudomonas aeruginosa CRISPR-Cas adaptive immune system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 131-135.
- 228. Xiong, L., Liu, S., Chen, S., Xiao, Y., Zhu, B., et al. (2019) A new type of DNA phosphorothioation-based antiviral system in archaea, *Nat. Commun.*, **10**, 1-11.
- 229. Al-Shayeb, B., Sachdeva, R., Chen, L.-X., Ward, F., Munk, P., et al. (2020) Clades of huge phages from across Earth's ecosystems, *Nature*, **578**, 425-431.

MICROBIAL ARSENAL OF ANTIVIRAL DEFENSES. PART II

Review

A. B. Isaev^{1*}, O. S. Musharova^{1,2}, and K. V. Severinov^{1,3*}

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, 143028 Moscow, Russia; E-mail: tcft18@gmail.com ² Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, 123182 Moscow, Russia

³ Waksman Institute of Microbiology, Piscataway, NJ 08854, USA; E-mail: severik@waksman.rutgers.edu

Bacteriophages or phages are viruses that infect bacterial cells (for the scope of this review we will also consider viruses that infect Archaea). The constant threat of phage infection is a major force that shapes evolution of microbial genomes. To withstand infection, bacteria had evolved numerous strategies to avoid recognition by phages or to directly interfere with phage propagation inside the cell. Classical molecular biology and genetic engineering had been deeply intertwined with the study of phages and host defenses. Nowadays, owing to the rise of phage therapy, broad application of CRISPR-Cas technologies, and development of bioinformatics approaches that facilitate discovery of new systems, phage biology experiences a revival. This review describes variety of strategies employed by microbes to counter phage infection. In the first part defense associated with cell surface, roles of small molecules, and innate immunity systems relying on DNA modification were discussed. The second part focuses on adaptive immunity systems, abortive infection mechanisms, defenses associated with mobile genetic elements, and novel systems discovered in recent years through metagenomic mining.

Keywords: bacteriophages, immunity systems, CRISPR-Cas, Abortive infection, Toxin-Antitioxin, PICI, prokaryotic Argonaute, CBASS УДК 577.25

НОРМАЛИЗАЦИЯ КАЛЬЦИЕВОГО БАЛАНСА В НЕЙРОНАХ СТРИАТУМА ПРИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА: РОЛЬ СИГМА-1-РЕЦЕПТОРА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ МИШЕНИ ДЛЯ ТЕРАПИИ

Мини-обзор

© 2021 Н.А. Красковская^{1*}, И.Б. Безпрозванный^{1,2*}

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, лаборатория молекулярной нейродегенерации, 195251 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: ninakraskovskaya@gmail.com; mnlabspb@gmail.com

> ² Юго-Западный медицинский центр Университета Техаса, отдел физиологии, Даллас, 75390 Техас, США

> > Поступила в редакцию 16.10.2020 После доработки 24.12.2020 Принята к публикации 24.12.2020

Болезнь Хантингтона (БХ) является нейродегенеративным, доминантно-наследуемым генетическим заболеванием. Причиной БХ является экспансия полиглутаминового тракта в гене белка хантингтина. На клеточном уровне БХ характеризуется накоплением мутантного белка хантингтина в клетках головного мозга, что приводит к развитию фенотипа БХ, при котором наблюдаются психические расстройства, снижение когнитивных способностей и прогрессирующие двигательные нарушения, проявляющиеся в виде хореи. Несмотря на многочисленные исследования, до сих пор не установлена однозначная связь между накоплением мутантного белка и селективной гибелью нейронов стриатума. Результаты исследований последних лет указывают на нарушения в кальциевом гомеостазе нейронов стриатума при БХ. Клетки данного типа крайне чувствительны к изменениям в концентрации кальция в цитоплазме, и чрезмерное его повышение приводит к их гибели. Один из возможных путей нормализации кальциевого баланса в нейронах стриатума лежит через воздействие на сигма-1-рецептор (С1Р). Данный белок действует как кальциевый сенсор и проявляет модулирующую шаперонную активность в условиях клеточного стресса, наблюдаемого при развитии многих нейродегенеративных заболеваний. Лиганд-опосредованное функционирование делает С1Р новой перспективной молекулярной мишенью для разработки лекарственной терапии при БХ на основе агонистов данного рецептора.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сигма-1-рецептор, болезнь Хантингтона, дендритные шипики, кальций, депо-управляемый вход кальция, эндоплазматический ретикулум, митохондрии. **DOI:** 10.31857/S0320972521040072

введение

Болезнь Хантингтона (БХ) является нейродегенеративным, доминантно-наследуемым генетическим заболеванием и характеризуется

* Адресат для корреспонденции.

тремя основными клиническими симптомами: психические расстройства, снижение когнитивных способностей и экстрапирамидные расстройства. Все три нарушения быстро прогрессируют и в конечном итоге приводят к слабоумию и кахексии [1, 2]. Известно, что при БХ в первую очередь поражается стриатум, так как клеточной гибели наиболее подвержены нейроны именно этой области – ГАМКергические средние шипиковые нейроны (СШН), которые составляют 95% нейронов стриатума. Стриатум является частью базальных ганглиев - области мозга, которая играет ключевую роль в контроле движений и поведения. Дегенерация клеток стриатума приводит к нарушениям двигательной активности, что выражается в появлении у больных характерных непроизвольных, беспо-

Принятые сокращения: БХ – болезнь Хантингтона; ДУВК – депо-управляемый вход кальция; кальций – Ca^{2+} ; МАМ – мембрана ЭПР, ассоциированная с митохондрией; СШН – средний шипиковый нейрон стриатума; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; IP₃ – инозитол-3-фосфат; C1P – сигма-1-рецептор; IP₃R1 – рецептор инозитол-3-фосфата 1-типа; mHtt – мутантный хангтинтин; NMDAR – рецептор, активируемый N-метил-D-аспартатом; 3-PPP – (3-(3-гидроксифенил)-N-п-пропилпиперидин); STIM – strome interaction molecule; TRPC – transient гесерtог potential canonical; VGCC – потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы.

рядочных, отрывистых движений, семантически объединенных термином «хорея», которая является основным клиническим симптомом данного заболевания.

На молекулярном уровне увеличение количества повторов кодона САС в первом экзоне гена хантингтина выше порога в 36 триплетов приводит к патологическому удлинению полиглутаминового тракта в белке и развитию фенотипа БХ [3]. Продуктом данного гена является растворимый белок хантингтин (Htt) с молекулярной массой 348 кДа. Несмотря на точно установленную генетическую природу данного заболевания, до сих пор не известны конкретные молекулярно-биохимические пути, нарушающиеся в клетках под воздействием мутантного хантингтина (mHtt). Известно, что Htt транскрибируется в различных тканях и имеет множество партнёров по взаимодействию [4]. Он участвует в таких важных клеточных процессах, как экспрессия генов, внутриклеточный транспорт белков и везикул, передача сигналов, а также вовлечён в анти-апоптотические биохимические каскады. На животных моделях показано, что отсутствие Htt приводит к гибели организма на стадии эмбриогенеза.

Согласно кристаллической структуре, полиглутаминовый тракт белка представляет собой альфа-спираль, участвующую в белок-белковых взаимодействиях [5]. В зависимости от белкового окружения он также может принимать различные альтернативные виды фолдинга. Удлинение данного участка приводит к повышению вероятности взаимодействий с белковыми партнёрами, нетипичными для Htt дикого типа, а также, скорее всего, является причиной накопления агрегатов mHtt в ядре, цитоплазме и отростках нейрона. Основным следствием увеличения полиглутаминового тракта в mHtt является изменение структуры белка с последующей гипотетической потерей нормальной и приобретением им токсичной функции, что в любом случае приводит к нарушению функционирования клетки.

В последние годы агрегационная гипотеза патогенеза БХ, которую можно описать однозначной связью «агрегация = токсичность», была подвергнута сомнению, а токсический эффект mHtt на настоящий момент связывается либо с абберантными взаимодействиями мономерной формы мутантного белка, либо с его олигомерными формами [6, 7]. Последние данные говорят о том, что токсичны именно дезагрегированные формы белка, к тому же первые биохимические нарушения детектируются в клетке ещё до появления агрегатов mHtt [7–9]. Таким образом, остается актуальным поиск новых аль-

БИОХИМИЯ том 86 вып. 4 2021

тернативных теорий, которые могли бы на молекулярном уровне объяснить токсический эффект mHtt. Исследования показали, что белок Htt с увеличенным полиглутаминовым трактом характеризуется приобретением новых патологических функций, влияющих на такие ключевые аспекты функционирования нейронов, как аксональный транспорт [10], эндоцитоз [11], синаптическая передача [12] и кальциевый (Ca²⁺) сигналлинг [13]. Нарушения механизмов Ca²⁺регуляции в СШН связывают с их селективной дегенерацией при развитии БХ [14]. В настоящем обзоре обобщаются имеющиеся в литературе данные о нарушениях Ca²⁺-сигналлинга при развитии БХ, в особенности в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), и их вкладе в развитие синаптической дисфункции, как одного из самых ранних проявлений нейропатологических процессов на клеточном уровне. Также обсуждается роль сигма-1-рецептора (С1Р) в развитии патогенеза БХ и перспективы применения его агонистов, в частности придопидина, для нормализации Ca²⁺-баланса в нейронах и поддержания функциональной активности синапсов на самых ранних стадиях развития нейропатологических изменений.

РОЛЬ КАЛЬЦИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА

Ca²⁺ является одним из важнейших вторичных посредников в нейронах, преобразующих поступающие извне сигналы в активацию эффекторных ферментов и запуск Ca²⁺-опосредованных каскадов биохимических реакций, формирующих специфический клеточный ответ, влияющий на структуру и функцию нейронов. Механизмы регуляции Ca²⁺ запускаются путем входящего тока Ca²⁺ в цитоплазму нейрональных клеток при различных стимулах через потенциал-зависимые (VGCC) и лиганд-управляемые Ca²⁺-каналы, а также каналы семейства transient receptor potential canonical (TRPC). Takже возможно увеличение внутриклеточной концентрации Ca²⁺ при его выходе в цитоплазму из внутриклеточных депо, в основном из гладкого эндоплазматического ретикулума, при активации сигнальных каскадов других вторичных посредников, таких как инозитол-3-фосфат (IP₃), или при активации рианодиновых рецепторов. Поскольку ЭПР является основным динамическим депо Ca²⁺ в клетках, существует механизм, обеспечивающий приток Са²⁺ из внеклеточного матрикса для поддержания стабильного уровня Ca²⁺ в ЭПР в отсутствии притока через потенциал-зависимые и лиганд-управляемые Ca²⁺-каналы. Депо-управляемый вход Ca²⁺ (ДУВК) представляет собой каскад биохимических реакций, который активируется при опустошении запасов Ca²⁺ внутри клетки и запускает вход Ca²⁺ из внеклеточного пространства для его восполнения во внутриклеточных депо [15]. В ходе этого процесса активируются белки семейства strome interaction molecule (STIM), являющиеся Ca²⁺-сенсорами, которые, в свою очередь, активируют расположенные на плазматической мембране высокоселективные Ca²⁺каналы из семейств ORAI и TRPC, по которым Ca²⁺ поступает в цитозоль и далее в ЭПР при помощи ATPазы сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA).

В невозбудимых клетках ДУВК является основным источником восполнения внутриклеточных запасов Ca²⁺. Долгое время считалось, что ДУВК отсутствует в нейронах, пока не было показано, что белки семейства ORAI, а также белок STIM1 и его гомолог STIM2 экспрессируются в ЦНС [16-18]. Белок STIM2 является более чувствительным Ca²⁺-сенсором, чем его гомолог, STIM1, поскольку он активируется даже при незначительных изменениях концентрации Ca^{2+} в ЭПР [18]. STIM2 имеет меньшую кинетику олигомеризации, в связи с чем менее эффективно связывается с белками семейства ORAI [19]. Предполагается, что таким образом обеспечивается нейропротекторный эффект, защищающий нейроны от чрезмерного повышения концентрации Ca²⁺ внутри клетки.

Роль Ca²⁺, как вторичного посредника, трудно переоценить, поскольку наиболее важные функции нейронов, такие как изменение возбудимости нейронов (посредством изменения активности и характера экспрессии ионных каналов), синаптическая передача и синаптическая пластичность, а также изменения в экспрессии генов основаны на ряде Ca²⁺-зависимых процессов, включающих активацию Са²⁺-активируемых эффекторных белков, вовлеченных в Ca²⁺сигналлинг. Поэтому, ввиду чрезвычайной чувствительности нейронов к концентрации Са²⁺ внутри клетки, даже небольшие изменения в нейронах способны нарушать тонкие механизмы Са²⁺-регуляции и в конечном итоге привести к гибели нейрональных клеток [20].

Молекулярно-биологическими методами было показано изменение концентрации Ca²⁺ в нейронах стриатума [21], а также изменение уровней экспрессии многих белков Ca²⁺-сигналлинга при БХ. Самые ранние исследования патогенеза БХ указывали на нейротоксическое действие глутамата, вызывающего дегенерацию нейронов стриатума. В частности, интрастриатные инъекции нейротоксинов, таких как хинолиновая кислота, индуцируют избыточное поступление Ca²⁺ в нейроны через ионотропные рецепторы глутамата, приводят к выраженной гибели клеток из-за эксайтотоксичного эффекта [22]. В результате у животных наблюдается фенотип схожий с БХ. Одна из гипотез, связывающих повышенную уязвимость СШН и токсичное действие глутамата, заключается в том, что экспрессия mHtt способствует увеличению активности внесинаптических рецепторов, активируемых N-метил-D-аспартатом (NMDAR) [23]. В присутствии mHtt в СШН наблюдается увеличение плотности Ca²⁺-тока через NMDAR, содержащие N2R субъединицы, которые преимущественно являются внесинаптическими в зрелых нейронах. В то время как активация синаптических NMDAR способствует экспрессии анти-апоптотических, антиоксидантных и нейропротекторных факторов, таких как нейротрофический фактор мозга, который поддерживает рост нейритов и формирование дендритных шипиков; активация внесинаптических NMDAR вызывает противоположный эффект, ассоциированный с активацией про-апоптотических факторов. Фармакологическое ингибирование NMDAR с помощью низких доз мемантина, блокирующих пул внесинаптических рецепторов, оказывает нейропротекторный эффект, что было продемонстрировано на первичной культуре стриатных клеток, выделенных из мышей с моделью БХ [24], а также в первой фазе клинических испытаний [25].

Важным этапом развития «кальциевой гипотезы» патогенеза БХ стало открытие новой токсичной функции mHtt, заключающейся в его непосредственной ассоциации с С-концом рецептора инозитол-3-фосфата первого типа (IP_3R_1) , располагающегося на мембране ЭПР – основного динамического внутриклеточного Ca^{2+} -депо, располагающегося на мембране ЭПР. На мышиной модели БХ было показано, что белки, ассоциированные с Htt 1-го типа, mHtt и IP₃R1 формируют белковые комплексы на мембране ЭПР, опосредующие избыточный выход Ca^{2+} из внутриклеточного депо в результате повышения сродства IP₃ к своему рецептору [26]. Снижение содержания Ca²⁺ в ЭПР приводит к нарушению фолдинга белков, накоплению и агрегации непроцессированных белков, вызывая ЭПР-стресс. Для восполнения запасов Ca²⁺ в ЭПР запускается компенсаторный механизм – ДУВК [27]. На различных клеточных моделях БХ была выявлена повышенная активация данного биохимического пути [28–30], а также повышение уровня экспрессии белка STIM2, отвечающего за активацию данного биохимического пути [30]. Кроме того, гиперак-

тивация ДУВК была продемонстрирована на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках, полученных от пациентов с БХ [31]. Со временем, вследствие чрезмерной активации данного биохимического пути, компенсаторный механизм становится патологическим, поскольку Ca²⁺ начинает накапливаться в цитоплазме, в конечном итоге индуцируя апоптоз СШН [32]. Кроме того, гиперактивация ДУВК может приводить к нарушению специфичных функций нейрональных клеток. В целом ряде работ показано, что активация ДУВК негативно влияет на работу VGCC, что выражается в их интернализации при запуске ДУВК [33]. Электрофизиологический анализ нейронов стриатума выявил первоначальное увеличение плотности VGCC, которое затем сменялось снижением их плотности при БХ [34]. Снижение плотности VGCC может являться критическим фактором, определяющим ингибирующее действие СШН, поскольку выброс нейромедиатора напрямую контролируется VGCC [35]. Долговременное ингибирование VGCC может приводить к снижению выброса тормозного нейромедиатора ГАМК и нарушению в ингибировании эффекторных отделов головного мозга. В то же время показано, что в культуре нейронов коры, полученных от мышей с моделью БХ, наблюдается увеличение входа Ca²⁺ в пресинаптическую терминаль через VGCC N-типа, и это приводит к повышенному высвобождению глутамата [35]. Кроме того, в нейронах коры наблюдается повышение экспрессии VGCC L-типа, а также увеличение общей плотности Ca²⁺-токов в каналах данного типа [36].

Повышенный выброс глутамата из аксонных терминалей нейронов коры наблюдается на довольно ранних стадиях развития нейропатологии, задолго до наступления первых клинических симптомов [36, 37], и согласуется с гипотезой о том, что повышенное высвобождение глутамата вызывает эксайтотоксическое повреждение СШН. На более поздних стадиях происходит уменьшение высвобождения глутамата из кортикальных нейронов, что также вносит вклад в развитие кортико-стриатной синаптической дисфункции [37]. Поскольку mHtt экспрессируется во всех клетках головного мозга, изменение Ca²⁺-гомеостаза может нарушать Са²⁺-зависимые механизмы синаптической передачи как в пре-, так и в постсинаптической области, в том числе из-за повышения активности ДУВК.

Нарушение функциональной активности митохондрий вносит существенный вклад в развитие патогенеза БХ. Митохондрии играют критическую роль в поддержании нейронов, гене-

рируя АТР и биосинтетические субстраты, поддерживая Ca²⁺-гомеостаз и инициируя апоптоз. Важными механизмами, напрямую влияющими на активность и функционирование митохондрий, являются процессы слияния и деления [38]. Слияние помогает смягчить стресс, смешивая содержимое частично поврежденных митохондрий как форму комплементации. Деление необходимо для создания новых митохондрий, а также способствует контролю качества, позволяя удалять поврежденные митохондрии, и может способствовать апоптозу во время высоких уровней клеточного стресса. При гистопатологическом исследовании у пациентов с БХ было выявлено значительное и прогрессирующее, в зависимости от стадии, уменьшение количества митохондрий в СШН с заметным изменением их размера [39]. Эти нарушения в сочетании со значительным увеличением экспрессии белка деления Drp1 и снижением белка слияния митофизина 1-го типа свидетельствуют о высоком уровне клеточного стресса в нейронах [40]. Митохондрии являются одним из внутриклеточных Ca²⁺-депо, захватывая избыточный цитозольный Ca²⁺, поддерживают его жесткую внутриклеточную регуляцию. Когда буферные способности митохондрий истощаются, происходит критическое изменение мембранного потенциала, вызывая открытие митохондриальной поры переходной проницаемости, высвобождая апоптотические медиаторы, такие как цитохром с, в цитозоль, что запускает гибель нейрона. Большое количество исследований свидетельствует об изменении мембранного потенциала и снижении буферной емкости Ca²⁺ в митохондриях [41-45]. Причем у пациентов с ювенальной формой БХ снижение буферной емкости наблюдается гораздо раньше по сравнению с проявлением в зрелом возрасте [46].

Почти 90% IP₃R локализуется в специализированных участках мембраны ЭПР, ассоциированных с митохондрией (MAM, mitochondriaassociated membrane). Нарушение Са²⁺-баланса в ЭПР вследствие гиперактивации IP₃R1 может критически влиять на организацию МАМ, синхронность молекулярных процессов и функциональную взаимосвязь между двумя органеллами, что приводит в конечном итоге к нарушению в функционировании митохондрий и запуску про-апоптотических сигнальных каскадов. В частности, в недавнем исследовании было продемонстрировано, что в культуре нейронов стриатума, полученных от мышей с моделью БХ, наблюдалось снижение ко-локализации ЭПР и митохондрий [47]. Продемонстрировано, что в стриатуме двух различных мышиных моделей БХ и в стриатуме пациентов наблюдалось значительное снижение уровня IP_3R1 и белка-шаперона Grp75, ключевого белка, обеспечивающего трансфер Ca²⁺ из ЭПР в митохондрии. Снижение уровня митофизина 2-го типа наблюдалось также в стриатуме пациентов с БХ. Ингибирование белка Drp1 не только предотвращало потерю контактов между ЭПР и митохондрией, но также восстанавливало трансфер Ca²⁺ из ЭПР в митохондрии, восстанавливая Ca²⁺-баланс в нейронах.

Наиболее чувствительными к изменению внутриклеточной концентрации Ca²⁺ являются синаптические контакты, в особенности область постсинапса, поскольку функциональная активность постсинаптических дендритных шипиков во многом определяется внутриклеточной концентрацией Ca²⁺. Изменение Ca²⁺регуляции в нейронах стриатума на самых ранних стадиях развития БХ приводит к элиминации синаптических связей и развитию кортикостриатной синаптической дисфункции, которая, как считается, приводит в дальнейшем к двигательным нарушениям, характерным для данной нейропатологии. Считается, что элиминация дендритных шипиков СШН в значительной степени зависит от экспрессии mHtt в данном типе клеток. Однако целый ряд исследований указывает на взаимосвязь стабильности дендритных шипиков с нарушением Ca²⁺-сигналлинга в пресинаптической области [48-50]. В частности, недавние исследования показали, что в присутствии mHtt в культуре кортикальных нейронов наблюдается повышение частоты миниатюрных синаптических выбросов глутамата, опосредованное спонтанным высвобождением Ca²⁺ из ЭПР, и снижение выброса глутамата при генерации потенциала действия [50]. В культуре нейронов коры, выделенных из мышей с моделью БХ, также наблюдается снижение количества грибовидных дендритных шипиков, которые считаются стабильными функционально-активными постсинаптическими структурами. Снижение количества грибовидных шипиков в пирамидных нейронах обусловлено нарушением гомеостатической синаптической пластичности вследствие нарушения Ca²⁺-сигналлинга [51]. Важность афферентной иннервации от нейронов коры была также продемонстрирована с помощью оптогенетического подхода. Длительное угнетение спонтанной активности нейронов коры приводило к значительному снижению плотности СШН в ко-культуре нейронов коры и стриатума, выделенных из мышей с моделью БХ по сравнению с диким типом [2]. Аналогичные результаты наблюдались в оптогенетических исследованиях ex vivo на кортикостриатных срезах мышей с моделью БХ. Пико-

вая амплитуда и площадь рецептора, активируемого α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислотой (AMPAR), и NMDARопосредованных ответов, вызванных стимуляцией нейронов коры, были снижены в СШН, что хорошо коррелирует со снижением плотности дендритных шипиков в данном типе клеток [52]. Развитие синаптической дисфункции в присутствии mHtt, по-видимому, является системным патологическим процессом, поскольку при БХ наблюдаются также функциональные изменения в таламо-стриатных синапсах, причем эти изменения предшествуют кортикостриатным [53]. В частности, в таламо-стриатных синапсах, также как и в кортико-стриатных, наблюдалось повышение внесинаптического тока Ca^{2+} через NMDAR, а также соотношение токов через AMPAR и NMDAR.

Таким образом, различные нарушения Ca^{2+} -гомеостаза в нейронах стриатума при БХ под действием mHtt могут повлиять на целый ряд молекулярных механизмов функционирования СШН. В связи с этим различные препараты, способствующие нормализации Ca^{2+} -баланса в клетках стриатума, например, вещества, препятствующие ассоциации IP_3R1 с mHtt, или ингибиторы ДУВК могут являться потенциальными терапевтическими агентами для лечения БХ.

РОЛЬ СИГМА-1-РЕЦЕПТОРА В КАЧЕСТВЕ МОДУЛЯТОРА КАЛЬЦИЕВОГО БАЛАНСА В НЕЙРОНАХ ПРИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА

Сигма-рецепторы изначально считались разновидностью опиоидных рецепторов, однако сейчас они классифицируются как отдельный класс уникальных по структуре и набору связывающихся с ними лигандов. Среди рецепторов данного класса фармакологически наиболее изучен рецептор первого типа. Его функциональная активность и локализация зависят от функционального состояния клетки, стимуляции рецептора лигандами, а также от уровня Ca^{2+} в ЭПР. В неактивном состоянии, а также при стимуляции антагонистами С1Р формирует устойчивый комплекс с другим резидентным шапероном ЭР – белком связывания иммуноглобулинов (binding immunoglobulin protein, BiP или GRP78), который является Ca²⁺-сенсором [54]. На молекулярном уровне С1Р представляет собой лиганд-управляемый молекулярный шаперон, который принимает участие в различных биохимических путях, активирующихся в условиях клеточного стресса. Например, при инициации стресса в ЭПР С1Р регули-

рует функцию IP_3R , обеспечивая трансфер Ca^{2+} в митохондрии, поддерживая синтез ATP и ингибируя запуск апоптотических каскадов [54, 55]. Формирование белкового комплекса C1P–IP₃R происходит в MAM.

Несколько независимых экспериментальных групп показали на невозбудимых клетках, что активность ДУВК может быть ингибирована при помощи C1P [56, 57]. В частности, активация C1P при помощи агонистов снижает амплитуду ДУВК, а аппликация антагонистов рецептора, наоборот, усиливает активность данного биохимического пути. Нокдаун рецептора в культуре клеток также повышает амплитуду ДУВК. Было также продемонстрировано, что C1P непосредственно взаимодействует с белками STIM1 и ORAI1 и препятствует их ассоциации [56].

Кроме того, С1Р играет важную роль в поддержании биоэнергетического баланса в нейронах, а также выступает в качестве модулятора широкого спектра ионных каналов различных типов, включая Ca²⁺ и Ca²⁺-активируемые каналы [58-62]. Миссенс-мутация Е102Q в молекуле рецептора приводит к развитию ювенальной формы бокового амиотрофического склероза [63]. Данная мутация приводит к снижению продукции АТР в нейронах и вызывает гибель нервных клеток [64]. Нокдаун С1Р в нейронах гиппокампа приводит к уменьшению размера митохондрий, а также к изменению мембранного потенциала [65]. На ганглиозных клетках сетчатки было показано, что С1Р препятствует эксайтотоксичности и снижает апоптоз клеток, регулируя Ca²⁺-сигналлинг и ингибируя активацию про-апоптотических факторов, таких как Вах и каспаза 3-типа [66]. Нарушение Ca²⁺-баланса в ЭПР может непосредственно влиять на агрегацию mHtt при развитии БХ. В частности, было продемонстрировано, что IP₃R1 является важной молекулярной мишенью при БХ, поскольку нокдаун и химическое ингибирование IP_3R1 снижают агрегацию mHtt и предотвращают гибель клеток [67]. Кроме того, было показано, что внутриядерные включения, состоящие из агрегатов mHtt в нейронах, ко-локализуются с С1Р в головном мозге пациентов, пораженных болезнями полиглутаминового тракта, в том числе при БХ [68]. На клеточной модели БХ было показано, что подавление экспрессии С1Р с помощью анти-смысловой РНК увеличивало количество агрегатов mHtt как в цитоплазме. так и в ядре клеток. Более того, активность протеасом была значительно снижена после нокдауна С1Р [68].

Важные результаты, свидетельствующие о вовлеченности C1P в модуляцию Ca²⁺-сигнализации в нейронах, были получены при исследо-

БИОХИМИЯ том 86 вып. 4 2021

вании нейропротекторных свойств придопидина, который в настоящий момент рассматривается как потенциальный терапевтический агент для лечения БХ [69–71]. Придопидин изначально был открыт как «дофаминовый стабилизатор», связывающийся с D2-рецепторами дофамина. Однако сродство придопидина к D2-рецепторами дофамина невелико ($K_d = 60 \text{ мкM}$). В то же время структурный аналог придопидина, соединение 3-РРР (3-(3-гидроксифенил)-N-ппропилпиперидин), является высоко аффинным лигандом C1P ($K_d = 80$ нМ) [72]. Зависимость «доза-эффект» для придопидина имеет куполообразную форму, характерную для большинства агонистов С1Р [73]. Последние исследования с помощью позитронно-эмиссионной томографии также показали, что при клинически значимой разовой дозе придопидин действует как селективный агонист С1Р, демонстрируя почти полное связывание с С1Р и незначительное – с рецепторами дофамина D2 и D3 [74].

Придопидин и 3-РРР оказывают нейропротекторный эффект в наномолярных концентрациях на клеточной модели БХ. Оба соединения стабилизировали синаптические связи между кортикальным и стриатными нейронами в первичных кортико-стриатных ко-культурах, полученных из мышей линии YAC128. Нокдаун C1P с помощью Cas9 нивелировал нейропротекторное действие придопидина и 3-РРР. Интересно, что нокаут С1Р приводил к значительному снижению плотности дендритных шипиков в ко-культуре нейронов коры и стриатума, выделенных из мышей дикого типа. Это наблюдение указывает на важную роль С1Р в поддержании стабильности дендритных шипиков. Синаптопротекторное действие придопидина напрямую связано с Са²⁺-регуляцией в нейронах, что было подтверждено серией экспериментов по Ca²⁺-визуализации. Предыдущие исследования показали, что аномальный Ca²⁺-сигналлинг в постсинаптических шипиках ответственен за их дестабилизацию при развитии БХ. Аппликация придопидина в кортико-стриатную культуру, выделенную из мышей с моделью БХ, предотвращала гиперактивность IP₃R1, восстанавливала уровень Ca^{2+} в ЭПР и снижала активность ДУВК. Нокдаун С1Р в культуре нейронов дикого типа приводил к истощению запасов Ca²⁺ в ЭПР. Это позволяет предположить, что рецептор может стабилизировать дендритные шипики посредством гомеостатического контроля уровня Ca²⁺. Придопидин оказывал также нейропротекторное действие в культуре нейронов коры, выделенных из мышей с моделью БХ, нормализуя дефекты гомеостатической синаптической пластичности и повышая плотность дендритных шипиков [51].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги, можно заключить, что при развитии БХ нарушение Ca²⁺-гомеостаза приводит к изменению функциональной активности нейрональных клеток. На ранних стадиях заболевания СШН способны компенсировать нарушения Ca²⁺-баланса благодаря большому количеству компенсаторных механизмов. Однако с возрастом их нейропротекторный потенциал уменьшается из-за общего снижения метаболической активности клеток и снижения уровня экспрессии Ca²⁺-буферных белков. Продолжающиеся нарушения механизмов Ca²⁺-регуляции в конечном итоге вызывают истощение компенсаторных возможностей клеток и устойчивое повышение уровня цитозольного Са²⁺. что фактически приводит к дегенерации нейронов.

С1Р представляет собой перспективную терапевтическую мишень для лечения БХ, поскольку принимает участие в модуляции активности различных Ca²⁺-зависимых сигнальных путей. Активация С1Р с помощью селективных агонистов защищает нейроны от эксайтотоксичного действия глутамата, снижает гиперактивацию ДУВК и поддерживает структурную целостность МАМ, необходимую для синхронной активности между митохондрией и ЭПР, а также обеспечения биоэнергетического баланса в клетках. Придопидин, который в настоящий момент рассматривается как высокоселективный агонист С1Р, оказывает нейропротекторное действие на различных клеточных и животных моделях БХ, во многом обусловленное норма-

- Walker, F. O. (2007) Huntington's Disease, *Semin. Neurol.*, 27, 143-150, doi: 10.1055/s-2007-971176.
- Artamonov, D. N., Korzhova, V. V., Wu, J., Rybalchenko, P. D., Im, C., et al. (2013) Characterization of synaptic dysfunction in an *in vitro* corticostriatal model system of Huntington's disease, *Biol. Membrany*, **30**, 276-288, doi: 10.7868/S0233475513040026.
- MacDonald, Me E., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Myers, R. H., Lin, C., et al. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group, *Cell*, 72, 971-983, doi: 10.1016/0092-8674(93)90585-e.
- Strong, T. V., Tagle, D. A., Valdes, J. M., Elmer, L. W., et al. (1993) Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues, *Nat. Genet.*, 5, 259-265, doi: 10.1038/ng1193-259.
- Kim, M. W., Chelliah, Y., Kim, S. W., Otwinowski, Z., and Bezprozvanny, I. (2009) Secondary structure of Huntingtin amino-terminal region, *Structure*, **17**, 1205-1212, doi: 10.1016/j.str.2009.08.002.
- 6. Kim, Y. E., Hosp, F., Frottin, F., Ge, H., Mann, M., et al. (2016) Soluble oligomers of PolyQ-expanded huntingtin

лизацией Ca²⁺-сигналлинга в нейронах. Особенно важным является синаптопротекторное действие придопидина, наблюдаемое как в нейронах коры, так и в нейронах стриатума, что может свидетельствовать о системном эффекте придопидина в терапии БХ. Поскольку развитие синаптической дисфункции является одним из самых ранних проявлений нейропатологии на клеточном уровне, нормализация Ca²⁺-баланса при помощи придопидина может остановить развитие заболевания на молекулярном уровне, начиная с самых ранних стадий. В связи с этим можно предположить, что наибольший терапевтический эффект придопидина будет наблюдаться в случае превентивной терапии еще до стадии первых клинических симптомов, что поддержит компенсаторные возможности нейрональных клеток и существенно задержит прогрессирование БХ.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-15-00184, глава «Роль кальция в патогенезе болезни Хантингтона») и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-00994, глава «Роль сигма-1рецептора в качестве модулятора кальциевого баланса в нейронах при болезни Хантингтона»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

target a multiplicity of key cellular factors, *Mol. Cell*, **63**, 951-964, doi: 10.1016/j.molcel.2016.07.022.

- Leitman, J., Ulrich Hartl, F., and Lederkremer, G. Z. (2013) Soluble forms of polyQ-expanded huntingtin rather than large aggregates cause endoplasmic reticulum stress, *Nat. Commun.*, 4, 2753, doi: 10.1038/ncomms3753.
- Leitman, J., Barak, B., Benyair, R., Shenkman, M., Ashery, U., et al. (2014) ER stress-induced eIF2-alpha phosphorylation underlies sensitivity of striatal neurons to pathogenic huntingtin, *PLoS One*, 9, e90803, doi: 10.1371/ journal.pone.0090803.
- 9. Lajoie, P. and Snapp, E. L. (2010) Formation and toxicity of soluble polyglutamine oligomers in living cells, *PLoS One*, **5**, e15245, doi: 10.1371/journal.pone.0015245.
- Reddy, P. H., and Shirendeb, U. P. (2012) Mutant huntingtin, abnormal mitochondrial dynamics, defective axonal transport of mitochondria, and selective synaptic degeneration in Huntington's disease, *Biochim. Biophys. Acta*, 1822, 101-110, doi: 10.1016/j.bbadis.2011.10.016.
- McAdam, R. L., Morton, A., Gordon, S. L., Alterman, J. F., Khvorova, A., et al. (2020) Loss of huntingtin function slows synaptic vesicle endocytosis in striatal neurons from the htt(Q140/Q140) mouse model of Huntington's

disease, Neurobiol. Dis., 134, 104637, doi: 10.1016/j.nbd. 2019.104637.

- Smith, R., Brundin, P., and Li, J. Y. (2005) Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective, *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 1901-1912, doi: 10.1007/s00018-005-5084-5.
- Schrank, S., Barrington, N., and Stutzmann, G. E. (2020) Calcium-handling defects and neurodegenerative disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **12**, doi: 10.1101/cshperspect. a035212.
- Tang, T. S., Slow, E., Lupu, V., Stavrovskaya, I. G., Sugimori, M., et al. (2005) Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2602-2607, doi: 10.1073/pnas.0409402102.
- Parekh, A. B., and Putney, J. W., Jr. (2005) Store-operated calcium channels, *Physiol. Rev.*, **85**, 757-810, doi: 10.1152/physrev.00057.2003.
- Sun, S., Zhang, H., Liu, J., Popugaeva, E., Xu, N. J., et al. (2014) Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice, *Neuron*, 82, 79-93, doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.019.
- Wu, J., Ryskamp, D., Birnbaumer, L., and Bezprozvanny, I. (2018) Inhibition of TRPC1-dependent store-operated calcium entry improves synaptic stability and motor performance in a mouse model of Huntington's disease, *J. Huntingtons Dis.*, 7, 35-50, doi: 10.3233/JHD-170266.
- Segal, M., and Korkotian, E. (2014) Endoplasmic reticulum calcium stores in dendritic spines, *Front. Neuroanat.*, 8, 64, doi: 10.3389/fnana.2014.00064.
- Stathopulos, P. B., Zheng, L., and Ikura, M. (2009) Stromal interaction molecule (STIM) 1 and STIM2 calcium sensing regions exhibit distinct unfolding and oligomerization kinetics, *J. Biol. Chem.*, 284, 728-732, doi: 10.1074/jbc.C800178200.
- 20. Toescu, E. C., and Verkhratsky, A. (2007) Role of calcium in normal aging and neurodegeneration, *Aging Cell*, **6**, 265, doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00299.x.
- Rockabrand, E., Slepko, N., Pantalone, A., Nukala, V. N., Kazantsev, A et al. (2007) The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis, *Hum. Mol. Genet.*, 16, 61-77, doi: 10.1093/hmg/ddl440.
- 22. Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Cipolloni, P. B., Storey, E., and Beal, M. F. (1993) Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization, *Exp. Neurol.*, **119**, 46-71, doi: 10.1006/exnr.1993.1006.
- Milnerwood, A. J., Gladding, C. M., Pouladi, M. A., Kaufman, A. M., Hines, R. M., et al. (2010) Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington's disease mice, *Neuron*, 65, 178-190, doi: 10.1016/j.neuron.2010. 01.008.
- Dau, A., Gladding, C. M., Sepers, M. D., and Raymond, L. A. (2014) Chronic blockade of extrasynaptic NMDA receptors ameliorates synaptic dysfunction and pro-death signaling in Huntington disease transgenic mice, *Neurobiol. Dis.*, 62, 533-542, doi: 10.1016/j.nbd.2013. 11.013.
- Ondo, W. G., Mejia, N. I., and Hunter, C. B. (2007) A pilot study of the clinical efficacy and safety of memantine for Huntington's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.*, 13, 453-454, doi: 10.1016/j.parkreldis.2006.08.005.
- Tang, T. S., Tu, H., Orban, P. C., Chan, E. Y., Hayden, M. R., and Bezprozvanny, I. (2004) HAP1 facilitates effects of mutant huntingtin on inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in primary culture of striatal

medium spiny neurons, *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 1779-1787, doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03633.x.

- Glushankova, L. N., Zimina, O. A., Vigont, V. A., Mozhaeva, G. N., Bezprozvanny, I. B., and Kaznacheeva, E. V. (2010) Changes in the store-dependent calcium influx in a cellular model of Huntington's disease, *Dokl. Biol. Sci.*, 433, 293-295, doi: 10.1134/S0012496610040162.
- Wu, J., Shih, H. P., Vigont, V., Hrdlicka, L., Diggins, L., et al. (2011) Neuronal store-operated calcium entry pathway as a novel therapeutic target for Huntington's disease treatment, *Chem. Biol.*, **18**, 777-793, doi: 10.1016/j.chembiol. 2011.04.012.
- Czeredys, M., Maciag, F., Methner, A., and Kuznicki, J. (2017) Tetrahydrocarbazoles decrease elevated SOCE in medium spiny neurons from transgenic YAC128 mice, a model of Huntington's disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 483, 1194-1205, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.106.
- Wu, J., Ryskamp, D. A., Liang, X., Egorova, P., Zakharova, O., et al. (2016) Enhanced store-operated calcium entry leads to striatal synaptic loss in a Huntington's disease mouse model, *J. Neurosci.*, 36, 125-141, doi: 10.1523/Jneurosci.1038-15.2016.
- Nekrasov, E. D., Vigont, V. A., Klyushnikov, S. A., Lebedeva, O. S., Vassina, E. M., et al. (2016) Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons, *Mol. Neurodegener.*, 11, 27, doi: 10.1186/s13024-016-0092-5.
- Zhang, H., Li, Q., Graham, R. K., Slow, E., Hayden, M. R., and Bezprozvanny, I. (2008) Full length mutant huntingtin is required for altered Ca²⁺ signaling and apoptosis of striatal neurons in the YAC mouse model of Huntington's disease, *Neurobiol. Dis.*, **31**, 80-88, doi: 10.1016/j.nbd.2008.03.010.
- Park, C. Y., Shcheglovitov, A., and Dolmetsch, R. (2010) The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits Ltype voltage-gated calcium channels, *Science*, 330, 101-105, doi: 10.1126/science.1191027.
- Cepeda, C., Wu, N., Andre, V. M., Cummings, D. M., and Levine, M. S. (2007) The corticostriatal pathway in Huntington's disease, *Prog. Neurobiol.*, **81**, 253-271, doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.11.001.
- 35. Chen, S., Yu, C., Rong, L., Li, C. H., Qin, X., Ryu, H., and Park, H. (2018) Altered synaptic vesicle release and Ca²⁺ influx at single presynaptic terminals of cortical neurons in a knock-in mouse model of Huntington's disease, *Front. Mol. Neurosci.*, **11**, 478, doi: 10.3389/fnmol.2018. 00478.
- Miranda, A. S., Cardozo, P. L., Silva, F. R., de Souza, J. M., Olmo, I. G., et al. (2019) Alterations of calcium channels in a mouse model of Huntington's disease and neuroprotection by blockage of CaV1 channels, *ASN Neuro*, 11, 1759091419856811, doi: 10.1177/1759091419856811.
- Joshi, P. R., Wu, N. P., Andre, V. M., Cummings, D. M., Cepeda, C., et al. (2009) Age-dependent alterations of corticostriatal activity in the YAC128 mouse model of Huntington's disease, *J. Neurosci.*, 29, 2414-2427, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5687-08.2009.
- Youle, R. J., and van der Bliek, A. M. (2012) Mitochondrial fission, fusion, and stress, *Science*, 337, 1062-1065, doi: 10.1126/science.1219855.
- Kim, J., Moody, J. P., Edgerly, C. K., Bordiuk, O. L., Cormier, K., et al. (2010) Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease, *Hum. Mol. Genet.*, 19, 3919-3935, doi: 10.1093/hmg/ddq306.
- 40. Costa, V., Giacomello, M., Hudec, R., Lopreiato, R., Ermak, G., et al. (2010) Mitochondrial fission and cristae disruption increase the response of cell models of Huntington's disease to apoptotic stimuli, *EMBO Mol. Med.*, **2**, 490-503, doi: 10.1002/emmm.201000102.

- Yano, H., Baranov, S. V., Baranova, O. V., Kim, J., Pan, Y., et al. (2014) Inhibition of mitochondrial protein import by mutant huntingtin, *Nat. Neurosci.*, **17**, 822-831, doi: 10.1038/nn.3721.
- Oliveira, J. M., Chen, S., Almeida, S., Riley, R., Goncalves, J., et al. (2006) Mitochondrial-dependent Ca²⁺ handling in Huntington's disease striatal cells: effect of histone deacetylase inhibitors, *J. Neurosci.*, 26, 11174-11186, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3004-06.2006.
- Seong, I. S., Ivanova, E., Lee, J. M., Choo, Y. S., Fossale, E., et al. (2005) HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism, *Hum. Mol. Genet.*, 14, 2871-2880, doi: 10.1093/hmg/ddi319.
- Choo, Y. S., Johnson, G. V., MacDonald, M., Detloff, P. J., and Lesort, M. (2004) Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calciuminduced permeability transition and cytochrome c release, *Hum. Mol. Genet.*, 13, 1407-1420, doi: 10.1093/hmg/ ddh162.
- Shirendeb, U., Reddy, A. P., Manczak, M., Calkins, M. J., Mao, P., et al. (2011) Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: implications for selective neuronal damage, *Hum. Mol. Genet.*, 20, 1438-1455, doi: 10.1093/hmg/ddr024.
- Panov, A. V., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., et al. (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines, *Nat. Neurosci.*, 5, 731-736, doi: 10.1038/ nn884.
- Cherubini, M., Lopez-Molina, L., and Gines, S. (2020) Mitochondrial fission in Huntington's disease mouse striatum disrupts ER-mitochondria contacts leading to disturbances in Ca²⁺ efflux and Reactive Oxygen Species (ROS) homeostasis, *Neurobiol. Dis.*, **136**, 104741, doi: 10.1016/ j.nbd.2020.104741.
- Schmidt, M. E., Buren, C., Mackay, J. P., Cheung, D., Dal Cengio, L., et al. (2018) Altering cortical input unmasks synaptic phenotypes in the YAC128 cortico-striatal co-culture model of Huntington disease, *BMC Biol.*, 16, 58, doi: 10.1186/s12915-018-0526-3.
- Koch, E. T., Woodard, C. L., and Raymond, L. A. (2018) Direct assessment of presynaptic modulation of corticostriatal glutamate release in a Huntington's disease mouse model, *J. Neurophysiol.*, **120**, 3077-3084, doi: 10.1152/jn. 00638.2018.
- Mackay, J. P., Buren, C., Smith-Dijak, A. I., Koch, E. T., Zhang, P., et al. (2020) Spontaneous axonal ER Ca²⁺ waves mediate a shift from action potential-dependent to independent glutamate release in the YAC128 HD-Model, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.01.31.929299.
- Smith-Dijak, A. I., Nassrallah, W. B., Zhang, L. Y. J., Geva, M., Hayden, M. R., and Raymond, L. A. (2019) Impairment and restoration of homeostatic plasticity in cultured cortical neurons from a mouse model of Huntington's disease, *Front. Cell Neurosci.*, 13, 209, doi: 10.3389/fncel.2019.00209.
- Parievsky, A., Moore, C., Kamdjou, T., Cepeda, C., Meshul, C. K., and Levine, M. S. (2017) Differential electrophysiological and morphological alterations of thalamostriatal and corticostriatal projections in the R6/2 mouse model of Huntington's disease, *Neurobiol. Dis.*, **108**, 29-44, doi: 10.1016/j.nbd.2017.07.020.
- Kolodziejczyk, K., and Raymond, L. A. (2016) Differential changes in thalamic and cortical excitatory synapses onto striatal spiny projection neurons in a Huntington disease mouse model, *Neurobiol. Dis.*, 86, 62-74, doi: 10.1016/ j.nbd.2015.11.020.

- Hayashi, T., and Su, T. P. (2007) Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival, *Cell*, **131**, 596-610, doi: 10.1016/ j.cell.2007.08.036.
- 55. Mori, T., Hayashi, T., Hayashi, E., and Su, T. P. (2013) Sigma-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival, *PLoS One*, **8**, e76941, doi: 10.1371/journal.pone.0076941.
- Srivats, S., Balasuriya, D., Pasche, M., Vistal, G., Edwardson, J. M., et al. (2016) Sigmal receptors inhibit store-operated Ca²⁺ entry by attenuating coupling of STIM1 to Orai1, *J. Cell Biol.*, **213**, 65-79, doi: 10.1083/ jcb.201506022.
- Brailoiu, G. C., Deliu, E., Console-Bram, L. M., Soboloff, J., Abood, M. E., et al. (2016) Cocaine inhibits store-operated Ca²⁺ entry in brain microvascular endothelial cells: critical role for sigma-1 receptors, *Biochem. J.*, 473, 1-5, doi: 10.1042/BJ20150934.
- Kourrich, S., Su, T. P., Fujimoto, M., and Bonci, A. (2012) The sigma-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease, *Trends Neurosci.*, 35, 762-771, doi: 10.1016/j.tins. 2012.09.007.
- Tchedre, K. T., Huang, R. Q., Dibas, A., Krishnamoorthy, R. R., Dillon, G. H., and Yorio, T. (2008) Sigma-1 receptor regulation of voltage-gated calcium channels involves a direct interaction, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 49, 4993-5002, doi: 10.1167/iovs.08-1867.
- Zhang, K., Zhao, Z., Lan, L., Wei, X., Wang, L., Liu, X., Yan, H., and Zheng, J. (2017) Sigma-1 receptor plays a negative modulation on N-type calcium channel, *Front. Pharmacol.*, 8, 302, doi: 10.3389/fphar.2017.00302.
- 61. Martina, M., Turcotte, M. E., Halman, S., and Bergeron, R. (2007) The sigma-1 receptor modulates NMDA receptor synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus, *J. Physiol.*, **578**, 143-157, doi: 10.1113/jphysiol.2006.116178.
- Klette, K. L., Lin, Y., Clapp, L. E., DeCoster, M. A., Moreton, J. E., and Tortella, F. C. (1997) Neuroprotective sigma ligands attenuate NMDA and trans-ACPD-induced calcium signaling in rat primary neurons, *Brain Res.*, **756**, 231-240, doi: 10.1016/s0006-8993(97)00142-x.
- 63. Al-Saif, A., Al-Mohanna, F., and Bohlega, S. (2011) A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis, *Ann. Neurol.*, **70**, 913-919, doi: 10.1002/ana.22534.
- Tagashira, H., Shinoda, Y., Shioda, N., and Fukunaga, K. (2014) Methyl pyruvate rescues mitochondrial damage caused by SIGMAR1 mutation related to amyotrophic lateral sclerosis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 3320-3334, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.08.012.
- 65. Tsai, S. Y., Hayashi, T., Harvey, B. K., Wang, Y., Wu, W. W., et al. (2009) Sigma-1 receptors regulate hippocampal dendritic spine formation via a free radical-sensitive mechanism involving Rac1xGTP pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 106, 22468-22473, doi: 10.1073/pnas.0909089106.
- Tchedre, K. T., and Yorio, T. (2008) Sigma-1 receptors protect RGC-5 cells from apoptosis by regulating intracellular calcium, Bax levels, and caspase-3 activation, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 49, 2577-2588, doi: 10.1167/iovs.07-1101.
- Bauer, P. O., Hudec, R., Ozaki, S., Okuno, M., Ebisui, E., et al. (2011) Genetic ablation and chemical inhibition of IP3R1 reduce mutant huntingtin aggregation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **416**, 13-17, doi: 10.1016/j.bbrc. 2011.10.096.
- Miki, Y., Tanji, K., Mori, F., and Wakabayashi, K. (2015) Sigma-1 receptor is involved in degradation of intranuclear inclusions in a cellular model of Huntington's disease, *Neurobiol. Dis.*, 74, 25-31, doi: 10.1016/j.nbd.2014.11.005.

- Ryskamp, D., Wu, J., Geva, M., Kusko, R., Grossman, I., Hayden, M., and Bezprozvanny, I. (2017) The sigma-1 receptor mediates the beneficial effects of pridopidine in a mouse model of Huntington's disease, *Neurobiol. Dis.*, 97, 46-59, doi: 10.1016/j.nbd.2016.10.006.
- Ryskamp, D. A., Korban, S., Zhemkov, V., Kraskovskaya, N., and Bezprozvanny, I. (2019) Neuronal sigma-1 receptors: signaling functions and protective roles in neurodegenerative diseases, *Front. Neurosci.*, 13, 862, doi: 10.3389/fnins.2019.00862.
- Eddings, C. R., Arbez, N., Akimov, S., Geva, M., Hayden, M. R., and Ross, C. A. (2019) Pridopidine protects neurons from mutant-huntingtin toxicity via the sigma-1 receptor, *Neurobiol. Dis.*, **129**, 118-129, doi: 10.1016/j.nbd. 2019.05.009.
- Sahlholm, K., Arhem, P., Fuxe, K., and Marcellino, D. (2013) The dopamine stabilizers ACR16 and (-)-OSU6162 display nanomolar affinities at the sigma-1 receptor, *Mol. Psychiatry*, 18, 12-14, doi: 10.1038/mp.2012.3.
- Brimson, J. M., Brimson, S., Chomchoei, C., and Tencomnao, T. (2020) Using sigma-ligands as part of a multi-receptor approach to target diseases of the brain, *Expert Opin. Ther. Targets*, 1-20, doi: 10.1080/ 14728222.2020.1805435.
- 74. Grachev, I. D., Meyer, P. M., Becker, G. A., Bronzel, M., Marsteller, D., et al. (2020) Sigma-1 and dopamine D2/D3 receptor occupancy of pridopidine in healthy volunteers and patients with Huntington's disease: a [(18)F] fluspidine and [(18)F] fallypride PET study, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, doi: 10.1007/s00259-020-05030-3.

NORMALIZATION OF THE CALCIUM BALANCE IN STRIATAL NEURONS IN HUNTINGTON'S DISEASE: THE ROLE OF SIGMA 1 RECEPTOR AS A POTENTIAL TARGET FOR THERAPY

Mini-review

N. A. Kraskovskaya^{1*} and I. B. Bezprozvanny^{1,2*}

¹ Laboratory of Molecular Neurodegeneration, Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, 195251 Saint-Petersburg, Russia; E-mail: ninakraskovskaya@gmail.com; mnlabspb@gmail.com ² Department of Physiology, UT Southwestern Medical Center at Dallas, 75390 Dallas, USA

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative, dominantly inherited genetic disease. The cause of HD is the expansion of the polyglutamine tract in the huntingtin gene. At the cellular level HD is characterized by the accumulation of a mutant huntingtin protein in brain cells resulting in development of the HD phenotype which include mental disorders, decreased cognitive abilities and progressive motor impairment in the form of chorea. Despite numerous studies, a clear connection between the accumulation of mutant protein and the selective death of striatal neurons has not yet been established. Recent studies have shown impairment in calcium homeostasis in striatal neurons in case of HD. Cells of this type are extremely sensitive to changes in the concentration of calcium in the cytoplasm and its excessive increase leads to their death. One of the possible ways to normalize the calcium balance in striatum neurons is through to the sigma 1 receptor (S1R). This protein is a calcium sensor and exhibits modulating chaperone activity under conditions of cell stress observed during the development of many neurodegenerative diseases. Ligand-operated functioning makes S1R a new promising molecular target for the development of drug therapy for HD treatment based on the agonists of the receptor.

Keywords: sigma 1 receptor, Huntington's disease, dendritic spines, calcium, store-operated calcium entry, endoplasmic reticulum, mitochondria

УДК 577.352.4

ХИМИЧЕСКИЙ ШАПЕРОН РВА ОСЛАБЛЯЕТ ЭПР-СТРЕСС И АКТИВИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ SOCS3, РЕГУЛЯТОРА ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ ЛЕПТИНА

© 2021 Б. Баба¹, М. Чалышкан², Г. Бёюк³, А. Хаджишевки^{4*}

¹ Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Yüksek İhtisas University, 06520 Ankara, Turkey
 ² Department of Genetic, Gaziosmanpaşa Hospital, Yeni Yüzyil University, 34245 Istanbul, Turkey
 ³ Department of Physiology, Faculty of Medicine, Ankara Medipol University, 06050 Ankara, Turkey
 ⁴ Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Gazi University, 06100 Ankara, Turkey; E-mail: abozkir@gazi.edu.tr

Поступила в редакцию 08.09.2020 После доработки 22.12.2020 Принята к публикации 22.12.2020

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) очень чувствителен к питательному и энергетическому состоянию клеток. Нарушение гомеостаза ЭПР приводит к накоплению развернутых/неправильно свернутых белков в просвете ЭПР, что определяется как ЭПР-стресс. ЭПР-стресс запускает процесс отклика на неструктурированные белки (UPR). Предполагается, что хронический стресс ЭПР связан с ожирением и резистентностью к лептину. Мы стремились изучить роль ЭПР-стресса и эффект воздействия фенилмасляной кислоты (РВА), ингибитора ЭПР-стресса, на ожирение, а также их влияние на передачу сигналов лептина. В этом исследовании участвовали двадцать четыре худых и двадцать четыре лептин-дефицитных (ob/ob) мышей. В соответствии с введением РВА эти мыши были разделены на две группы. Островки поджелудочной железы выделяли, затем инкубировали с лептином в течение 48 часов. С помощью ПЦР в реальном времени в островках измеряли экспрессию C/EBP гомологичного белка (CHOP) и X-box связывающего белка (1XBP1) в качестве сигнальных индикаторов UPR, а также экспрессию супрессора цитокиновой передачи сигнала 3 (SOCS3) в качестве регулятора передачи сигналов лептина. Уровни экспрессии XBP1 и CHOP были заметно увеличены в ob/ob-контроле по сравнению с другими группами с обработкой лептином и без него. Соответственно, не было значительных различий в уровне экспрессии ХВРІ и СНОР для ob/ob мышей, получивших PBA, и худых мышей. После обработки лептином уровнь экспрессии SOCS3 был значительно повышен у ob/ob мышей, получавших PBA, по сравнению с контрольными ob/ob. Не было существенной разницы между ob/ob мышами, получавшими PBA, и худыми мышами в отношении уровней SOCS3 с обработкой лептином и без него. Наши результаты показали, что ЭПР-стресс играет важную роль в патологии ожирения, а также, что РВА снижает ЭПР-стресс и может потенциально улучшить передачу сигналов лептина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: химический шаперон, стресс эндоплазматического ретикулума, передача сигнала лептина, ожирение, фенилмасляная кислота, отклик на неструктурированные белки.

DOI: 10.31857/S0320972521040084

введение

Ожирение — глобальная проблема здравоохранения с высокими показателями заболеваемости и смертности в развитых и развивающихся странах [1, 2]. Обычно это связано с системным и местным воспалением, а также с повышенной выработкой лептина [3, 4]. Лептин обладает действием против ожирения, однако большинство пациентов с ожирением неадекватно реагируют на повышение уровня лептина [1, 5]. Следовательно, устойчивость к лептину в основном используется для описания состояний ожирения, при которых наблюдается гиперлептинемия и/или снижение чувствительности к лечению лептином [4]. Связывание лептина с его рецептором приводит к активации белков ЈАК, которые фосфорилируют несколько остатков тирозина на рецепторе лептина, обеспечивая рекрутирование и фосфорилирование STAT. Резистентность к лептину связывают со снижением лептин-опосредованной ЈАК-STAT передачей сигнала [6]. Возможно, SOCS3 или протеин-тирозинфосфатаза 1В (РТР1В)

Принятые сокращения: ЭПР – эндоплазматический ретикулум; СНОР – С/ЕВР гомологичный белок; eIf2a – фактор инициации эукариот 2a; ob/ob – мыши с дефицитом лептина; PBA – фенилмасляная кислота (phenylbutyric acid); SOCS3 – супрессор цитокиновой передачи сигнала; Stat3 – преобразователь сигнала и активатор транскрипции 3; UPR – отклик на неструктурированные белки (unfolded protein response); XBP1 – X-box-связывающий белок.

^{*} Адресат для корреспонденции.
участвуют в возникновении устойчивости к лептину. Однако подробный механизм устойчивости к лептину плохо изучен [5]. Недавно было высказано предположение, что стресс эндоплазматического ретикулума участвует в патогенезе резистентности к лептину [7, 8].

Дисбаланс между действительной нагрузкой на ЭПР по фолдингу белка и способности ЭПР делать это без ошибок приводит к накоплению развернутых или неправильно свернутых белков в просвете ЭПР, что называется ЭПР-стрессом [9]. Чтобы уменьшить ЭПР-стресс и обеспечить правильное сворачивание белка, ЭПР активирует адаптивный ответ, инициируя некоторые каскады передачи сигналов, называемые откликом на неструктурированные белки (UPR) [10]. В физиологических условиях UPR служит программой выживания клеток, защищающей от повреждений, вызванных ЭПРстрессом, или повышенными рабочими нагрузками [11]. Однако при тяжелом или хроническом стрессе UPR может стимулировать гибель клеток посредством апоптоза [12].

Отклик на неструктурированные белки инициируется активацией трех основных трансдукторов: (протеинкиназа R)-подобной киназы эндоплазматического ретикулума (PERK), активирующего фактора транскрипции 6 (ATF6) и инозитол-требующего фермента 1 (IRE1) [11, 12-15]. Активация PERK приводит к фосфорилированию фактора инициации эукариот 2 α (eIf2 α), который ослабляет общий синтез белка и рабочую нагрузку на ЭПР [12, 13, 16].

Апоптоз, вызванный стрессом ЭПР, в основном опосредуется С/ЕВР гомологичным белком, СНОР, который является фактором транскрипции, индуцирующим экспрессию множества проапоптотических факторов, и расположен ниже PERK-eIf2α-ATF4- и ATF6-путей в UPR [9]. ATF6 регулирует экспрессию генов шаперонов ЭПР и ЭПР-ассоциированных генов деградации для улучшения производительности работы шаперонов, деградации развернутых белков и предотвращения протеотоксичности ЭПР [14]. Активированный IRE1 обладает эндонуклеазной активностью и сплайсирует мРНК фактора транскрипции XBP1. Х-box-связывающий белок, XBP1, стимулирует транскрипцию генов, участвующих в сворачивании белков, созревании и деградации неправильно свернутых белков. Кроме того, IRE1 также активирует фактор 2, связанный с рецептором фактора некроза опухоли (TRAF2), способствуя активации *N*-терминальной киназы с-Jun (JNK) и ядерного фактора-кВ (NF-кВ) [17]. Повышенные уровни JNK и NF-кВ способствуют выработке провоспалительных цитокинов, что приводит к

БИОХИМИЯ том 86 вып. 4 2021

дальнейшему воспалению и ЭПР-стрессу [16]. Недавние исследования предоставляют убедительные доказательства того, что гомеостаз ЭПР активно участвует в основных механизмах, связывающих ожирение и диабет [10, 11].

β-Клетки являются клетками секреции, они имеют высокоразвитый ЭПР и, следовательно, более чувствительны к развитию ЭПР-стресса [18]. Химические шапероны – это небольшие молекулы, которые увеличивают работоспособность ЭПР и улучшают способность ЭПР к фолдингу белков [8, 19]. На сегодняшний день два химических шаперона, фенилмасляная кислота (РВА) и тауроурсодезоксихолевая кислота (TUDCA), были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пишевых продуктов и медикаментов [8, 15]. РВА представляет собой низкомолекулярную жирную кислоту с шапероноподобной активностью, которая может стабилизировать конформацию белка, улучшать способность ЭПР к фолдингу белков и облегчать транспортировку мутантных белков [15, 19]. В нашем исследовании мы стремились изучить роль стресса ЭПР и влияние фенилмасляной кислоты на ожирение, а также их воздействие на передачу сигналов лептина в островках поджелудочной железы. Поэтому мы решили оценить сигнальные маркеры UPR и лептина на моделях мышей с ожирением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и экспериментальный план. Это исследование включало контрольную группу из двадцати четырех худых мышей дикого типа и двадцати четырех мышей C57BL/6 с дефицитом лептина (ob/ob). Самцы мышей, мыши ob/ob в возрасте 12–16 недель и их контрольная группа худых мышей были предоставлены больницей. Мышей содержали в комнате при световом режиме 12/12, стандартный гранулированный корм и вода были предоставлены в свободном доступе. В течение первых трех дней 100 мкл PBS (фосфатно-буферный раствор) вводили худым мышам и мышам ob/ob через желудочный зонд 2 раза в день (утром, в 9 ч и вечером, в 17 ч). Через 3 дня были взяты образцы крови из хвостовой вены для измерения уровней циркулирующего инсулина после 6-часового голодания. Затем были начаты введения PBS и PBA (нулевой день). Мышам ob/ob, а также худым мышам того же возраста и пола (12 мышей в каждой группе) через оральный желудочный зонд вводили 500 мг/кг PBA («Sigma», Германия) 2 раза в день (всего 1 г/кг/день) или PBS (плацебо) в течение 30 дней [8, 19]. Во всех группах периодически проверяли концентрацию глюкозы в крови в сытом состоянии и массу тела. Для оценки чувствительности к инсулину на 15-й день выполняли тест на толерантность к инсулину (ITT) и тест на толерантность к глюкозе (GTT) – на 16-й день. Для оценки уровня инсулина у мышей после 6-часового голодания на 20-й и 30-й день были взяты дополнительные образцы крови. Животных умерщвляли с помощью ксилазина/кетамина после 6-часового голодания на 30-й день и выделяли островки поджелудочной железы.

Тесты на толерантность к инсулину и глюкозе. Были выполнены тест на толерантность к инсулину — на 15-й день и тест на толерантность к глюкозе — на 16-й день. Утром после введения РВА или PBS мыши голодали в течение 6 ч. Затем подкожно вводили 2 МЕ/кг инсулина и измеряли концентрацию глюкозы в крови в течение 2 ч (0, 30, 60, 90 и 120 мин). Для GTT всем мышам вводили PBA или PBS вечером и не кормили в течение ночи (~12 ч). После этого периода PBA или PBS не вводили утром, а вводили низкую дозу глюкозы (0,5 г/кг) внутрибрюшинно. Затем в течение 2 ч (0, 30, 60, 90 и 120 мин) измеряли концентрацию глюкозы в крови [19].

Выделение островков и клеточная культура. Выделение островков проводили после окончания всех введений. Островки поджелудочной железы мышей выделяли в соответствии с ранее опубликованным методом Carter et al. [20] с модификациями. После умерщвления мышей островки выделяли путем расщепления коллагеназой. Раствор коллагеназы типа V («Sigma») в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) вводили в проток поджелудочной железы, и надували поджелудочную железу перед ее удалением. Удаленную поджелудочную железу выдерживали при 37 °С в течение 18 мин для процесса ферментативного переваривания. После инкубации в каждую пробирку добавляли 25 мл холодного HBSS (10% FBS, 1% L-глутамин, 1%-ная смесь антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) «Sigma»), а затем центрифугировали при 1300 об./мин, 3 мин при 4 °С. Этот шаг повторяли трижды. Островковые клетки очищали с использованием Biocoll 1100 и Biocoll 1077 («Biochrom», Великобритания) и RPMI-1640 (10% FBS, 1% L-глутамин, 1%-ная смесь антибиотиков (пенициллин/стрептомицин), 25 мМ HEPES) («Sigma»), а затем подсчитывали. Островки от двух мышей объединяли в один образец, чтобы получить достаточное и относительно одинаковое количество островков для каждой группы. Всего было получено шесть образцов от двенадцати мышей на группу в соответствии с введением РВА. Все образцы были разделены на равные партии для дальнейшего изучения влияния обработки лептином. Одну из партий инкубировали с 13,5 нмоль/мл лептина в течение 48 ч при 37 °С в инкубаторе в атмосфере 5% СО₂, а другую – инкубировали без лептина [21]. В конечном итоге для каждой группы было получено по шесть образцов обработанных и не обработанных лептином. Затем островки из всех образцов были разделены для определения жизнеспособности клеток, проведения ПЦР-РВ и вестерн-блоттинга. Визуализацию островков с помощью инвертированного микроскопа выполняли путем окрашивания клеток дитизоном (использовали раствор 10 мг/мл в ДМСО) (рис. S1–S4 в Приложении).

Анализ жизнеспособности клеток. Жизнеспособность островков во всех группах с обработкой лептином и без нее определяли с помощью флуоресцентного микроскопа с использованием двойной окраски (флуоресцеин диацетат/пропидий йодид). Сначала 910 мкл DPBS (фосфатно-солевой буфер по Дульбекко (рН 7,4)) («Biowest», Франция) помещали в чашку Петри диаметром 35 мм, а затем в чашку добавляли 90 мкл образца островков. После этого добавляли 20 мкл стокового раствора флуоресцеин диацетата («Sigma»), (24 мкМ; 1 мг флуоресцеин диацетата растворяли в 100 мл ацетона) и 20 мкл стокового раствора пропидий йодида («Sigma»), (750 мкМ; 5 мг пропидий йодида растворяли в 10 мл PBS (pH 7,4). Затем чашки Петри помещали в темное место на 5 мин. Жизнеспособность исследовали при 40× увеличении на флуоресцентном микроскопе («Leica», Германия). С помощью программы МАТ-LAB были сделаны фотографии островков, и был определен процент жизнеспособности островков (рис. S1-S6 в Приложении).

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Всю РНК извлекали из островков с помощью набора «Total RNA isolation kit» («5 Prime», США) в соответствии с инструкциями производителя и количественно определяли с помощью «NanoDrop» («Thermo Fisher», США). Равные количества РНК во всех группах с обработкой лептином и без нее подвергали обратной транскрипции с использованием набора «cDNA synthesis kit» («Qiagen», США). Для ПЦР-РВ использовали набор «RT-PCR kit» («Qiagen»). К образцам кДНК добавляли смесь ПЦР-РВ. Последовательности праймеров, использованных в работе представлены в таблице.

Пробирки для ПЦР помещали в прибор Rotor-Gene Q («Qiagen») и проводили ПЦР-РВ в течение 40 циклов в следующих условиях: 94 °C – 15 с; 61 °C – 30 с; 72 °C – 30 с. Данные из объединенных пяти отдельных образцов в каждой группе с обработкой лептином и без него Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	5'-3' последовательность праймеров
CHOP (FW)	5'-AACAGAGGTCACACGCACAT-3'
CHOP (RV)	5'-ACTTTCCGCTCGTTCTCCTG-3'
XBP1s (FW)	5'-GGTCTGCTGAGTCCGCAGCAGG-3'
XBP1s (RV)	5'-AGGCTTGGTGTATACATGG-3'
SOCS3 (FW)	5'-CTTTTCTTTGCCACCCACGG-3'
SOCS3 (RV)	5'-CCGTTGACAGTCTTCCGACA-3'
GAPDH (FW)	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'
GAPDH (RV)	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'

анализировали с использованием метода 2^{- $\Delta\Delta$ CT} [22].

Вестерн-блоттинг. Выделение белков проводили по методике производителя с использованием набора «Protein isolation kit» («Millipore», Германия). Из каждой группы, с обработкой лептином и без нее, были объединены образцы для измерения концентрации белка методом Брэдфорда [23]. Белки (25 мкг) загружали в гель «Mini-Protean TGX Stain Free Gels» («Biorad», США), и разделение проходило при 150 В в течение 1 ч. Перенос на мембрану PVDF (поливинилиденфторид, «Biorad») осуществляли при 25 В и 2,5 А за 8 мин. После переноса мембраны блокировали в блокирующем буфере (TBST в присутствии 5% BSA (w/v)) в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере. Блокирующий буфер откачивали, и мембрану промывали 3 раза TBST в течение 10 мин. Белок-специфичные первичные антитела, работающие в блокирующем буфере, разбавляли соответствующим образом и встряхивали при 4 °С на шейкере в течение 12-16 ч [elf2 α , p-elf2 α , Stat3, антитела к β-актину (1/1000) и p-Stat3-антитела (1/750); («Cell signaling», США)]. После этого мембрану промывали TBST (4 раза по 5 мин), далее мембрану обрабатывали вторичными антителами при комнатной температуре в течение 1 ч на шейкере («Anti-rabbit» и «Anti-mouse» (1/2000); («Cell signaling»)). Затем мембрану снова промывали TBST (4 раза по 5 мин). Полосы белка выявляли с использованием растворов люминола («Santa-Cruz», США), а изображения получали с помощью устройства визуализации «Molecular Imager ChemiDoc XRS +» («Biorad»). Каждую полосу анализировали программой «Image Lab» (версия программного обеспечения 5.2.1.). Данные, полученные на основе площади полос и их интенсивности, нормализовали в сравнении с бета-актином. Использовались нормализованные данные для всех групповых

сравнений. Однако из-за небольшого количества островков и, следовательно, небольшого количества белка, доступного для анализа, исследование включало один эксперимент, и поэтому статистический анализ не мог быть выполнен (рис. S7 и S8 в Приложении).

Измерение уровня инсулина. Уровни инсулина в плазме определяли с помощью набора «Elisa kit» («Millipore») в соответствии с инструкциями производителя.

Статистический анализ. Для статистического анализа использовалась компьютерная программа SPSS (версия 16.00). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка (SE). U-критерий Манна–Уитни использовали для определения значимости различий между группами, критерий знаковых рангов Вилкоксона использовали для внутригруппового сравнения, а дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса использовали для проверки различий между более чем двумя независимыми группами. Связь между переменными анализировали с помощью коэффициента Спирмена. Статистически значимыми считались результаты при p < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эффект от введения PBA in vivo. Уровни глюкозы в крови в состоянии сытости и масса тела всех мышей отслеживали через определенные интервалы. Как и ожидалось, у контрольных животных ob/ob, получавших плацебо, уровень глюкозы в крови был значительно выше и сильно отличался от уровня глюкозы худых мышей в дни исследования. У мышей ob/ob, получавших РВА, уровень глюкозы в крови был значительно ниже, чем у контрольной группы ob/ob с 7-го по 30-й дни. У мышей оb/ob, получавших РВА, на 30-й день уровень глюкозы в крови стал нормогликемическим, такой же как у худых мышей. Не было существенной разницы между ob/ob мышами, получавшими РВА, и их контрольной группой по массе тела (рис. 1, *а* и *b*). При сравнении уровня инсулина в плазме всех экспериментальных групп было обнаружено, что уровень инсулина у мышей ob/ob, получавших PBA и плацебо, был значительно выше, чем у худых мышей, получавших РВА и плацебо. Не было статистически значимой разницы в уровне инсулина в 0 и 20 дней между мышами ob/ob, получавшими РВА и плацебо, однако введение РВА привело к значительному снижению уровня инсулина на 30-й день (рис. 1, *c*).

Чтобы оценить чувствительность к инсулину, был проведен тест на толерантность к инсулину (ITT). Было определено, что чувствительность к



Рис. 1. Влияние введения РВА на уровень глюкозы в крови (*a*), массу тела (*b*) и концентрацию инсулина (*c*) (по сравнению с группами худых мышей (*p < 0,01); по сравнению с контрольными группами ob/ob (°p < 0,01, n = 7)

инсулину у мышей ob/ob, получавших PBA, была выше, чем у мышей ob/ob, получавших плацебо, относительно индуцированной инсулином кривой глюкозы в крови (рис. 2, *a*). GTT проводился для оценки толерантности к глюкозе. После введения глюкозы у мышей ob/ob, получавших плацебо, определяли тяжелую гипергликемию и ухудшение толерантности к глюкозе. У мышей ob/ob, получавших PBA, толерантность к глюкозе была лучше по сравнению с мышами ob/ob, получавшими плацебо (рис. 2, *b*).

Введение PBA снижает экспрессию маркеров UPR. В островках экспрессия белков маркеров сигнальных путей UPR, XBP1 и СНОР определялась во всех группах с обработкой лептином и без него. Уровни мРНК XBP1 и СНОР были заметно увеличены в островках мышей ob/ob, получавших плацебо, по сравнению с другими группами с обработкой лептином и без него (p < 0,01). Не было значительных различий в уровне экспрессии XBP1s и CHOP между островками ob/ob и худых мышей, получавших PBA (рис. 3).

Введение РВА приводит к усилению передачи сигналов лептина. Чтобы выяснить, приводит ли введение РВА к изменению уровня SOCS3, мы оценили уровни экспрессии этого маркера в островках. Была проанализирована экспрессия SOCS3 в островках всех групп, обработанных лептином. Был снижен уровень экспрессии SOCS3 в островках мышей ob/ob, получавших плацебо, по сравнению контрольной группой худых мышей с обработкой лептином и без него (p < 0.05). Уровень экспрессии SOCS3 был



Рис. 2. *а* – Тест на толерантность к инсулину (* p < 0,05, ** p < 0,01, ob/ob-контроль по сравнению с ob/ob-PBA, n = 3-6). *b* – Тест на толерантность к глюкозе (* p < 0,05, ** p < 0,01, ob/ob-контроль по сравнению с ob/ob-PBA, n = 2)



Рис. 3. Относительная экспрессия XBP1 (*a* и *c*) и CHOP (*b* и *d*) в группах с обработкой лептином (*c* и *d*) и без него (*a* и *b*) (** p < 0,01). Были проанализированы данные из пяти объединенных образцов в каждой группе с обработкой лептином и без него

значительно повышен в островках мышей ob/ob, получавших PBA, по сравнению с контрольной группой ob/ob после обработки лептином (p < 0,05). Было отмечено, что нет значительных различий между ob/ob мышами, которым вводили PBA, и худыми мышами, при сравнении относительных уровней мPHK SOCS3 у мышей с обработкой лептином и без него (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании мы оценили роль ЭПР-стресса и эффект воздействия хими-

ческого шаперона PBA на ожирение, а также влияние ЭПР-стресса и PBA на передачу сигналов лептина в островках. Это первое исследование, в котором оценивается влияние PBA на передачу сигналов лептина в островках мышей оb/ob. Во-первых, в нашем исследовании мы наблюдали воздействие PBA на мышей ob/ob *in vivo*. Было обнаружено, что, хотя контрольные группы ob/ob демонстрировали тяжелую гипергликемию, введение PBA мышам ob/ob снижало высокий уровень глюкозы в крови до нормогликемического уровня, такого как у худых мышей. В соответствии с существующими данными об уровнях глюкозы в крови, мы обнаружили, что высокие концентрации инсулина у мышей

ob/ob снижались при введении PBA. Однако PBA не влияет на массу тела. Наши результаты показали, что толерантность к глюкозе улучшилась, а чувствительность к инсулину увеличилась при введении PBA мышам ob/ob. Наши данные согласуются с предыдущими исследованиями, которые проводились на моделях мышей с ожирением [8, 19].

ЭПР-стресс стал критическим медиатором в патогенезе ожирения [24]. Недавние исследования показали, что существует связь между ожирением и ЭПР-стрессом. Во многих исследованиях жировой ткани, печени и гипоталамуса мышей с ожирением сообщалось о повышении регуляции маркеров ЭПР-стресса [8, 19, 25-27]. Согласно данным предыдущих исследований, введение PBA и TUDCA снижало ЭПР-стресс в печени, жировой ткани и гипоталамусе [8, 19, 26]. Все больше данных свидетельствует о том, что ЭПР-стресс важен для гомеостаза поджелудочной железы [14]. В физиологических условиях активация передачи сигналов UPR может быть полезной для функции бета-клеток. Однако при патологических условиях длительная передача сигналов UPR может оказывать пагубное влияние на функцию и выживаемость бета-клеток [15, 28]. В случае резистентности к инсулину и ожирения поддержание секреторной функции бета-клеток является большой нагрузкой на ЭПР бета-клеток [29]. Появляется все больше доказательств наличия ЭПР-стресса при диабете [30-32]. В поджелудочной железе пациентов с диабетом 1-го типа была повышена экспрессия островкового ATF3 [33] и CHOP, но XBP1 был сопоставим с контролем [34]. В предыдущих исследованиях островков и/или поджелудочной железы экспрессия генов, связанных со ЭПРстрессом, была увеличена в экспериментальных моделях [35, 36] и у людей с диабетом 2-го типа [35]. Было высказано предположение, что изменения в экспрессии медиаторов UPR могут вносить вклад в снижение функции островков у мышей и людей с диабетом 2-го типа [29]. Тапсигаргин, который, как известно, индуцирует ЭПР-стресс, увеличивал активацию мРНК XBP1 островков крыс линии Wistar [37] и увеличивал активацию каспазы-3 в INS-клетках, а PBA значительно снижал индуцированную глюкозой экспрессию СНОР и активацию каспазы-3 [38]. Более того, Malo et al. [39] обнаружили, что РВА ингибирует ЭПР-стресс в ацинарных клетках поджелудочной железы крыс. В нашем исследовании мы изучали экспрессию маркеров UPR, включая СНОР и ХВР1, и влияние РВА на эти маркеры в островках мышей ob/ob. Наши результаты показали, что зависимые от ЭПРстресса пути активировались при ожирении, а обработка РВА предотвращала активацию этих компонентов UPR. Наши результаты согласуются с предыдущими исследованиями.

571

Ожирение связано с развитием ЭПР-стресса и активацией UPR в метаболически активных тканях, что может вызывать нарушение передачи сигналов лептина, способствуя развитию связанной с ожирением резистентности к лептину [2, 40]. В предыдущем исследовании сообщалось, что ЭПР-стресс вызывает нарушение индуцированного лептином фосфорилирования преобразователя сигнала и активатора транскрипции 3 (Stat3) в клетках нейробластомы че-



Рис. 4. Относительная экспрессия SOCS3 во всех группах с лечением лептином (*a*) и без него (*b*) (* $p \le 0.05$). Были проанализированы данные из пяти объединенных образцов в каждой группе с лечением лептином и без него

ловека [41]. Последние данные свидетельствуют о том, что ЭПР-стресс участвует в резистентности к лептину [41], а химические шапероны, которые снижают ЭПР-стресс, восстанавливают чувствительность к лептину, вызванную ЭПРстрессом [7, 8]. Результаты предыдущих исследований показали, что повышенный ЭПРстресс и активация UPR ингибировали передачу сигналов рецептора лептина в гипоталамусе на моделях мышей с ожирением, а введение РВА значительно повышало чувствительность к лептину [8, 42]. Hosoi et al. [5] показали, что ЭПРстресс заметно ингибировал индуцированное лептином фосфорилирование Stat3 в эмбриональных клетках почки и нейробластомы человека, но ЭПР-стресс не индуцировал SOCS3. Согласно их результатам, ЭПР-стресс вызывал устойчивость к лептину, и индуцированная ЭПР-стрессом устойчивость к лептину опосредовалась через РТР1В, а не через SOCS3. Более того, было также продемонстрировано, что РВА корректирует вызванную ЭПР-стрессом устойчивость к лептину [5]. В настоящем исследовании пониженные уровни SOCS3 в островках контрольной группы с ожирением были значительно восстановлены до нормального уровня у мышей с ожирением, получавших РВА, после обработки лептином. Известно, что при ожирении нарушается функция ЭПР, а химический шаперон РВА ингибирует ЭПР-стресс, повышая способность к фолдингу и транспортировке, а также восстанавливает клеточные механизмы. Это подтверждается нашими выводами об увеличении экспрессии белка SOCS3 у мышей с ожирением, получавших РВА. Основываясь на факте повышения чувствительности к лептину, наши результаты также предполагают, что РВА может увеличивать экспрессию SOCS3.

В заключении: ЭПР-стресс играет важную роль в патологии ожирения и способствует развитию связанной с ожирением резистентности к лептину. Химический шаперон PBA ослабляет ЭПР-стресс и потенциально может улучшить передачу сигналов лептина. Понимание основных механизмов, которые связывают ЭПРстресс и ожирение, а также то, как PBA влияет на чувствительность к лептину, важно для лечения ожирения и связанных с ним расстройств. Следовательно, необходимы дальнейшие исследования, чтобы полностью понять эти механизмы.

Финансирование. Это исследование было поддержано Советом по научным и технологическим исследованиям Турции (TUBITAK) (проект № 114S830).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

Соблюдение этических норм. В настоящем исследовании соблюдались все применимые международные, национальные и/или институциональные руководящие принципы по уходу и использованию животных. Исследование было проведено с одобрения Комитета по этике животных при Учебно-исследовательской больнице Йылдырым Беязит (Yildirim Beyazit Training and Research Hospital), Анкара, Турция (№ 2014/21).

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (http:// protein.bio.msu.ru/biokhimiya) и на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/ journal/10541), том 86, вып. 4, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fruhwürth, S., Vogel, H., Schürmann, A., and Williams, K. J. (2018) Novel insights into how overnutrition disrupts the hypothalamic actions of leptin, *Front. Endocrinol.*, 9, 1-6, doi: 10.3389/fendo.2018.00089.
- Thon, M., Hosoi, T., Yoshii, M., and Ozawa, K. (2014) Leptin induced GRP78 expression through the PI3KmTOR pathway in neuronal cells, *Sci. Rep.*, 4, 1-8, doi: 10.1038/srep07096.
- Park, H. K., and Ahima, R. S. (2015) Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism, *Metabolism*, 64, 24-34, doi: 10.1016/j.metabol.2014. 08.004.
- Sáinz, N., Barrenetxe, J., Moreno-Aliaga, M. J., and Martínez, J. A. (2015) Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin, *Metabolism*, 64, 35-46, doi: 10.1016/j.metabol.2014.10.015.
- 5. Hosoi, T., Sasaki, M., Miyahara, T., Hashimoto, C., Matsuo, S., et al. (2008) Endoplasmic reticulum stress

induces leptin resistance, *Mol. Pharmacol.*, **74**, 1610-9, doi: 10.1124/mol.108.050070.

- Yadav, A., Kataria, M. A., Saini, V., and Yadav, A. (2013) Role of leptin and adiponectin in insulin resistance, *Clin. Chim. Acta*, **417**, 80-84, doi: 10.1016/j.cca.2012.12.007.
- Hosoi, T., and Ozawa, K. (2016) Possible pharmacological approach targeting endoplasmic reticulum stress to ameliorate leptin resistance in obesity, *Front. Endocrinol.*, 7, 1-4, doi: 10.3389/fendo.2016.00059.
- 8. Ozcan, L., Ergin, A. S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., et al. (2009) Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance, *Cell Metab.*, **9**, 35-51, doi: 10.1016/j.cmet.2008.12.004.
- Zhang, K., and Kaufman, R. J. (2008) From endoplasmicreticulum stress to the inflammatory response, *Nature*, 454, 455-462, doi: 10.1038/nature07203.
- Sha, H., He, Y., Yang, L., and Qi, L. (2011) Stressed out about obesity: IRE1α-XBP1 in metabolic disorders, *Trends*

Endocrinol. Metab., **22**, 374-381, doi: 10.1016/j.tem.2011. 05.002.

- Park, S. W., and Ozcan, U. (2013) Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease, *Semin. Immunopathol.*, **35**, 351-373, doi: 10.1007/s00281-013-0370-z.
- 12. Hotamişligil, G. (2010) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease, *Cell*, **140**, 900-917, doi: 10.1016/j.cell.2010.02.034.
- Jäger, R., Bertrand, M. J., Gorman, A. M., Vandenabeele, P., and Samali, A. (2012) The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress, *Biol. Cell*, **104**, 259-270, doi: 10.1111/boc.201100055.
- Bensellam, M., Laybutt, D. R., and Jonas, J. C. (2012) The molecular mechanisms of pancreatic β-cell glucotoxicity: recent findings and future research directions, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **364**, 1-27, doi: 10.1016/j.mce.2012.08.003.
- Engin, F., and Hotamisligil, G. S. (2010) Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones: an emerging therapeutic approach for metabolic diseases, *Diab. Obes. Metab.*, **12**, 108-115, doi: 10.1111/j.1463-1326.2010.01282.x.
- Khan, S., and Wang, C. H. (2014) ER stress in adipocytes and insulin resistance: mechanisms and significance, *Mol. Med. Rep.*, 10, 2234-2240, doi: 10.3892/mmr.2014.2532.
- Eizirik, D. L., Miani, M., and Cardozo, A. K. (2013) Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation, *Diabetologia*, 56, 234-41, doi: 10.1007/s00125-012-2762-3.
- Lei, X., Bone, R. N., Ali, T., Wohltmann, M., Gai, Y., et al. (2013) Genetic modulation of islet β-cell iPLA₂β expression provides evidence for its impact on β-cell apoptosis and autophagy, *Islets*, **5**, 29-44, doi: 10.4161/isl.23758.
 Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M.,
- Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., et al. (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes, *Science*, **313**, 1137-1140, doi: 10.1126/science.1128294.
- Carter, J. D., Dula, S. B., Corbin, K. L., Wu, R., Nunemaker, C. S. (2009) A practical guide to rodent islet isolation and assessment, *Biol. Proceed. Online*, **11**, 3-31, doi: 10.1007/s12575-009-9021-0.
- Marroquí, L., Vieira, E., Gonzalez, A., Nadal, A., and Quesada, I. (2011) Leptin downregulates expression of the gene encoding glucagon in alphaTC1-9 cells and mouse islets, *Diabetologia*, 54, 843-51, doi: 10.1007/s00125-010-2024-1.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, 29, 2002-2007, doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- 23. Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Liu, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhang, J., Liu, Y., et al. (2017) Obesity-induced endoplasmic reticulum stress suppresses nuclear factor-Y expression, *Mol. Cell. Biochem.*, 426, 47-54, doi: 10.1007/s11010-016-2879-7.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., et al. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes, *Science*, **306**, 457-461, doi: 10.1126/science.1103160.
- Basseri, S., Lhoták, S., Sharma, A. M., and Austin, R. C. (2009) The chemical chaperone 4-phenylbutyrate inhibits adipogenesis by modulating the unfolded protein response, *J. Lipid Res.*, **50**, 2486-501, doi: 10.1194/jlr.M900216-JLR200.

- Sreejayan, N., Dong, F., Kandadi, M. R., Yang, X., and Ren, J. (2008) Chromium alleviates glucose intolerance, insulin resistance, and hepatic ER stress in obese mice, *Obesity (Silver Spring)*, 16, 1331-1337, doi: 10.1038/oby.2008.217.
- Engin, F., Yermalovich, A., Nguyen, T., Hummasti, S., Fu, W., et al. (2013) Restoration of the unfolded protein response in pancreatic β cells protects mice against type 1 diabetes, *Sci. Transl. Med.*, **5**, 1-14, doi: 10.1126/scitranslmed.3006534.
- Engin, F., Nguyen, T., Yermalovich, A., and Hotamisligil, G. S. (2014) Aberrant islet unfolded protein response in type 2 diabetes, *Sci. Rep.*, 4, 1-6, doi: 10.1038/srep04054.
- Eizirik, D. L., Cardozo, A. K., and Cnop, M. (2008) The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus, *Endocr. Rev.*, 29, 42-61, doi: 10.1210/er.2007-0015.
- Cnop, M., Foufelle, F., and Velloso, L. A. (2012) Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes, *Trends Mol. Med.*, 18, 59-68, doi: 10.1016/j.molmed.2011.07.010.
- Cnop, M., Toivonen, S., Igoillo-Esteve, M., and Salpea, P. (2017) Endoplasmic reticulum stress and eIF2α phosphorylation: the Achilles heel of pancreatic β cells, *Mol. Metab.*, 6, 1024-1039, doi: 10.1016/j.molmet.2017.06.001.
- Hartman, M. G., Lu, D., Kim, M. L., Kociba, G. J., Shukri, T., et al. (2004) Role for activating transcription factor 3 in stress-induced β-cell apoptosis, *Mol. Cell. Biol.*, 24, 5721-5732, doi: 10.1128/MCB.24.13.5721-5732.2004.
- Marhfour, I., Lopez, X. M., Lefkaditis, D., Salmon, I., Allagnat, F., et al. (2012) Expression of endoplasmic reticulum stress markers in the islets of patients with type 1 diabetes, *Diabetologia*, 55, 2417-2420, doi: 10.1007/s00125-012-2604-3.
- Laybutt, D. R., Preston, A. M., Akerfeldt, M. C., Kench, J. G., Busch, A. K., et al. (2007) Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes, *Diabetologia*, 50, 752-63, doi: 10.1007/s00125-006-0590-z.
- 36. Matsuda, T., Kido, Y., Uchida, T., and Kasuga, M. (2008) Reduced insulin signaling and endoplasmic reticulum stress act synergistically to deteriorate pancreatic beta cell function, *Kobe J. Med. Sci.*, **54**, E114-E121.
- Elouil, H., Bensellam, M., Guiot, Y., Vander Mierde, D., Pascal, S. M., et al. (2007) Acute nutrient regulation of the unfolded protein response and integrated stress response in cultured rat pancreatic islets, *Diabetologia*, **50**, 1442-52, doi: 10.1007/s00125-007-0674-4.
- Syeda, K., Mohammed, A. M., Arora, D. K., and Kowluru, A. (2013) Glucotoxic conditions induce endoplasmic reticulum stress to cause caspase 3 mediated lamin B degradation in pancreatic β-cells: protection by nifedipine, *Biochem. Pharmacol.*, **86**, 1338-1346, doi: 10.1016/ j.bcp.2013.08.023.
- Malo, A., Krüger, B., Göke, B., and Kubisch, C. H. (2013)
 4-Phenylbutyric acid reduces endoplasmic reticulum stress, trypsin activation, and acinar cell apoptosis while increasing secretion in rat pancreatic acini, *Pancreas*, 42, 92-101, doi: 10.1097/MPA.0b013e318259f6ca.
- Ye, Z., Liu, G., Guo, J., and Su, Z. (2018) Hypothalamic endoplasmic reticulum stress as a key mediator of obesityinduced leptin resistance, *Obes. Rev.*, **19**, 770-785, doi: 10.1111/obr.12673.
- Hosoi, T., Miyahara, T., Kayano, T., Yokoyama, S., and Ozawa, K. (2012) Fluvoxamine attenuated endoplasmic reticulum stress-induced leptin resistance, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **3**, 1-5, doi: 10.3389/fendo. 2012.00012.
- Won, J. C., Jang, P. G., Namkoong, C., Koh, E. H., Kim, S. K., et al. (2009) Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin, *Obesity*, **17**, 1861-1865, doi: 10.1038/oby.2009.194.

CHEMICAL CHAPERONE PBA ATTENUATES ER STRESS AND UPREGULATES SOCS3 EXPRESSION AS A REGULATOR OF LEPTIN SIGNALING

B. Baba¹, M. Çalişkan², G. Böyük³, and A. Hacişevki^{4*}

¹ Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Yüksek İhtisas University, 06520 Ankara, Turkey ² Department of Genetic, Gaziosmanpaşa Hospital, Yeni Yüzyil University, 34245 Istanbul, Turkey

³ Department of Physiology, Faculty of Medicine, Ankara Medipol University, 06050 Ankara, Turkey

⁴ Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Gazi University, 06100 Ankara, Turkey; E-mail: abozkir@gazi.edu.tr

Endoplasmic reticulum (ER) is very sensitive to the nutritional and energy states of the cells. Disruption of ER homeostasis leads to the accumulation of unfolded/misfolded proteins in the ER lumen, which is defined as ER stress. ER stress triggers the unfolded protein response (UPR). It is suggested that chronic ER stress is associated with obesity and leptin resistance. We investigated the role of ER stress and the effect of the ER stress inhibitor phenylbutyric acid (PBA) of in obesity, as well as their impact on leptin signaling. This study involved twenty-four lean and twenty-four leptin-deficient (ob/ob) mice divided into PBA- and vehicle-treated groups. Pancreatic islets were isolated incubated with leptin for 48 h, and assayed for the expression of CHOP and XBP1s (UPR signaling indicators) and SOCS3 (regulator of leptin signaling) by RT-qPCR. The expression levels of XBP1s and CHOP were markedly increased in the ob/ob controls compared to other groups with and without leptin treatment. No significant differences in the XBP1s and CHOP expression levels were found between the PBA-treated ob/ob and lean mice. SOCS3 expression was significantly upregulated in the PBA-treated ob/ob mice compared to the ob/ob controls after leptin treatment; but no significant difference in the SOCS3 expression was found between the PBA-treated ob/ob and lean mice with and without leptin treatment. Our findings suggested that ER stress plays an important role in the pathology of obesity, while PBA reduces ER stress and may potentially ameliorate leptin signaling.

Keywords: chemical chaperone, endoplasmic reticulum stress, leptin signaling, obesity, phenylbutyric acid, unfolded protein response

УДК 577.151

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЭНДО-КСАНТАНАЗЫ *Thermogutta terrifontis* в *Penicillium verruculosum*: ВЫДЕЛЕНИЕ И ПЕРВИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТА

© 2021 Ю.А. Денисенко^{1*}, О.Г. Короткова¹, И.Н. Зоров^{1,2}, А.М. Рожкова^{1,2}, М.В. Семенова¹, А.Г. Ельченинов¹, И.В. Кубланов¹, А.П. Синицын^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр «Основы фундаментальной биотехнологии» Российской академии наук, 119071 Москва, Россия; электронная почта: denisenkoyura@mail.ru ² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия

> Поступила в редакцию 10.11.2020 После доработки 29.12.2020 Принята к публикации 29.12.2020

С помощью экспрессионной системы на основе реципиентного штамма *Penicillium vertuculosum* 537 (Δ niaD) и промотора гена целлобиогидролазы 1 был создан штамм-продуцент гетерологичной эндо-ксантаназы из термофильного планктомицета *Thermogutta terrifontis*. Методами жидкостной хроматографии была выделена гомогенная эндо-ксантаназа с молекулярной массой 23,7 кДа (pI 6,5). Фермент обладал способностью к деструкции ксантана, а также проявлял активность по отношению к КМ-целлюлозе, β -глюкану, курдлану, лихенану, ламинарину, галактоманнану, ксилоглюкану и не гидролизовал *n*-нитрофенильные производные β -D-глюкозы, маннозы и целлобиозы. Температурный оптимум эндо-ксантаназы составил 55 °C, оптимум pH – 4,0; фермент проявлял 90% от максимальной активности в диапазоне температуры 50–60 °C и pH 3–5.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эндо-ксантаназа, *Thermogutta terrifontis*, *Penicillium verruculosum*, гетерологичная экспрессия, деструкция ксантана.

DOI: 10.31857/S0320972521040096

ВВЕДЕНИЕ

Ксантан (ксантановая камедь) является внеклеточным гетерополисахаридом, который продуцируют бактерии *Xanthomonas campestris*. Основная цепь ксантана состоит из связанных β -1,4-глюкозидной связью остатков глюкозы, боковые группы состоят из трех остатков: α -D-манноза (2 \rightarrow 1)- β -D-глюкуроновая кислота (4 \rightarrow 1)- β -D-манноза у каждого второго остатка глюкозы в положении C3 [1] (рис. 1), при этом проксимальный и дистальный маннозильные остатки боковой цепи часто являются ацетилированными или содержат пируватные группы.

Молекулярная масса (MM) ксантана составляет $1-7 \times 10^6$ Да. Степень полимеризации и ацетилирования ксантана может варьировать в зависимости от условий культивирования *X. campestris*.

Водные растворы ксантана образуют гелеобразную структуру. При растворении ксантан может быть неупорядочен, но чаще склонен к образованию упорядоченных структур, наиболее простая из которых — спираль главной цепи, вокруг которой выстраиваются боковые группы.

Раствор ксантана обладает свойством псевдопластичности (вязкость раствора уменьшается при увеличении напряжения сдвига). Благодаря этим качествам ксантановая камедь нашла применение в таких отраслях, как нефтедобыча, пищевая и косметическая промышленность [2, 3]. Основной объем ксантана используется при бурении вертикальных и наклонных скважин большого диаметра, а также в процессах интенсификации добычи нефти и природного газа с использованием технологии гидроразрыва пласта, где 0,5-2%-ные растворы ксантана (в том числе в смеси с другими полисахаридами) используются для доставки расклинивающих агентов (проппантов) в тело пласта. Закачиваемые в скважины растворы ксантана характеризуются низким фильтрационным сопротивлением при движении в среде, после завершения прокачки происходит гелеобразование, и вязкость раствора возрастает в сотни раз.

Принятые сокращения: КЖ – культуральная жидкость; ММ – молекулярная масса; $nH\Phi - napa$ -нитрофенильные производные; п.н. – пар нуклеотидов; $\Phi\Pi$ – ферментный препарат; ЭК – эндо-ксантаназа.

^{*} Адресат для корреспонденции.



Рис. 1. Структура мономерного звена ксантана

Важно, что вязкость ксантана в стволе скважины должна быть уменьшена после завершения операции гидроразрыва пласта, т.е. ксантан должен быть разрушен до низкомолекулярных сахаров. В настоящее время для этих целей применяются сильные окислители и другие агрессивные компоненты, которые оказывают негативное влияние на окружающую среду при попадании в открытые водоемы, грунтовые воды и отвалы в районе скважин.

Вместо сильнодействующих и вредных для окружающей среды химических веществ для деполимеризации ксантановой камеди целесообразно использовать гидролитические ферменты. Ввиду образования молекулами ксантана упорядоченных структур в водных растворах, необходимо использовать комплекс ферментов, состоящий из ксантан-специфичных эндо-глюканаз (эндо-ксантаназ, ЭК), разрушающих основную полисахаридную цепь ксантана, а также ксантан-лиаз, β-маннозидаз, α-маннозидаз и α-глюкуронидаз, которые расщепляют боковые цепи. Считается, что для эффективного снижения вязкости раствора ксантана необходим комплекс двух совместно функционирующих ферментов, в состав которого входят ЭК и ксантан-лиаза. Ксантан-лиаза катализирует расщепление β-D-маннозил-β-D-1,4-глюкуронильной связи на боковом радикале ксантана и высвобождает дистальную D-маннозильную группу (EC 4.2.2.12) [4].

На сегодняшний день известны бактерии, которые способны к деструкции ксантана за счет экспрессии ксантан-литических ферментов, например, *Cellulomonas* sp. LX [5] и *Bacillus* sp. [6]. Термофильный планктомицет *T. terrifontis*, который был выделен из горячих источников на Дальнем Востоке, способен расти на ксантановой среде в аэробных и анаэробных условиях [7]. Кроме того, транскриптом этой бактерии, помимо ЭК, имеет в своём составе мРНК нескольких ферментов, которые в соответствии с их субстратной специфичностью способны в комплексе с ЭК приводить к деструкции ксантана, в частности, α- и β-маннозидазы, и другие.

В работе Yang et al. [8] описана ЭК MiXen *Microbacterium* sp. XT11, которая имеет мультидоменную структуру и способна гидролизовать ксантан, находящийся в упорядоченной конформации. Также охарактеризована ЭК PspXan9 из *Paenibacillus nanensis*, которая демонстрирует невысокую активность по отношению к немодифицированному ксантану и способна эффективно гидролизовать только модифицированный ксантан – обработанный ксантан-лиазой [9].

Создание эффективных и экологичных ферментных препаратов ($\Phi\Pi$) на основе ЭК, способных снижать вязкость растворов ксантана, представляет интерес для нефтедобывающей и других отраслей промышленности. В связи с этим целью данной работы было использование экспрессионной системы гриба *P. verruculosum* для клонирования гена гетерологичной эндоксантаназы термофила *T. terrifontis*, выделение и первичная характеристика новой ЭК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы. Гриб *P. verruculosum* 537 (ΔniaD) был использован в качестве ауксотрофного штамма-реципиента, дефектного по гену *niaD*, кодирующему нитратредуктазу. Клетки термофильного планктомицета *T. terrifontis* R1(T) служили источником геномной ДНК [10].

Субстраты. Для измерения активности использовали следующие субстраты: ксантан (ксантановая камедь из *X. campestris*), Na соль карбоксиметилцеллюлозы (КМ-целлюлоза), глюкуроноксилан бука (ксилан), *n*-нитрофенил-β-D-глюкопиранозид, *n*-нитрофенил-β-Dманнопиранозид, целлобиоза («Sigma-Aldrich», США); ксантан нефтяной («TNJ», KHP); ксилоглюкан, галактоманнан, β-глюкан ячменя, ламинарин, лихенан, курдлан («Megazyme», Ирландия).

Прочие реактивы. Для приготовления реагентов Шомоди-Нельсона, Лоури и буферных растворов использовали реактивы классификации х.ч., ч.д.а. и о.с.ч. производства «АО Реахим» и «Хеликон» (Россия), «МР Biomedicals» (Франция), «Applichem» (Испания) и «Sigma-Aldrich» (США). Для культивирования рекомбинантного штамма *P. verruculosum* использовали глюкозу («Хеликон», Россия), пшеничные отруби («Энзим», Украина), микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) («МК-Центр», Россия), дрожжевой экстракт («Lesaffre», Франция). В качестве минеральных компонентов питательных сред применяли реактивы производства «Лабтех», «АО Реахим», «Химмед» (Россия), «МР Biomedicals» и «Sigma-Aldrich» (США).

Ферменты. Для измерения вязкости растворов ксантана использовали ксантан-лиазу *Bacillus* sp. GL1, EC 4.2.2.12 («Megazyme», Ирландия).

ПЦР и получение генетических конструкций. Для ПЦР был использован амплификатор С1000 Touch («Bio-Rad», США). Для амплификации гена *thte* 1561, кодирующего ЭК DUF1080, использовали в качестве матрицы геномную ДНК, выделенную из термофильного планктомицета T. terrifontis R1(T). Для ПЦР применяли Phusion ДНК-полимеразу («Thermo Scientific», США). Полученный ПЦР-продукт был клонирован методом независимого лигирования [11]. Далее ПЦР-продукт и линеаризованный вектор pUC-CBHI обрабатывали Т4 ДНК-полимеразой в присутствии дезоксиаденозинтрифосфата (dATP) и дезокситимидинтрифосфата (dTTP) соответственно («Thermo Scientific», США). Лигирование вставки (150 нг) и вектора pUC-CBHI (50 нг) проводили путем их смешивания и инкубирования; затем смесью трансформировали клетки Е. Mach1 coli («Invitrogen», США) по стандартному протоколу [12]. Котрансформация штамма-реципиента *P. verruculosum* 537 (Δ niaD) была проведена по адаптированной методике, описанной Алексенко и соавт. [13].

Скрининг клонов. Первичный скрининг с грибных колоний на наличие целевого гена осуществляли с использованием ДНК-полимеразы Phire Hot Start («Thermo Scientific», США) по исходным праймерам. Клоны P. verruculosum с подтвержденной вставкой целевого гена культивировали в колбах Эрленмейера при 30 °С в течение 6 сут. В состав среды входили следующие компоненты (в г/л): МКЦ – 40, пшеничные отруби – 10, дрожжевой экстракт – 10, КH₂PO₄ – 15, $(NH_4)_2SO_4 - 5$, $MgSO_4*7H_2O - 0.3$, $CaCl_{2}*2H_{2}O - 0.3$. Отбор клонов осуществляли по результатам проведения Ds-Na-ПААГ-электрофореза полученной при их культивировании культуральной жидкости (КЖ). Электрофорез проводили на приборе Mini-PROTEAN Tetra Cell («Bio-Rad Laboratories», США). В качестве маркеров для электрофореза использовали смесь белков №26612 («Thermo Scientific», США). Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури [14].

Наработка ферментных препаратов. Культивирование рекомбинантных штаммов для наработки ФП проводили в однолитровых ферментерах КФ-104/3 («Проинтех», Россия) с использованием следующего состава среды (в г/л): глюкоза – 57,1, МКЦ – 40, пшеничные отруби – 10, кукурузный экстракт – 30, мочевина – 2,5, КН₂РО₄ – 14, (NH₄)₂SO₄ – 10, CaCl₂ – 0,6, MgSO₄*7H₂O – 0,6 при 32 °C, pH 5,0 в течение 144 ч. По окончании грибную биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (30 мин, 4200 g, 4 °C) на приборе Avanti J6 («Вескта Coulter», США), после чего среда была обезвожена в распылительной сушилке Mini Spray Dryer B-290 («Висhi», Швейцария).

Выделение и очистка целевого белка. Выделение проводили с использованием системы для белковой хроматографии AKTA Purifier UPC 100 («GE Healthcare», Швеция). Процесс выделения состоял из следующих стадий: осаждение 70%-ным раствором сульфата аммония, перерастворение и обессоливание ФП на колонке с носителем Bio-Gel P2 («Bio-Rad», США), уравновешенной с 0,01 М буфером Bis-Tris/HCl, рН 7,3. Анионообменную хроматографию ФП проводили на колонке, заполненной носителем Source 15Q («GE Healthcare», США), уравновешенной с таким же 0,01 М буфером Bis-Tris/HCl, pH 7,3. Гидрофобную хроматографию проводили на колонке с носителем Source 15ISO («GE Healthcare», США), уравновешенной с 0,05 М Na-ацетатным буфером, рН 5,0, в присутствии 1,7 М (NH₄)₂SO₄. Фракции с целевым ферментом обессоливали на колонке с носителем Bio-Gel P2, уравновешенной с 0,05 М Na-ацетатным буфером, pH 5,0.

Идентификация целевого белка. Масс-спектрометрический анализ проводили в ЦКП «Прикладные биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН на приборе UltrafleXtreme II («Bruker Daltonics», Германия). Пептидные фрагменты анализировали с помощью программы Mascot («Matrix Science», Великобритания, доступна по ссылке http://www.matrixscience. com), а также онлайн-сервисов PeptideMass и FindPept (https://www.expasy.org).

Определение активности ферментов. Активность по отношению к полисахаридным субстратам определяли по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС) при 50 °С и рН 5,0. Концентрацию ВС определяли методом Шомоди–Нельсона [15], погрешность которого составляет 5–10%.

Активность по отношению к *n*-нитрофенильным производным (*n*НФ-) сахаров опреде-

ляли по скорости образования n-нитрофенола при 40 °C и pH 5,0 [16]. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта за 1 мин [16].

Определение температурного и pH-оптимума активности ФП и очищенных ферментов. При измерении pH-зависимости активности использовали лихенан и 0,1 М цитрат-фосфатный буфер (pH 3,0-8,5). Температурный профиль активности определяли в диапазоне 30-85 °C с шагом 5 °C при pH 5,0. Оптимальным считали интервал значений pH или температуры, в котором наблюдалось не менее 85% максимальной активности.

Влияние индивидуальных ферментов на изменение вязкости растворов ксантана. Сначала готовили 1%-ный раствор ксантана путем суспендирования порошка ксантана в течение ночи при комнатной температуре на магнитной мешалке в 0,02 M Tris-HCl буфере, pH 7,3. Далее разбавляли тем же буфером в присутствии 2 мМ CaCl₂ до необходимой концентрации (0,1%) ксантана) и перемешивали. К 15 мл рабочего раствора ксантана добавляли 0,5 мл буфера или фермента, перемешивали и инкубировали в термостате при 60 °С в течение 65 ч. Измерение вязкости проводили на ротационном вискозиметре DV2TLV («Brookfield», CША) с термостатируемой ячейкой, управление прибором и обработку результатов проводили при помощи программы Rheocalc T («Brookfield», США). Относительная погрешность измерения в ходе трехкратного повторения составила 4%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение генно-инженерных конструкций, трансформация штамма-реципиента. С помощью методов генной инженерии был амплифицирован ген thte_1561 (GenBank ASV74163.1) длиной 642 пары нуклеотидов (п.н.) при использовании LPM ДНК-полимеразы и пары праймеров на целевой ген, кодирующий ЭК DUF1080 (UniProt A0A286RDZ9). Амплификацию проводили методом ПЦР с геномной ДНК *T. terrifontis* R1(T). После выделения ПЦР-продукта из агарозного геля его лигировали с линеаризованным вектором pUC-CBHI.

Полученная плазмида была клонирована в компетентные клетки E. coli Mach1 для наработки генетического материала. После выделения и очистки плазмидной ДНК была проведештамма-реципиента котрансформация на Р. verruculosum 537 (∆niaD). Для первичного скрининга было отобрано 80 клонов, которые были пересеяны на твердую селективную среду. содержащую 10 мМ нитрата натрия в качестве источника азота. Скрининг грибных колоний был проведен с помощью ДНК-полимеразы Phire Hot Start и соответствующих праймеров. Было установлено, что 93% клонов содержали необходимый ген длиной 642 п.н. В качестве контроля использовали геномную ДНК T. terrifontis R1(T).

Культивирование рекомбинантных штаммов. Отобранные на селективной среде и содержащие целевой ген *thte_1561* клоны были культивированы в колбах Эрленмейера со стандартной



Рис. 2. Электрофореграмма КЖ после 6 сут. культивирования в колбах Эрленмейера. М – маркеры, слева по вертикали указаны ММ стандартных белков (кДа); К – реципиентный штамм *P. verruculosum* 537 (контроль). Сверху по горизонтали указаны номера КЖ (номер КЖ соответствует номеру культивируемого клона)



Рис. 3. Масс-спектр образца ЭК, зарегистрированный на приборе UltrafleXtreme II (*a.u.* – относительные единицы, *m/z* – приведенная масса)

жидкой питательной средой для *P. verruculosum*. На шестые сутки был проведен Ds-Na-ПА-АГ-электрофорез белковых фракций, а также измерены pH и концентрация белка в КЖ. При разделении белковых фракций по массе удалось выявить ряд клонов, экспрессирующих фермент с видимой MM 24 кДа, которая соответствует теоретической MM целевой ЭК – 23,7 кДа. На рис. 2 приведен пример электрофореграммы КЖ ряда клонов.

Полосы, соответствующие ЭК в КЖ № 21, 22 и 23, выделены рамкой на рис. 2. Контрольная электрофореграмма лабораторного штамма *P. verruculosum* 537 представлена в крайнем правом треке. С помощью программного обеспечения Gel Analyzer 2010а была проведена количественная оценка экспрессии ЭК. Она составила от 33 до 45% от общего содержания ферментов, т.е. 1,6 и 2,7 мг/мл в случае КЖ №21 и 22 соответственно. Белковые полосы, соответствующие ЭК, были вырезаны из геля и обработаны трипсином, гидролизаты подвергали MALDI-TOF массспектрометрическому анализу (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry). Результат представлен на рис. 3.

Анализ данных масс-спектрометрии проводили с помощью онлайн-сервиса FindPept и программы flexAnalysis. Массы 22-х полученных пептидов (1029,5; 1244,5; 1287,6; 1338,7; 1392,7; 1466,8; 1562,8; 1747,9; 1876,0; 2009,0; 2048,1; 2125,1; 2144,0; 2176,0; 2466,2; 2500,2; 2594,3; 2731,2; 3195,5; 3210,5; 3511,8; 3696,9 Да) соответствовали ММ теоретических пептидов после специфического трипсинолиза ЭК с погрешностью 100 ppm (point per million). Выравнивание последовательностей пептидов и аминокислотной последовательности зрелого белка ЭК показало 69,5% сходства; на последовательности ЭК ниже идентичные участки отмечены серым:



Рис. 4. *а* – Зависимость активности ЭК от pH (при 50 °C); *δ* – зависимость активности ЭК от температуры (при pH 5,0)

MKKLLVAVTEMFVLAVSLNLLYGTCVGAEE-FRGKWKPLWDGKTFKGWHTIGVG-TWTIEDGAIVGRKKAEEKEFGHLVSD-DVFKDFVVRLKFKVLQGNSGFYFRVEEK-GYSGVSGFQAEIAPDANTGGLYETN-GRAWVVQPSPEVVKKAFKPNEWNEMI-VAAKGGDITVWVNGVKTAEVKNDPGR-REGHFALQLHGGNDMLVMFKDIKILEPEE

Таким образом, масс-спектрометрические данные подтвердили экспрессию бактериальной ЭК DUF1080 *Т. terrifontis* в грибном штамме-реципиенте *P. verruculosum* 537.

Субстрат	Тип связи в основной цепи	Активность, ед./мг
Ксантан	β(1,4)	0,12
КМ-целлюлоза	β(1,4)	0,58
Ксилоглюкан	β(1,4)	0,18
Галактоманнан	β(1,4)	0,12
β-глюкан ячменя	$\beta(1,3)/\beta(1,4)$	0,56
Ламинарин	$\beta(1,3)/\beta(1,6)$	0,17
Лихенан	$\beta(1,3)/\beta(1,4)$	1,48
Курдлан	β(1,3)	0,12
Целлобиоза	β(1,4)	<0,01
<i>n</i> НФ-β-целлобиозид	β(1,4)	<0,002
<i>n</i> НФ-α-D глюкозид	α(1,4)	<0,002
<i>n</i> НФ-β-D глюкозид	β(1,4)	<0,002
<i>n</i> НФ-α-D маннозид	α(1,4)	<0,002
<i>n</i> НФ-β-D маннозид	β(1,4)	<0,002
<i>n</i> НФ-β-D глюкуронид	β(1,4)	<0,002

Активность выделенной гомогенной ЭК по отношению к разным субстратам (50 °C, pH 5,0)

По результатам культивирования в колбах был выбран клон №21, который далее культивировали В однолитровых ферментерах КФ-104/3. КЖ после ферментации была обезвожена на распылительной сушилке Mini Sprav Dryer B-290 («Висһі», Швейцария) с получением сухого ферментного препарата ЭК. Для выделения ЭК в гомогенном виде полученный ФП растворяли в стартовом буфере Tris-HCl, рН 7,3, центрифугировали и обессоливали. Обессоленный ФП фракционировали путем анионобменной хроматографии – ЭК не связывалась с носителем и элюировалась в несвязавшейся фракции. В ходе гидрофобной хроматографии ЭК также элюировалась в несвязавшейся фракции. Анализом MALDI-TOF было подтверждено выделение именно бактериальной ЭК T. terrifontis.

В итоге благодаря двум последовательным стадиям хроматографического разделения из ФП была выделена целевая бактериальная ЭК в гомогенном виде с чистотой > 98% (по данным Ds-Na-ПААГ-электрофореза).

Свойства гомогенной ЭК. Активность ЭК была измерена по отношению к ряду субстратов (таблица). Определение субстратной специфичности продемонстрировало, что помимо ксантана, исследуемая ЭК проявляла активность по отношению к ряду полисахаридов, имеющих β-1,4 и β-1,3/β-1,4-связи (КМ-целлюлоза, ксилоглюкан, галактоманнан, β-глюкан, ламинарин, лихенан, курдлан). Максимальная активность наблюдалась по отношению к лихенану. Активности по отношению к $nH\Phi \alpha$ - и β -глюкозидов детектировано не было. Следует отметить, что активность выделенной ЭК по отношению к ксантану оказалась сопоставима с активностью ЭК PspXan9 P. nanensis, составляющей 0,285 ед./мг (по отношению к нативному ксантану) [9].

Для определения температурного и pH-оптимума активности ЭК в качестве субстрата использовали лихенан, поскольку по отношению к нему наблюдалась максимальная активность (рис. 4).

Температурный оптимум ЭК составил 55 °С, рН-оптимум — 4,0. Фермент проявлял 90% от максимальной активности в диапазоне температур 50–60 °С и рН 3–5; 30% активности — при значениях рН 2 и 6 и температуре 80 °С.

Влияние ЭК на вязкость растворов ксантана. Как известно, ксантан-лиаза является одним из ферментов, способных модифицировать ксантан. В данной работе использовали фермент *Bacillus* sp., штамм GL1, которая является ксантан-лиазой I типа, т.е. специфичной к наличию пируватной группы на дистальном остатке D-маннозы. Было измерено влияние ЭК и ксантан-лиазы на изменение вязкости раствора ксантана поодиночке и совместно. К 15 мл 0,1 и 0,5%-ного раствора ксантана добавляли 0,5 мл буфера или раствора фермента. Концентрация каждого из ферментов в реакционной смеси составляла 3,25 мкг/мл. Далее раствор перемешивали и инкубировали в термостате при 60 °С в течение 65 ч. Вязкость растворов ксантана с буфером и с ферментами определяли на ротационном вискозиметре. Остаточная вязкость растворов ксантана под действием ферментов представлена на рисунке 5.

Для обеих выбранных концентраций ксантана максимальное уменьшение вязкости наблюдалось в случае совместного использования ксантан-лиазы и ЭК – до 60% от исходной. В одиночку ксантан-лиаза снижала вязкость до 80% от исходной. Гомогенная ЭК также оказалась эффективнее в менее концентрированном растворе ксантана – остаточная вязкость составила 77 и 69% в случае 0,5 и 0,1%-ного раствора соответственно.

При увеличении загрузки фермента в 4 раза остаточная вязкость 0,1%-ного раствора ксанта-



Рис. 5. Относительная остаточная вязкость растворов ксантана после обработки ферментами: ЭК, ксантан-лиазой и совместно двумя ферментами при 60 °С в течение 65 ч. a - 0.5%-ный раствор ксантана при загрузке ферментов в концентрации 3,25 мкг/мл; b - 0.1%-ный раствор при загрузке ферментов в концентрации 3,25 мкг/мл; b - 0.1%-ный раствор при загрузке ферментов в концентрации 3,25 мкг/мл; b - 0.1%-ный раствор при загрузке ферментов в концентрации 3,25 мкг/мл; b - 0.1%-ный раствор при концентрации ферментов 13 мкг/мл

на при добавлении гомогенной ЭК составила 56%, ксантан-лиазы — 71%. Максимальное снижение вязкости 0,1%-ного раствора ксантана наблюдалось в случае совместного действия ферментов. Увеличение концентрации ферментов привело к снижению остаточной вязкости 0,1%-ного раствора с 60 до 38%.

Полученные данные свидетельствуют, что ЭК способна самостоятельно снижать вязкость раствора ксантана в ходе длительного термостатирования при 60 °C, а добавление ксантан-лиазы *Bacillus* sp. увеличивает эффективность этого процесса.

С помощью экспрессионной системы на основе реципиентного штамма *P. verruculosum* 537 (Δ niaD) и промотора гена целлобиогидролазы 1 был создан штамм-продуцент эндо-ксантаназы (ЭК, DUF1080) из термофильного планктомицета *T. terrifontis*. Методами хроматографии была получена гомогенная ЭК с MM 23,7 кДа (pI 6,5). ЭК обладала способностью к деструкции ксантана без добавления вспомогательных ферментов, а также проявляла активность по отношению к КМ-целлюлозе, β -глюкану, курдлану, лихенану, ламинарину, галактоманнану, кси-

логлюкану, но не гидролизовала *n*-нитрофенильные производные β -D-глюкозы, маннозы и целлобиозы. Температурный и pH-оптимум ЭК составил 55 °C и 4,0, фермент проявлял 90% активности от максимальной в диапазоне температуры 50–60 °C и pH 3–5. Таким образом, была показана возможность получения ферментного препарата с эндо-ксантаназой на основе штамма *P. verruculosum* 537 (Δ niaD), способного к деструкции и снижению вязкости растворов ксантана.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственное задание 0104-2019-0009).

Благодарности. Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП «Промышленные биотехнологии» и АЦКП «Биоинженерия» ФИЦ Биотехнологии РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Janson, P., Kenne, L., and Lindberg, B. (1975) Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthamonas campestris*, *Carbohydr. Res.*, 45, 275-282, doi: 10.1016/ s0008-6215(00)85885-1.
- Santos, V. E., Casas, J. A., and Go, E. (2000) Xanthan gum: production, recovery, and properties, *Biotechnol. Adv.*, 18, 549-579, doi: 10.1016/s0734-9750(00)00050-1.
- Benny, I. S., Gunasekar, V., and Ponnusami, V. (2014) Review on application of xanthan gum in drug delivery, *Int. J. Pharmtech Res.*, 6, 1322-1326.
- 4. Nankai, H., Hashimoto, W., Miki, H., Kawai, S., and Murata, K. (1999) Microbial system for polysaccharide depolymerization: enzymatic route for xanthan depolymerization by *Bacillus* sp. strain GL1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 2520-2526.
- Liu, H., Huang, Ch., Dong, W., Du, Y., Bai, X., and Li, X. (2005) Biodegradation of xanthan by newly isolated Cellulomonas sp. LX, releasing elicitor-active xanthooligosaccharides-induced phytoalexin synthesis in soybean cotyledons, *Process Biochemistry*, 40, 3701-3706.
- Cadmus, M., Jackson, L., Kermita, A., Burton, E., Plattner, R., and Slodki, M. (1981) Biodegradation of xanthan gum by *Bacillus* sp., *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 5-11.
- Elcheninov, A. G., Menzel, P., Soley Gudbergsdottir, R., Slesarev, A. I., Kadnikov, V. V., et al. (2017) Sugar metabolism of the first thermophilic planctomycete *Thermogutta terrifontis*: comparative genomic and transcriptomic approaches, *Front. Microbiol.*, 8, 2140, doi: 10.3389/fmicb. 2017.02140.

- Yang, F., Li, H., Sun, J., Guo, X., Zhang, X., et al. (2019) Novel endotype xanthanase from xanthan-degrading *Microbacterium* sp. strain XT11, *Appl. Environ. Microbiol.*, 85, doi: 10.1128/AEM.01800-18.
- Moroz, O. V., Jensen, P. F., McDonald, S. P., McGregor, N., Blagova, E., Comamala, G., et al. (2018) Structural dynamics and catalytic properties of a multi-modular xanthanase, *ACS Catal.*, 8, 6021-6034.
- Slobodkina, G. B., Kovaleva, O. L., Miroshnichenko, M. L., Slobodkin, A. I., Kolganova, T. V., et al. (2014) *Thermogutta terrifontis* gen. nov., sp. nov. and *Thermogutta hypogea* sp. nov., thermophilic anaerobic representatives of the phylum *Planctomycetes*, *Int. J. System. Evol. Microbiol.*, 65, 760-765, doi: 10.1099/ijs.0.000009.
- 11. Aslanidis, C., and de Jong, P. J. (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR), *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6069-6074.
- 12. Sambrook, J., and Russell, D. (2001) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Aleksenko, A., Makarova, N., Nikolaev, I., and Clutterbuc, K. A. (1995) Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene, *Curr. Genet.*, 28, 474-478.
- Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. (1991) Справочник биохимика, Мир, Москва, с. 544.
- 15. Somogyi, M. (1952) A new reagent for the determination of sugars, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23.
- Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. (1995) Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. Учебн. пособие, Изд-во МГУ, Москва, с. 224.

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF ENDO-XANTHANASE Thermogutta terrifontis IN Penicillium verruculosum, ISOLATION AND PRIMARY CHARACTERIZATION OF THE ENZYME

Y. A. Denisenko^{1*}, O. G. Korotkova¹, I. N. Zorov^{1,2}, A. M. Rozhkova^{1,2}, M. V. Semenova¹, A. G. Elcheninov¹, I. V. Kublanov¹, and A. P. Sinitsyn^{1,2}

 Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; E-mail: denisenkoyura@mail.ru
 ² Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Heterologous endo-xanthanase (EX) from the thermophilic planktomycete *Thermogutta terrifontis* strain was obtained using *Penicillium veruculosum* 537 (Δ niaD) expression system with the cellobiohydrolase 1 gene promoter. Homogeneous EX with a molecular weight of 23.7 kDa (pI 6.5) was isolated using liquid chromatography methods. This xanthan degrading enzyme also possesses the enzymatic activity towards CM-cellulose, β -glucan, curdlan, lichenan, laminarin, galactomannan, xyloglucan but not towards *p*-nitrophenyl derivatives of β -D-glucose, mannose and cellobiose. The temperature and pH optima of EX were 55°C and 4.0, respectively; the enzyme exhibited 90% of its maximum activity in the temperature range 50-60°C and pH 3-5.

Keywords: endo-xanthanase, Thermogutta terrifontis, Penicillium verruculosum, heterologous expression, destruction of xanthan

УДК 615+616-05

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ГАЛАНИНА И ЕГО *N*-КОНЦЕВЫХ ФРАГМЕНТОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА *in vitro N in vivo**

© 2021 О.И. Писаренко^{**}, И.М. Студнева, Л.И. Серебрякова, А.А. Тимошин, Г.Г. Коновалова, В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, О.М. Веселова, И.В. Доброхотов, Р.О. Любимов, М.В. Сидорова, М.Е. Палькеева, А.С. Молокоедов

ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава РФ, 121552 Москва, Россия; электронная почта: olpi@live.ru

Поступила в редакцию 21.12.2020 После доработки 04.02.2021 Принята к публикации 08.02.2021

Антиоксидантные свойства галанина крысы GWTLNSAGYLLGPHAIDNHRSFSDKHGLT-NH₂ (Gal), Nконцевого фрагмента галанина (2–15 a. o.) WTLNSAGYLLGPHA (G1) и его модифицированного аналога WTLNSAGYLLGPβAH (G2) изучены на моделях региональной ишемии и реперфузии сердца крысы *in vivo* и Cu²⁺-индуцированного свободнорадикального окисления липопротеидов низкой плотности в плазме человека in vitro. Пептиды получены автоматическим твердофазным синтезом с использованием Fmoc-методологии. Их структура охарактеризована с помощью 1H-ЯМР-спектроскопии и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Полученные данные о влиянии пептидов показали, что внутривенное введение G1, G2 и Gal крысам после индуцированной ишемии уменьшало размеры инфаркта миокарда и активность маркеров некроза, креатинкиназы-МВ и лактатдегидрогеназы, в плазме крови к концу реперфузии. G1, G2 и Gal снижали образование спинового аддукта гидроксильных радикалов в интерстиции зоны риска сердца при реперфузии; более того, G2 и Gal также снижали образование вторичных продуктов перекисного окисления липидов в реперфузированном миокарде. В экспериментах in vivo и in vitro показано, что способность пептидов галанина снижать продукцию АФК и ингибировать перекисное окисление липидов при реперфузионном повреждении миокарда не связана напрямую с их влиянием на активность ферментов антиоксидантной защиты – Си, Zn-супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы. Пептиды G1, G2 и Gal в концентрации 0,01 и 0,1 мМ ингибировали Cu²⁺-индуцированное свободнорадикальное окисление липо-протеидов низкой плотности человека *in vitro*. Полученные при моделировании окислительного стресса результаты показывают, что природные и синтетические агонисты рецепторов галанина снижают продукцию короткоживущих АФК в сердце, а также липидных радикалов в плазме крови. Таким образом, рецепторы галанина могут быть перспективной терапевтической мишенью при сердечно-сосудистых заболеваниях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: галанин, сердце, ишемия и реперфузия, некроз, перекисное окисление липидов, антиоксидантные ферменты, мембраны кардиомиоцитов.

DOI: 10.31857/S0320972521040102

введение

Нейропептид галанин, состоящий у крысы из 29 аминокислотных остатков (а. о.) (из 30 – у человека), участвует в жизненно важных процессах – запоминания, потребления пищи, засыпания, продукции ряда гормонов; на клеточном уровне – в поддержании ионного гомеостаза и осмоса. Этот пептид также играет роль в развитии алкогольной зависимости и невропатической боли. В периферических органах, включая сердце, действие галанина опосредовано не только нейрональными механизмами, но и активацией трансмембранных рецепторов GalR1, GalR2 и GalR3 [1]. За связывание с рецепторами отвечает *N*-концевой фрагмент пептида, первые 15 а. о. которого консервативны и сохраняются у большинства видов. Роль рецеп-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ДМПО – 5,5-диметил-1-пирролин *N*-оксид; ДМСО – диметилсульфоксид; ЗР – зона риска; И/Р – ишемия/реперфузия; ИМ – инфаркт миокарда; КК-МВ – креатинкиназа-МВ; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ЛЖ – левый желудочек; ЛНП – липопротеиды низкой плотности; ПНА – передняя нисходящая коронарная артерия; ПОЛ – перекисное окисление липидов; ВНТ – бутилированный гидрокситолуол; САТ – каталаза; Сu,Zn-SOD – Cu,Zn-супероксиддисмутаза; GSH-Px – глутатионпероксидаза.

^{*} Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/ biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-393, 25.03.2021.

^{**} Адресат для корреспонденции.

торов галанина в регуляции сердечно-сосудистой системы в норме и при патологии малоизучена. Исследования последних лет показали, что запуск сигнального пути через рецептор GalR2 *N*-концевыми фрагментами галанина H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-OH (2–11) и H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala-OH (2–15) (G1) ингибирует апоптоз при гипоксии/реоксигенации изолированных кардиомиоцитов крысы и кардиомиобластов клеточной линии Н9с2 благодаря снижению продукции супероксидного анионрадикала и пероксида водорода в митохондриях [2, 3]. Оба пептида способствуют метаболическому и функциональному восстановлению сердца крысы после повреждения, индуцированного ишемией/реперфузией (И/Р) ex vivo и in vivo. Благодаря указанным выше свойствам пептидов, становится перспективной возможность использования фармакологических агонистов рецепторов галанина для уменьшения повреждения ишемизированного сердца. Для оптимизации физико-химических свойств фрагментов галанина мы синтезировали ряд модифицированных аналогов пептида G1 с сохранением фармакофорных а. о., ответственных за связывание с рецептором GalR2. Общая формула этих пептидов – Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-X-Gly-Pro-Y, где X = Leu, Y = His-Ala-NH₂; или X = Nle, Y = His-Arg-OH; или $X = Leu, Y = \beta Ala-His-OH (G2)$. Изучение этих пептидов на моделях И/Р повреждения сердца продемонстрировало их кардиотропные свойства [4]. Наиболее эффективной оказалась химерная молекула G2, представляющая собой последовательность галанина (2–13), дополненную природным дипептидом карнозином, Н-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-βAla-His-OH [5]. В недавнем исследовании, выполненном на крысах с кардиомиопатией, вызванной введением доксорубицина, применение пептида G2 уменьшало дисфункцию сердца [6]. Защитный эффект сопровождался снижением перекисного окисления липидов (ПОЛ) вследствие увеличения активности Си, Zn-супероксиддисмутазы (Си, Zn-SOD) и глутатионпероксидазы (GSH-Px) в поврежденном миокарде, а также улучшением энергетического обеспечения кардиомиоцитов. Настоящая работа является продолжением исследования антиоксидантных свойств лигандов рецепторов галанина. Цели данной работы: (1) изучение действия синтетического пептида G2, природного фрагмента галанина (2-15) G1, и полноразмерного галанина крысы (1-29) (Gal) на активность Cu,Zn-SOD, GSH-Рх и каталазы (CAT), образование активных форм кислорода (АФК) и продуктов ПОЛ в ишемизированном сердце крысы in vivo; (2) изучение действия указанных пептидов на активность ферментов Cu,Zn-SOD, GSH-Px и CAT в модельных системах in vitro; (3) оценка влияния пептидов на уровень свободнорадикального окисления липопротеидов низкой плотности (ЛНП) при его индукции in vitro с помошью Си²⁺.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пептиды галанина. В работе использованы Gal и его N-концевые фрагменты G1 и G2, полученные путём ступенчатого твердофазного синтеза с использованием Fmoc-методологии в лаборатории синтеза пептидов ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ РФ [5, 7]. Их очистка проведена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращённой фазе, структура охарактеризована с помощью 1H-ЯМР-спектроскопии и MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) масс-спектрометрии. Характеристики пептидов представлены в таблице 1.

Модельные животные. Для изучения влияния пептидов на сердце при ишемии и реперфузии использовали самцов крыс Wistar (массой 300—350 г). Животных содержали в виварии в условиях естественного освещения и свободного доступа к воде и корму. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода за лабораторными животными и их использования в экспериментах были соблюдены.

Таблица 1. Характеристики пептидов галанина

Пептид	Последовательность	Мол. вес, г/моль	MALDI-TOF, m/z
Gal	GWTLNSAGYLLGPHAIDNHRSFSDKHGLT-NH $_2$	3164,4	3163,47
G1	WTLNSAGYLLGPHA	1499,7	1499,72
G2	WTLNSAGYLLGP βAH	1499,7	1499,76

Примечание. Замены аминокислот показаны жирным шрифтом.

Модель региональной ишемии и реперфузии у крыс *in vivo*. Крыс Wistar наркотизировали 20%ным уретаном (1200 мг/кг веса внутрибрюшинно) и в условиях торакотомии осуществляли искусственную вентиляцию лёгких комнатным воздухом с помощью аппарата KTR-5 («Нидо Sacks Electronik», Германия). Яремную вену катетеризировали для окрашивания сердца 1%ным раствором Эванса в конце процедуры, сонную артерию – для регистрации артериального давления. Регистрацию систолического артериального давления (САД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) проводили на полиграфе Biograph-4 (Санкт-Петербургский госуниверситет аэрокосмического приборостроения, Россия) при присоединении артериального катетера к тензометрическому датчику. Запись на компьютер выполнена с помощью аналогоцифрового преобразователя USB-6210 и программы LabView 7 («National Instruments», США) [5]. По окончании подготовки животного следовал 30-минутный период стабилизации гемодинамических показателей (далее – «исходное состояние»), затем проводилась окклюзия передней нисходящей коронарной артерии (ПНА) в течение 40 мин, после чего следовал период реперфузии в течение 60 мин. В экспериментальной серии после периода региональной ишемии внутривенно болюсом вводили пептиды Gal, G1 и G2 в дозах 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 или 3,0 мг/кг веса одновременно с началом реперфузии; в контрольной серии опытов – такой же объём физиологического раствора (0,5 мл). В отдельной серии экспериментов было исследовано влияние растворителя пептидов 0,2%-ного раствора диметилсульфоксида (ДМСО) на размеры инфаркта миокарда (ИМ). В конце процедуры для идентификации зоны риска (3P) и интактной области миокарда реокклюдировали ПНА и в яремную вену вводили болюсно 2%ный раствор Эванса (2 мл). Затем сердце вырезали и выделяли левый желудочек (ЛЖ) для последующего определения размеров ИМ.

Оценка некротической гибели кардиомиоцитов в зоне риска. Степень некроза кардиомиоцитов в ЗР определяли по площади ИМ методом компьютерной планиметрии с помощью программы ImageJ (NIH, США). Замороженный ЛЖ разрезали перпендикулярно длинной оси сердца на 4—5 срезов толщиной $\approx 1,5-2,0$ мм, которые затем инкубировали 10 мин в 1%-ном растворе 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида в 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4 при 37 °C) и фиксировали в 10%-ном формалине. Полученные образцы сканировали для определения площади ИМ и ЗР на сохраненных изображениях. Срезы взвешивали для определения массы ЛЖ. В каждой группе рассчитывали отношение «зона риска/вес левого желудочка» (ЗР/ЛЖ) и «инфаркт миокарда/зона риска» (ИМ/ЗР), выраженное в процентах [8].

Оценка повреждения клеточных мембран. Повреждение мембран кардиомиоцитов оценивали по увеличению активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и креатинкиназы-МВ (КК-МВ) в плазме крови. Около 0,5 мл крови собирали в гепаринизированные пробирки из венозного катетера крысы в исходном состоянии (перед окклюзией ПНА) и после часа реперфузии. Активность ферментов в плазме определяли на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Япония) при $\lambda = 340$ нм с использованием наборов «BioSystems SA» (Испания).

Определение активности антиоксидантных ферментов и содержания продуктов свободнорадикального окисления липидов в **3Р.** Ткань зоны риска сердца крысы, замороженную в жидком азоте, гомогенизировали в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,4; вес/объем 1 : 10) при помощи гомогенизатора Ultra-Turrax T18 («IKA Werke», Германия) и центрифугировали на Sigma 3-16KL (Германия) при 1000 g и 4 °С в течение 10 мин. В супернатанте определяли содержание вторичных продуктов ПОЛ (реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой – TBARS) и активность антиоксидантных ферментов (Cu,Zn-SOD, GSH-Рх и САТ). Активность Cu,Zn-SOD определяли по ингибированию восстановления *п*-нитротетразолия синего супероксидным радикалом, генерируемым в системе ксантин-ксантиноксидаза. Кинетику образования формазана регистрировали на спектрофотометре UV-2600 («Shimadzu», Япония) при 560 нм. За единицу активности Cu,Zn-SOD принимали количество фермента, необходимое для 50%-ного подавления восстановления *п*-нитротетразолия синего; результаты выражали в ед. акт./мг белка [9]. Активность САТ определяли по скорости расходования H₂O₂ при 20 °С в течение 1 мин. Измерения проводили при 240 нм на спектрофотометре UV-2600. При расчете активности использовали коэффициент молярной экстинкции пероксида водорода $\varepsilon = 43,6$ М⁻¹·см⁻¹. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для утилизации 1 мкмоль H₂O₂ в минуту; результаты также выражали в ед. акт./мг белка [10]. Активность GSH-Рх определяли в сопряженной системе глутатион-глутатионредуктаза по окислению NADPH, используя гидропероксид третбутила в качестве субстрата. Скорость окисления NADPH ($\lambda = 340$ нм) определяли в термостатируемой 9-канальной кювете при 30 °С на химическом анализаторе FP-900 («Labsystems

Оу», Финляндия). За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для окисления 1 мкмоль восстановленного глутатиона в условиях определения; результаты выражали в ед. акт./мг белка [11]. В супернатанте гомогената сердечной мышцы белки осаждали 10%-ной трихлоруксусной кислотой (1:1) и определяли содержание вторичных продуктов ПОЛ по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, анализируя количество образовавшегося триметинового комплекса при $\lambda = 532$ нм на спектрофотометре UV-2600 [12].

Оценка влияния пептидов на активность антиоксидантных ферментов. Коммерческие препараты Cu,Zn-SOD и GSH-Px из бычьих эритроцитов и CAT из бычьей печени («Sigma», CША) растворяли в 50 мМ фосфатном буфере pH 7,4 в концентрации 250 мкг/мл. Активность ферментов составила 145,3 \pm 3,19; 462,8 \pm 43,07; 12,73 \pm 0,45 ед./мл соответственно. Затем в раствор, содержащий ферменты, вводили растворы пептидов G1, G2 и Gal в 50 мМ фосфатном буфере pH 7,4 до конечных концентраций 0,01 и 0,1 мМ и инкубировали полученные смеси при 4 °C в течение 24 ч. После окончания инкубации активность Cu,Zn-SOD, CAT и GSH-Px определяли согласно описанным методикам [9–11].

Исследование влияния пептидов на свободнорадикальное окисление ЛНП человека. Для препаративного выделения липопротеидов низкой плотности (ЛНП) плазму крови доноров, содержащую 1 мг/мл ЭДТА, подвергали двукратному центрифугированию в градиенте плотности 1,019–1,063 г/см³ NaBr в течение 2 ч при скорости 42 000 об./мин в угловом роторе 50Ti при 4 °C в рефрижераторной ультрацентрифуге Optima XPN-80 («Beckman Coulter», США) согласно описанной методике [13]. Полученные ЛНП диализовали в изотоничном (0,154 M NaCl) 50 мМ К, Na-фосфатном буфере pH 7,4 при 4 °С в течение 16 ч. Короткое время центрифугирования позволяет избежать окисления нативных ЛНП в процессе выделения. При электрофорезе в образцах ЛНП, полученных описанным методом, не было выявлено существенных загрязнений другими фракциями липопротеидов или белками плазмы.

После диализа содержание белка в образцах ЛНП определяли по методу Лоури. Затем пробы белка разбавляли до 50 мкг/мл раствором, содержащим 0,154 M NaCl в 50 мМ К,Na-фосфатном буфере pH 7,4, добавляли пептиды галанина в концентрациях 0,01 и 0,1 мМ. Окисление ЛНП индуцировали при 37 °С введением 30 мкM CuSO₄*5H₂O, после чего через фиксированные интервалы времени измеряли накопление липогидропероксидов при $\lambda = 233$ нм на спектрофотометре UV-2600. Степень ингибирования свободнорадикального окисления ЛНП характеризовали продолжительностью периода индукции (лаг-фазы) окисления (τ), за который принимали время достижения оптической плотности при $\lambda = 233$ нм на кинетических кривых окисления ЛНП, равное 0,15 (Δ D233 = 0,15) [13]. В референсную пробу вносили 0,01 мМ синтетического фенольного антиоксиданта, бутилированного гидрокситолуола (ВНТ) в растворе этанола (конечное содержание этанола 0,25%). Предварительно было показано, что внесение 0,25%-ного этанола в пробу не влияет на продолжительность лаг-фазы при окислении ЛНП без других добавок.

Мониторирование продукции АФК в ЗР сердца крысы с помощью спиновой ловушки. Для регистрации уровня короткоживущих кислородных радикалов в зоне риска ЛЖ использовали метод микродиализа и спиновую ловушку 5,5диметил-1-пирролин *N*-оксид (ДМПО). Это соединение способно эффективно взаимодействовать как с супероксидными, так и с гидроксильными радикалами с образованием относительно стабильных спиновых аддуктов, регистрируемых методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [14]. В область региональной ишемии имплантировали микродиализное волокно (внешний диаметр 0,25 мм, проницаемое для веществ с молекулярной массой < 5 кДа), которое с помощью микронасоса перфузировали со скоростью 3 мкл/мин раствором Рингера (рН 7,4 при 37 °С) с содержанием 100 мМ ДМПО. Вытекающий диализат собирали последовательными фракциями по 20 мин в пластиковые пробирки, охлаждённые до 0 °C. Образцы диализатов замораживали и хранили в жидком азоте. Спектры ЭПР образцов диализата, содержащего спиновую ловушку ДМПО, регистрировали на спектрометре Х-диапазона E-109E («Varian», США) при комнатной температуре. Амплитуда высокочастотной модуляции магнитного поля составляла 0,1 мТл при частоте 100 кГц. Частота СВЧ поля спектрометра составляла 9,14 ГГц, а его мощность устанавливалась на уровне 10 мВт. Сканирование магнитного поля при записи сигналов осуществлялось с центром при g = 2,00.

Статистическая обработка данных. Для обработки полученных данных использовали пакет программ SigmaPlot 11.2 («SysStat», США). Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего значения (M \pm SEM). При сравнении нескольких групп с контролем использовали *t*-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали отличия при *p* < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние пептидов на И/Р повреждение сердца у крыс in vivo. Гистохимический анализ срезов ЛЖ после реперфузии не выявил достоверных различий в размерах ЗР между контролем, пептидами галанина и 0,2%-ным ДМСО. Для исследованных групп величина ЗР/ЛЖ в среднем составляла 40,5 ± 1,3%, что свидетельствует о единообразии моделирования И/Р повреждения у всех животных. В контроле величина ИМ, выраженная отношением ИМ/ЗР в процентах, составляла $43,0 \pm 2,0\%$ (рис. 1, *a*). Введение 0,2%-ного ДМСО не влияло на размеры ИМ – в этом случае отношение ИМ/ЗР составляло $41.6 \pm 3.1\%$. В то же время внутривенное введение каждой из исследованных доз пептидов приводило к уменьшению размеров ИМ. Оптимальная доза для Gal составила 0,5 мг/кг, для G1 и G2 – 1,0 мг/кг. Использование этих доз Gal и G2 снижало размеры ИМ в среднем на 40%, G1 – на 27% по сравнению с контролем (p < 0,001). Развитие ИМ в контроле к концу реперфузии сопровождалось значительным увеличением активности КК-МВ и ЛДГ в плазме по сравнению с исходным состоянием (рис. 1, б, в). Введение 0,2%-ного ДМСО не влияло на активность обоих ферментов по сравнению с контролем. Введение оптимальных доз пептидов Gal, G1 и G2 уменьшало активность ЛДГ и КК-МВ к окончанию реперфузии в среднем на 30% по сравнению с контролем (p < 0,01). Эти данные отражают снижение уровня некроза кардиомиоцитов в ЗР под действием галанина и его *N*-концевых фрагментов. В дальнейшем на этой модели были использованы указанные выше оптимальные концентрации пептидов.

Влияние пептидов на продукцию АФК в ЗР сердца крысы. Регистрируемые спектры ЭПР образцов диализата состояли из четырёх узких эквидистантных линий, соотношение амплитуд которых составило 1:2:2:1, характерных для парамагнитного аддукта ДМПО-ОН, образующегося в результате взаимодействия ДМПО и гидроксида [14]. На рисунке 2 представлены изменения в содержании аддукта ДМПО-ОН в образцах диализата в ходе эксперимента. Видно, что в контроле после 40-минутной окклюзии коронарной артерии содержание ДМПО-ОН в диализате увеличивалось, отражая увеличение уровня АФК в интерстиции ЗР. Это может быть связано с существенным возрастанием скорости генерации АФК в дыхательной цепи митохондрий при восстановлении кровотока в ЗР. Введение пептидов G1, G2 или Gal перед реперфузией достоверно снижало содержание ДМПО-ОН по сравнению с контролем (p < 0,01). Эти дан-



Рис. 1. Влияние внутривенного введения пептидов галанина на показатели И/Р повреждения сердца у крыс *in vivo.* a - Дозозависимое действие пептидов Gal, G1 и G2 на размеры инфаркта миокарда (ИМ/ЗР, %): К – контроль,ИМ – инфаркт миокарда, ЗР – зона риска. Влияние оптимальных доз пептидов на активность КК-МВ (б) и ЛДГ (в)в плазме крови крыс в конце реперфузии: ИС – исходноесостояние, К – контроль (введение физиологическогораствора), Р – растворитель 0,2% ДМСО, пептиды G1(1 мг/кг), G2 (1 мг/кг), Gal (0,5 мг/кг). Данные представлены как М ± SEM для каждой группы из 8 животных.* – Достоверное отличие от К и Р (<math>p < 0,01)

ные указывают на снижение продукции АФК в реперфузированной области сердца под действием пептидов галанина.

Влияние пептидов на активность антиоксидантных ферментов и содержание продуктов ПОЛ в ЗР сердца крысы. В контроле (после региональной ишемии и реперфузии сердца без введения пептидов) активности Cu,Zn-SOD, CAT и GSH-Рх в ЗР не отличались от значений в исходном состоянии (табл. 2). Активность Cu,Zn-SOD под действием G2 и Gal в 3Р к окончанию реперфузии не изменялась, введение G1 приводило к ее снижению. Активность САТ достоверно не изменялась под действием пептидов галанина. Активность GSH-Px в 3Р по сравнению с контролем достоверно увеличивалась при введении пептидов G2 и Gal, тогда как введение G1 воздействия не оказывало. Под влиянием региональной ишемии и реперфузии сердца в контроле содержание TBARS в 3Р возрастало вдвое по сравнению с исходным значением. Введение G2 и Gal заметно снижало накопление TBARS в 3Р к концу реперфузии, G1 не оказывал влияния на этот показатель. Таким образом, под действием пептидов G2 и Gal происходило снижение образования продуктов ПОЛ в реперфузированном миокарде, несмотря на отсутствие влияния на активность Cu,Zn-SOD и CAT, и незначительное увеличение активности GSH-Px. Почти двукратное снижение активности Cu,Zn-SOD, вызванное введением G1, не влияло на интенсивность ПОЛ в ЗР по сравнению с контролем. Эти данные показывают, что наблюдаемые изменения ПОЛ в реперфузированной области сердца под действием пептидов не связаны непосредственно с активностью ключевых антиоксидантных ферментов.

Влияние пептидов галанина на активность Cu,Zn-SOD, GSH-Px и CAT *in vitro*. Реперфузионное повреждение миокарда, сопровождающееся нарушениями структуры мембран кардио-



Рис. 2. Влияние пептидов галанина на концентрацию аддукта ДМПО-ОН в интерстиции ЗР сердца крысы: К контроль (введение физиологического раствора), пептиды G1 (1 мг/кг), G2 (1 мг/кг), Gal (0,5 мг/кг). Данные представлены как М \pm SEM для каждой группы из 5 животных. * – Достоверное отличие от G1, G2 и Gal (p < 0,01); стрелкой указан момент введения пептидов

миоцитов [15], может способствовать переносу экзогенных пептидов галанина из кровотока во внутриклеточное пространство. Это не исключает непосредственного взаимодействия пептидов с антиоксидантными ферментами миокарда. Такая ситуация была смоделирована нами инкубацией пептидов G1, G2 и Gal с коммерческими ферментами Cu,Zn-SOD, GSH-Px и САТ в модельных системах *in vitro*. При выборе концентраций пептидов в инкубационной среде мы руководствовались следующими соображениями. Оптимальная доза G1 и G2 для внутривенного введения крысе составляет 1 мг/кг, Gal – 0,5 мг/кг. Учитывая молекулярный вес пептидов (табл. 1) и объем циркулирующей крови (20 мл) в крысе средней массы (350 г), получаем, что концентрация пептидов в кровотоке должна составить 0,012 мМ для G1 и G2 и 0,003 мМ для Gal. В соответствии с этим для

Таблица 2. Активность антиоксидантных ферментов и содержание TBARS (продуктов ПОЛ) в сердце крысы

Состояние	Cu,Zn-SOD, ед./мг белка	САТ, ед./мг белка	GSH-Рх, ед./мг белка	TBARS, нмоль/мг белка
Исходное состояние	$105,\!48\pm 6,\!85$	$27,26 \pm 3,22$	$0,37\pm0,03$	$0,19\pm0,06$
Контроль	$123,99 \pm 6,25$	$33,66 \pm 1,00$	$0,27\pm0,02$	$0,40 \pm 0,03^{*}$
G1	$67,00 \pm 2,86^{*\#}$	$35,10 \pm 2,39$	$0,30\pm0,02$	$0,36 \pm 0,04*$
G2	$131,70 \pm 14,40$	$32,11 \pm 2,85$	$0,36 \pm 0,01^{\#}$	$0,13 \pm 0,01^{\#}$
Gal	$123,84 \pm 5,76$	$27,80 \pm 2,65$	$0,36\pm0,02^{\#}$	$0,12 \pm 0,03^{\#}$

[#] Примечание. Приведены данные для серий из 8 экспериментов. * — Достоверное отличие от исходного состояния; [#] — достоверное отличие от контроля; (p < 0.05).

590

Условия	Cu,Zn-SOD, ед./мл	GSH Px, ед./мл	САТ, ед./мл	
Контроль	145,30 ± 3,19	$12,73\pm0,45$	$462,84 \pm 3,07$	
G1, 0,01 мМ G1, 0,1 мМ	$\begin{array}{c} 135,09 \pm 3,41 \\ 148,88 \pm 2,83 \end{array}$	$\begin{array}{c} 13,\!08\pm0,\!36\\ 13,\!29\pm0,\!52 \end{array}$	$\begin{array}{c} 463,12 \pm 1,73 \\ 454,33 \pm 3,44 \end{array}$	
G2, 0,01 мМ G2, 0,1 мМ	$193,73 \pm 3,72^{*} \\ 180,23 \pm 3,36^{*}$	$\begin{array}{c} 13,82\pm 0,34\\ 13,12\pm 0,10\end{array}$	$\begin{array}{c} 443,12\pm1,77*\\ 438,36\pm2,68* \end{array}$	
Gal, 0,01 мМ Gal, 0,1 мМ	$\begin{array}{c} 136,73 \pm 1,39 \\ 140,04 \pm 3,15 \end{array}$	$\begin{array}{c} 13,58 \pm 0,34 \\ 13,17 \pm 0,22 \end{array}$	$470,44 \pm 4,90 \\ 465,03 \pm 2,85$	

Таблица 3. Влияние пептидов галанина на активность антиоксидантных ферментов *in vitro*

Примечание. Приведены данные для серий из 3 экспериментов. * - Достоверное отличие от контроля (p < 0.05).

оценки влияния пептидов на активность антиоксидантных ферментов в инкубационной среде мы использовали две концентрации пептидов: близкую к физиологической (0.01 мМ) и на порядок более высокую (0,1 мМ) (табл. 3). Из таблицы 3 видно, что пептиды G1 и Gal не оказывали влияния на активность антиоксидантных ферментов при длительной инкубации (различия между опытными и контрольной группами были статистически не достоверны). В то же время действие G2 в указанных выше концентвызывало заметную активацию рациях Cu,Zn-SOD (на 24 и 34% соответственно), незначительно снижало активность САТ (в среднем на 4,5% независимо от концентрации) и не влияло на активность GSH-Px. Однако с учетом того, что использованные в этих модельных опытах концентрации пептидов и длительность их взаимодействия с ферментами маловероятны в условиях *in vivo*, из приведенных результатов следует, что G1, G2 и Gal практически не влияют на активность антиоксидантных ферментов.

Влияние пептидов на свободнорадикальное окисление ЛНП плазмы крови человека. Для изучения влияния G1, G2 и Gal на параметры свободнорадикального окисления липидов был использован разработанный нами ранее кинетический метод исследования ингибиторной активности соединений на модели Cu²⁺-инициированного окисления природных изолированных ЛНП плазмы крови здоровых доноров [13]. Известно, что продолжительность периода индукции τ (лаг-фаза окисления) определяется следующим уравнением: $\tau = [InH]/w$, где [InH] – концентрация ингибиторов свободнорадикальных процессов в системе, *w* – скорость инициирования окисления [16, 17]. Мы проводили эксперименты с использованием одних и тех же образцов свежевыделенных ЛНП в стандартных условиях. Очевидно, что концентрация природных эндогенных ингибиторов свободнорадикальных процессов [InH] в исходных образцах ЛНП была идентичной. Стандартной должна быть и скорость инициирования окисления изолированных из плазмы крови ЛНП (w), поскольку она зависит от содержания образованных *in vivo* липогидропероксидов [LOOH]. В присутствии ионов меди липогидропероксиды подвергаются деструкции с образованием активных липидных радикалов, инициирующих дальнейшее окисление ненасыщенного субстрата – полиеновых липидов [18, 19]:

 $LOOH + Cu^{2+} \rightarrow LO_{2}^{\bullet} + H^{+} + Cu^{+}$ $LOOH + Cu^{+} \rightarrow LO^{\bullet} + OH^{-} + Cu^{2+}$



Рис 3. Характерные кинетические кривые Cu²⁺-инициированного свободнорадикального окисления ЛНП в присутствии синтетического фенольного антиоксиданта ВНТ и пептидов G1, G2 и Gal. a – Влияние ВНТ: кривая 1 – контроль (без добавок); 2 – в присутствии 0,01 мМ ВНТ. Влияние пептидов: δ – в присутствии G1 (кривая 1), G2 (2) и Gal (3) в концентрации 0,01 мМ; β – в присутствии G1(1), G2 (2) и Gal (3) в концентрации 0,1 мМ

Таким образом, продолжительность периода индукции окисления ЛНП в наших опытах (τ) зависела исключительно от антиоксидантной способности внесённых в среду окисления экзогенных пептидов. Результаты проведённых кинетических экспериментов представлены на рисунке 3. Они демонстрируют выраженное ингибирующее действие синтетического фенольного антиоксиданта, бутилированного гидрокситолуола (ВНТ) в концентрации 0,01 мМ (рис. 3, *a*). Пептиды G1, G2 и Gal в концентрациях 0,01 мМ и 0,1 мМ также подавляли свободнорадикальное окисление ЛНП (рис. 3, *б* и *в*).

Вычисленные при анализе кинетических кривых окисления значения периодов индукции (τ) представлены в таблице 4. Из приведенных значений τ следует, что все исследованные пептиды галанина обладают ингибирующей активностью по отношению к свободнорадикальному окислению липидов. При концентрации 0,01 мМ продолжительность периодов индукции окисления для G1, G2 и Gal была достоверно выше контроля на 45, 15 и 75% соответственно. Увеличение концентрации пептидов в среде инкубации до 0,1 мМ приводило к возрастанию антиоксидантной активности G1 в 2,75, а G2 и Gal в 1,5 раза по сравнению с контролем, а также снижению периода индукции для Gal на 25% по сравнению с этим показателем при концентрации 0,01 мМ. Результаты экспериментов с использованием различных концентраций пептидов показывают, что способность ингибировать свободнорадикальное окисление липидов у этих соединений снижалась в ряду G1 > Gal > G2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе антиоксидантная активность полноразмерного галанина Gal и его природного и химически модифицированного *N*-концевого фрагмента (G1 и G2 соответственно) продемонстрирована на двух моделях окислительного стресса – ишемическом/реперфузионном повреждении сердца крысы *in vivo* и свободнорадикальном окислении ЛНП плазмы крови человека in vitro. Внутривенное введение пептидов галанина крысам после региональной ишемии уменьшало необратимые повреждения зоны риска. Это проявлялось в ограничении размера инфаркта миокарда и защите мембран кардиомиоцитов – уменьшении активности КК-МВ и ЛДГ в плазме крови к концу реперфузии. Пептиды G1, G2 и Gal снижали образование спинового аддукта гидроксильных радикалов ДМПО-ОН в интерстиции ЗР при реперфузии, при этом G2 и Gal также снижали образо-

Таблица 4. Продолжительность периодов индукции свободнорадикального окисления ЛНП (т, мин)

Группы	Концентрация исследуемых веществ				
	0,01 мМ	0,1 мМ			
Контроль	$20 \pm 0,2$	$20 \pm 0,2$			
G1	$29 \pm 0,4*$	$55 \pm 0,3^{*^{\#}}$			
G2	$23 \pm 0,2*$	$30 \pm 0,05^{*\#}$			
Gal	$35 \pm 0,1*$	$30\pm0,1^{*^{\#}}$			
BHT	$140 \pm 0,1^{*}$				

Примечание. *, p < 0.05 по сравнению с контролем; *, p < 0.05 по сравнению с пептидом в концентрации 0.01 мM; n = 3.

вание вторичных продуктов ПОЛ в реперфузированном миокарде. Кроме того, все пептиды галанина ингибировали Cu²⁺-индуцированное свободнорадикальное окисление ЛНП человека *in vitro*.

Как было отмечено выше, введение пептидов G1, G2 и Gal крысам после периода региональной ишемии миокарда существенно снижало образование ДМПО-ОН в интерстиции ЗР ЛЖ при возобновлении кровотока. Образование этого спинового аддукта в диализном волокне, вероятно, являлось следствием проникновения в него гидроксильных радикалов, образующихся при реакции Фентона. Возможно также, что образование ДМПО-ОН проходило вне диализного волокна: в этом случае молекулы ДМПО могли проникать в ткань миокарда по градиенту концентрации через поры в диализаторе, и после взаимодействия с АФК в ткани сердечной мышцы образовавшийся спиновый аддукт мог возвращаться обратно в диализатор. Нельзя также исключать факт взаимодействия молекул ловушки ДМПО с супероксидными анион-радикалами с образованием аддукта ДМПО-ООН с последующим его спонтанным переходом в аддукт гидроксида ДМПО-ОН [20]. Тем не менее полученные методом микродиализа результаты свидетельствуют об уменьшении генерации АФК в ткани реперфузированного миокарда под действием пептидов. Они согласуются со способностью пептида G1 снижать продукцию супероксид-аниона и пероксида водорода в митохондриях изолированных кардиомиоцитов при их инкубации в условиях реоксигенации после периода гипоксии [3]. Как известно, гиперпродукция АФК является одним из основных механизмов повреждения миокарда во время реперфузии, вызывающим нарушение проницаемости мембран кардиомиоцитов, изменение ионного гомеостаза и гибель клеток путем некроза и апоптоза [21]. В соответствии с этим снижение образования ДМПО-ОН в экспериментальных группах с введением пептидов G1, G2 и Gal сопровождалось заметным уменьшением размеров инфаркта миокарда и снижением активности маркеров некроза в плазме крови в конце реперфузии (рис. 1). Дополнительно в ЗР ЛЖ животных, защищенных введением G2 или Gal, обнаружено снижение содержания продуктов ПОЛ до предишемических значений (табл. 2). Эти данные однозначно указывают на способность пептидов галанина снижать окислительный стресс при реперфузии.

Ранее мы показали, что у крыс с кардиомиопатией, вызванной доксорубицином, подкожное введение пептида G2 в течение 8 недель снижало ПОЛ и увеличивало активность Cu,Zn-SOD и GSH-Рх в поврежденном сердце [6]. В настоящей работе существенного влияния пептидов G1, G2 и Gal на активность ключевых ферментов антиоксидантной защиты Cu,Zn-SOD, CAT и GSH-Рх в зоне риска ЛЖ миокарда крыс выявлено не было. В данной работе отмечено лишь незначительное увеличение активности GSH-Px под действием G2 и Gal и снижение активности Cu,Zn-SOD под действием G1 (табл. 2). Вполне вероятно, что короткого времени реперфузии (1 ч) недостаточно для экспрессии генов этих ферментов в миокарде. В пользу этого предположения свидетельствуют не только результаты нашей работы [6], но и исследование Timotin et al. [22], в котором показано, что снижение размеров инфаркта миокарда у мышей в результате длительного введения Gal сопровождается ростом количества мРНК Cu,Zn-SOD в кардиомиоцитах. Для понимания причин изменения активности Cu,Zn-SOD и GSH-Px в зоне риска сердца крыс под действием пептидов при реперфузии мы оценили влияние G1, G2 и Gal на активность коммерческих антиоксидантных ферментов *in vitro*. Несмотря на длительную инкубацию (24 ч) и использование высоких концентраций пептидов (0,1 мМ), заметное влияние было отмечено только при действии G2, проявлявшееся в активации Cu,Zn-SOD и ингибировании САТ (табл. 3). Различное влияние пептидов галанина на активность Cu,Zn-SOD, CAT и GSH-Px в экспериментах in vitro и in vivo свидетельствует в пользу того, что их способность к снижению генерации АФК и продуктов ПОЛ в сердце крыс при реперфузии не связана с воздействием на ферментативную систему антиоксилантной зашиты.

Известно, что многие пептиды обладают способностью перехватывать АФК и ингибировать перекисное окисление липидов [23, 24].

Однако, насколько нам известно, данные о прямом антиоксидантном действии галанина или его биоактивных *N*-концевых фрагментах в литературе отсутствуют. Поэтому изучение механизмов снижения окислительного стресса в сердце с помощью пептидов галанина представляется важной задачей будущих исследований. В этой связи интерес представляют результаты, полученные при изучении влияния G1, G2 и Gal на Cu²⁺-индуцированное свободнорадикальное окисление ЛНП плазмы крови человека *in vitro*. Полученные нами данные продемонстрировали ингибирующий эффект этих соединений, вызванный уменьшением образования липидных радикалов, хотя и более слабый, чем у синтетического антиоксиданта ВНТ (табл. 4, рис. 3). Тем не менее нельзя исключить, что при использовании указанной модели подавление свободнорадикального окисления липидов могло быть вызвано хелатированием ионов меди изучаемыми пептилами.

Помимо регуляции свободнорадикальных процессов, активация пептидами галанина различных путей трансдукции при связывании с рецепторами GalR1-3 также может способствовать уменьшению повреждения клеток. Все три подтипа рецепторов галанина через белки Gi/Go ингибируют активность аденилатциклазы, что приводит к ингибированию транскрипционного фактора CREB – белка, связывающего цикло-АМР-зависимый элемент. Это повышает экспрессию транспортера глюкозы GLUT4 и способствует его перемещению в сарколемму, стимулируя захват и окисление глюкозы кардиомиоцитами. Запуск этого механизма имеет решающее значение в условиях снижения продукции АТР [25]. Сопряжение рецептора GalR2 с белком Gq/11 активирует фосфолипазу С и через гидролиз фосфатидилинозитол дифосфата регулирует гомеостаз кальция, что улучшает инотропные свойства сердца. Нижние звенья этого сигнального пути вызывают фосфорилирование протеинкиназы В (Akt), ингибирование проапоптозных белков BAD/BAX, каспазы-3 и каспазы-9 [1, 26]. Как правило, на моделях in vivo снижение апоптоза кардиомиоцитов сопровождается ограничением области инфаркта миокарда и улучшением сократительной функции сердца [27]. Активация GalR1 и GalR2 стимулирует сигнальные пути, инициируемые митоген-активируемыми протеинкиназами (MEK1/2 и ERK1/2), приводящие к ингибированию открытия митохондриальной поры временной проницаемости (mPTP) и, таким образом, способствует выживанию и подвижности клеток [28]. Кроме того, активация фосфорилирования киназ ERK способствует увели-

чению экспрессии рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом (PPARs), контролирующих энергетический метаболизм, включая и экспрессию PPAR γ , стимулирующего поглощение и окисление глюкозы кардиомиоцитами [29]. Из этого следует, что пептидные агонисты рецепторов галанина способны усиливать адаптационные механизмы метаболической защиты при повреждении сердца.

Одним из важных аспектов реализации эффектов биоактивных пептидов является их влияние на интенсивность свободнорадикального окисления в органах и тканях, которое сопровождается коррекцией нарушений, вызванных различными патологическими факторами. В связи с этим природные и синтетические пептидные биорегуляторы можно рассматривать как перспективные фармакологические средства, способствующие уменьшению стресс-индуцированных изменений в организме. Полученные результаты свидетельствуют об участии галанинергической системы в адаптации сердца к ише-

 Branchek, T. A., Smith, K. E., Gerald, C., and Walker, M. W. (2000) Galanin receptor subtypes, *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 109-117, doi: 10.1016/S0165-6147(00)01446-2.

- Timotin, A., Pisarenko, O., Sidorova, M., Studneva, I., Shulzhenko, V., et al. (2017) Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by exogenous galanin fragment, *Oncotarget*, 8, 21241-21252, doi: 10.18632/oncotarget. 15071.
- Pisarenko, O., Timotin, A., Sidorova, M., Studneva, I., Shulzhenko, V., et al. (2017) Cardioprotective properties of *N*-terminal galanin fragment (2-15) in experimental ischemia/reperfusion injury, *Oncotarget*, **8**, 60, 101659-101671, doi: 10.18632/oncotarget.21503.
- Азьмуко А. А., Веселова О. М., Молокоедов А. С., Овчинников М. В., Палькеева М. Е., Писаренко О. И., Серебрякова Л. И., Сидорова М. В., Студнева И. М. (2018) Тетрадекапептиды, улучшающие восстановительную функцию сердечно-сосудистой системы при ишемии. Патент № 2648846. РФ. А61К 38/10 (2006.01).
- Palkeeva, M., Studneva, I., Molokoedov, A., Serebryakova, L., Veselova, O., et al. (2019) Galanin/GalR1-3 system: a promising therapeutic target for myocardial ischemia/reperfusion injury, *Biomed. Pharmacother.*, **109**, 1556-1562, doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.182.
- Студнева И. М., Веселова О. М., Бахтин А. А., Коновалова Г. Г., Ланкин В. З., Писаренко О. И. (2020) Механизмы защиты сердца синтетическим агонистом рецепторов галанина при повреждении хроническим введением доксорубицина, *Acta Naturae*, **12**, 28-37, doi: 10.32607/actanaturae.10945.
- Sidorova, M. V., Palkeeva, M. E., Avdeev, D. V., Molokoedov, A. S., Ovchinnikov, M. V., et al. (2020) Convergent synthesis of the rat galanin and study of its biological activity, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 46, 32-42, doi: 10.1134/S1068162020010100.

мическому/реперфузионному повреждению и окислительному стрессу. Эти данные указывают на перспективность молекулярного конструирования фармакологических агонистов рецептора галанина GalR2 с улучшенными физико-химическими характеристиками (растворимость, протеолитическая стабильность) и детального изучения механизмов их действия. Подобные соединения могут служить основой для разработки нового класса кардиопротекторов для терапии различных сердечно-сосудистых заболеваний.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 18-015-0008-а и 18-015-0009-а).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода за лабораторными животными и их использования в экспериментах были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kitakaze, M., Takashima, S., Funaya, H., Minamino, T., Node, K., et al. (1997) Temporary acidosis during reperfusion limits myocardial infarct size in dogs, *Am. J. Physiol.*, 272, H2071-H2078, doi: 10.1152/ajpheart.1997.272.5. H2071.
- Beauchamp, C., and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels, *Anal. Biochem.*, 44, 276-287, doi: 10.1016/0003-2697(71)90370-8.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro, Methods Enzymol., 105, 121-126, doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
- Ланкин В. З., Гуревич С. М. (1976) Ингибирование переокисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза) при экпериментальном злокачественном росте, ДАН СССР, 226, 705-708.
- Draper, H. H., and Hadley, M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, *Methods Enzymol.*, 186, 421-431, doi: 10.1016/0076-6879(90)86135-i.
- Ланкин В. З., Кандалинцева Н. В., Коновалова Г. Г., Тихазе А. К., Хольшин С. В., Ягунов С. Е., Одинокова О. А. (2017) Способ экспресс-скрининга потенциальных антиоксидантов с использованием кинетической модели медь-инициированного свободнорадикального окисления липопротеидов низкой плотности плазмы крови человека. Патент на изобретение RU 2629398.
- Britigan, B. E., Cohen, M. S., and Rosen, G. M. (1987) Detection of the production of oxygen-centered free radicals by human neutrophils using spin trapping techniques: a critical perspective, *J. Leukoc. Biol.*, **41**, 349-362, doi: 10.1002/jlb.41.4.349.
- Vanden Hoek, T. L., Shao, Z., Li, C., Zak, R., Schumacker, P. T., and Becker, L. B. (1996) Reperfusion injury on cardiac myocytes after simulated ischemia, *Am. J. Physiol.*, **270**, H1334-H1341, doi: 10.1152/ajpheart. 1996.270.4.H1334.

- Эмануэль Н. М., Лясковская Ю. Н. (1961) Торможение процессов окисления жиров, *Пищепромиздат*, Москва, стр. 10-19.
- Lankin, V., Konovalova, G., Tikhaze, A., Shumaev, K., Kumskova, E., and Viigimaa, M. (2014) The initiation of free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injure in atherosclerosis and diabetes, *Mol. Cell. Biochem.*, **395**, 241-252, doi: 10.1007/s11010-014-2131-2.
- Lankin V. Z. (2003) The enzymatic systems in the regulation of free radical lipid peroxidation, in *Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects,* NATO Science Series (Tomasi, A., et al., eds) vol. 344, IOS Press, Amsterdam, pp. 8-23.
- Lankin, V. Z., Antonovsky, V. L., and Tikhaze, A. K. (2004) Regulation of Free radical lipoperoxidation and organic peroxides metabolism during normal station and pathologies, in *Peroxides at the Beginning of the Third Millennium* (Antonovsky, V.L., et al., eds) Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 85-111.
- Тимошин А. А., Дроботова Д. Ю., Цкитишвили О. В., Серебрякова Л. И., Писаренко О. И., Рууге Э. К., Ванин А. Ф. (2010) Защитное действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом в условиях региональной ишемии миокарда крыс: исследование методом микродиализа, Доклады Академии Наук (Раздел «Биофизика»), 432, 416-419.
- Murphy, E., and Steenbergen, C. (2008) Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury, *Physiol. Rev.*, 88, 581-609, doi: 10.1152/ physrev.00024.2007.

- 22. Timotin, A., Cinato, M., Kramar, S., Loy, H., Merabishvili, G., and (2019) Galanin is a checkpoint regulator of mitochondrial biogenesis coordinating a pro-survival phenotype in post-infarct myocardial remodeling, *Lancet*, preprint, doi: 10.2139/ssrn.3424189.
- 23. Power, O., Jakeman, P., and FitzGerald, R. J. (2013) Antioxidative peptides: enzymatic production, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides, *Amino Acids*, **44**, 797-820, doi: 10.1007/s00726-012-1393-9.
- 24. Jakubczyk, A., Karas, M., Rybczynska-Tkaczyk, K., Zielinska, E., and Zielinski, D. (2020) Current trends of bioactive peptides – new sources and therapeutic effect, *Foods*, **9**, 846, doi: 10.3390/foods9070846.
- Tian, R., and Abel, E. D. (2001) Responses of GLUT4deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis, *Circulation*, **103**, 2961-2966, doi: 10.1161/01.CIR.103.24.2961.
- Lang, R., Gundlach, A. L., Holmes, F. E., Hobson, S. A., Wynick, D., et al. (2015) Physiology, signaling, and pharmacology of galanin peptides and receptors: three decades of emerging diversity, *Pharmacol. Rev.*, 67, 118-175.
- Krijnen, P. A., Nijmeijer, R., Meijer, C. J., Visser, C. A., Hack, C. E., and Niessen, H. W. (2002) Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction, *J. Clin. Pathol.*, 55, 801-811, doi: 10.1136/jcp.55.11.801.
- Hausenloy, D. J., and Yellon, D. M. (2013) Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target, *J. Clin Invest.*, **123**, 92-100, doi: 10.1172/JCI62874.
- Jay, M. A., and Ren, J. (2007) Peroxisome proliferatoractivated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus, *Curr. Diab. Rev.*, 3, 33-39, doi: 10.2174/157339907779802067.

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF GALANIN AND ITS *N*-TERMINAL FRAGMENTS IN MODELING OXIDATIVE STRESS *in vitro* AND *in vivo**

O. I. Pisarenko^{**}, I. M. Studneva, L. I. Serebryakova, A. A. Timoshin, G. G. Konovalova, V. Z. Lankin, A. K. Tihaze, O. M. Veselova, I. V. Dobrokhotov, R. O. Lyubimov, M. V. Sidorova, M. E. Palkeeva, and A. S. Molokoedov

National Medical Research Center for Cardiology, 121552 Moscow, Russia; E-mail: olpi@live.ru

Antioxidant properties of rat galanin GWTLNSAGYLLGPHAIDNHRSFSDKHGLT-NH2 (Gal), N-terminal fragment of galanin (2-15 aa) WTLNSAGYLLGPHA (G1), and its modified analogue WTLNSAGYLLGPBAH (G2) were studied in vivo in the rat model of regional myocardial ischemia and reperfusion and in vitro in the process of Cu²⁺-induced free radical oxidation of human blood plasma low-density lipoproteins. Intravenous administration of G1, G2, and Gal to rats after ischemia induction reduced the infarction size and activities of the necrosis markers, creatine kinase-MB and lactate dehydrogenase, in blood plasma at the end of reperfusion. G1, G2, and Gal reduced formation of the spin adducts of hydroxyl radicals in the interstitium of the area at risk during reperfusion, moreover, G2 and Gal also reduced formation of the secondary products of lipid peroxidation in the reperfused myocardium. It was shown in the in vivo experiments and in the in vitro model system that the ability of galanin peptides to reduce formation of ROS and attenuate lipid peroxidation during myocardial reperfusion injury was not associated directly with their effects on activities of the antioxidant enzymes of the heart: Cu,Zn-superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase. The peptides G1, G2, and Gal at concentrations of 0.01 and 0.1 mM inhibited Cu2+-induced free radical oxidation of human low-density lipoproteins in vitro. The results of oxidative stress modeling demonstrated that the natural and synthetic agonists of galanin receptors reduced formation of the short-lived ROS in the reperfused myocardium, as well as of lipid radicals in blood plasma. Thus, galanin receptors could be a promising therapeutic target for cardiovascular diseases.

Keywords: galanin, heart, ischemia and reperfusion, necrosis, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, cardiomyocyte membrane damage

УДК 577.124

D-РАМНАН И ПИРУВАТСОДЕРЖАЩАЯ ТЕЙХУРОНОВАЯ КИСЛОТА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *Rathayibacter* sp. BKM Ac-2759

© 2021 А.С. Шашков¹, Е.М. Тульская²*, Н.В. Потехина², А.С. Дмитренок¹, С.Н. Сенченкова¹, В.А. Зайчиков², Л.В. Дорофеева³, Л.И. Евтушенко³

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

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

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

> Поступила в редакцию 18.01.2021 После доработки 16.02.2021

Принята к публикации 16.02.2021

Rathayibacter sp. BKM Ac-2759 (семейство Microbacteriaceae, класс Actinobacteria) содержит в клеточной стенке два гликополимера. Основная цепь рамнана, *гликополимера 1*, построена из повторяющихся тетрасахаридных звеньев, несущих на нередуцирующем конце терминальные остатки арабинофуранозы: \rightarrow 3)- α -[α -D-Araf-(1 \rightarrow 2)]-D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow). Подобно другим изученным видам рода *Rathayibacter*, в нейтральном гликополимере штамма BKM Ac-2759 рамноза присутствует в D-конфигурации. Ацеталированная пировиноградной кислотой тейхуроновая кислота, *гликополимер 2*, состоит из линейных тетрасахаридных звеньев: \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -[4,6-*S*-Pyr]-D-Manp-(1 \rightarrow . Структуры гликополимеров установлены химическими и ЯМР-спектроскопическими методами и описаны впервые для прокариотных микроорганизмов. Полученные данные могут быть востребованы в таксономических исследованиях и работах по выяснению механизмов колонизации и инфекции растений бактериями рода *Rathayibacter*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Rathayibacter*, клеточная стенка, гликополимеры, D-рамнан, тейхуроновая кислота, пируват.

DOI: 10.31857/S0320972521040114

введение

Род *Rathayibacter* (семейство Microbacteriaсеае, класс Actinobacteria) [1] включает 8 валидно описанных видов (LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: https://lpsn. dsmz.de/genus/rathayibacter), более половины из которых известны как фитопатогены [2–4]. Виды *Rathayibacter* имеют высокий уровень сходства между собой по генам 16S рРНК (до 99,52%) и традиционным фенотипическим характеристикам [2–5]. При изучении химического состава клеточных стенок у представителей пяти видов рода (*Rathayibacter tritici*, *Rathayibacter iranicus*, *Rathayibacter toxicus*, *Rathayibacter caricis* и «*Rathayibacter tanaceti*») были обнаружены бесфосфатные полимеры различных типов и структур — рамноманнаны, тейхуроновые кислоты, рамнан (у *R. caricis*) и рамнозосодержащий нейтральный гликополимер с остатками D-Manp, D-Glcp и L-Rhap в повторяющемся звене (у *R. toxicus*) [6–9]. Штамм каждого вида имел индивидуальный профиль полисахаридов и содержал один или два гликополимера, при этом практически каждый из них имел структуру, впервые описанную у прокариотов [8, 9].

В настоящей работе представлены результаты изучения структур гликополимеров клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759, представителя пока не описанного нового вида, выделенного из некротического участка листа пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare*), инфицированной фитопатогенной нематодой *Aphelenchoides fragariae* [10].

Принятые сокращения: НМВС – гетероядерная корреляция ¹Н,¹³С через несколько связей; НSQС – протон-детектированная НОНО-квантовая корреляция; J – константа спин-спинового взаимодействия; ROESY – двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; COSY – корелляционная спектроскопия; TOCSY – тотальная корреляционная спектроскопия; $\delta_{\rm C}$, $\delta_{\rm H}$ – значения химических сдвигов атомов ¹³С, ¹Н соответственно.

^{*} Адресат для корреспонденции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальный штамм *Rathayibacter* sp. BKM Ac-2759 был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (BKM) (www.vkm.ru).

Условия культивирования и получение биомассы для исследований, а также выделение и очистка клеточных стенок описаны ранее [11].

Выделение гликополимеров проводили методом холодной и горячей ТХУ-экстракций (10%ная ТХУ, 4 °С, 24 ч и затем – 5%-ная ТХУ, 90 °С, 20 мин), как описано ранее [7]. Выход препаратов гликополимеров составил 4,8% и 14,2% соответственно. Полученные препараты (идентичные по химическим и ЯМР-спектроскопическим данным) были объединены и обозначены как суммарный препарат.

Методы кислотного гидролиза клеточной стенки и препаратов гликополимеров (2 М HCl, 3 ч, 100 °C), нисходящей хроматографии и электрофореза, а также реактивы для проявления сахаров и фосфатсодержащих соединений и продуктов их кислотной деградации описаны в работе Potekhina et al. [11].

Гликополимеры суммарного препарата разделяли методом анионообменной хроматографии на колонке (80 × 1,5 см) с DEAE-целлюлозой («Toyopearl», Япония). Фракции гликополимеров элюировали фосфатным буфером (рН 6,3) в разных концентрациях: нейтральную (*гликополимер 1*) – 0,005 М, а кислую (*глико*полимер 2) - 0,5 М. Полученные фракции обессоливали на колонке (90 × 1,5 см) с гелем TSK HW-40S («Toyopearl»). Элюцию проводили 1%-ным раствором АсОН, используя дифференциальный рефрактометр («Knauer», Германия). Фракции гликополимеров 1 и 2 диализовали против дистиллированной воды, высушивали лиофильно и исследовали методами ЯМРспектроскопии.

Депирувилирование *еликополимера* 2 проводили следующим образом: ~30 мг образца кислой фракции обрабатывали 2%-ным раствором AcOH в течение 6 ч при 110 °C с последующей гель-хроматографией на колонке (90 × 1,5 см) с гелем TSK HW-40S в 1%-ном AcOH, осуществляя мониторинг элюции с помощью рефрактометра.

Состав моносахаридов в гликополимерах 1 и 2 исследовали модифицированным методом Leontein et al. [12] с помощью ГЖХ. Образцы гидролизовали 2 М СF₃СООН (120 °С, 2 ч), восстанавливали NaBH₄ (20 °С, 16 ч), ацетилировали уксусным ангидридом, и полученные ацетаты полиолов разделяли на хроматографе Маэстро ГХ 7820 («Интерлаб», Россия), оборудованном HP-5 колонкой (0,32 мм × 30 м) при темпе-

ратурном режиме 160-290 °C со скоростью 7 °C/мин.

Абсолютную конфигурацию нейтральных гексоз, входящих в структуры гликополимеров 1 и 2, устанавливали модифицированным методом Gerwig et al. [13]. К препарату гликополимера (0,5 мг) добавляли (+)-2-октанол и безводную трифторуксусную кислоту (15 мкл), нагревали в герметически закрытом контейнере 1 ч при 120 °С, избыток реагентов удаляли током воздуха. Полученные гликозиды ацетилировали и анализировали методом ГЖХ. Стандартные образцы готовили аналогичным способом из L- и D-моносахаридов.

Абсолютную конфигурацию арабинозы подтверждали на основании правил, опубликованных ранее [14], в соответствии с эффектами гликозилирования в спектре ЯМР ¹³С *гликополимера 1*.

Абсолютную конфигурацию остатков глюкуроновой кислоты в *гликополимере 2* определяли по эффектам гликозилирования в остатках моносахаридов в спектрах ЯМР ¹³С на основании принадлежности глюкозы к D-ряду, согласно закономерностям, изложенным в работе Shashkov et al. [14].

Спектры ЯМР снимали на приборе Bruker AV600 («Bruker», Германия) для растворов в 99,96% D₂O при температурах, обеспечивающих минимальное перекрывание остаточного сигнала дейтерированной воды с сигналами полимеров. В качестве внутреннего эталона использовали натриевую соль 3-(триметилсилил)-3,3,2,2-тетрадейтеропропионовой кислоты (TSP, $\delta_H 0,0$ м.д., $\delta_C - 1,6$ м.д.). Двумерные ЯМР-эксперименты выполняли с использованием стандартного математического обеспечения («Bruker Optik GmbH», Германия). Время спин-лока в экспериментах TOCSY составляло 100 мс. Время смешивания в эксперименте ROESY составляло 150 мс. Эксперименты НМВС были оптимизированы для констант спин-спинового взаимодействия J_{H.C} 8 Гц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кислотные гидролизаты (2 М HCl, 100 °C, 3 ч) клеточной стенки *Rathayibacter* sp. BKM Aс-2759 и выделенных из нее препаратов гликополимеров содержали набор сахаров (рамноза, глюкоза, галактоза, манноза и арабиноза) и не содержали характерных продуктов гидролиза тейхоевых кислот и гликозил-1-фосфатных полимеров (фосфорных эфиров полиолов и сахаров). Эти данные указывали на возможное присутствие в клеточной стенке исследуемого штам-

ма бесфосфатных гликополимеров, характерных для других штаммов рода *Rathayibacter* [6–9].

¹³С ЯМР-спектр суммарного препарата (рис. 1, a) в аномерной области содержал восемь сигналов в диапазоне при $\delta_{\rm C}$ 100,5-104,6 м.д. и сигнал при $\delta_{\rm C}$ 110,0 м.д. В области высокого поля наблюдались четыре сигнала 6-дезоксипиранозы при δ_C 17,8–18,3 м.д. и интенсивный сигнал при δ_C 25,9 м.д., характерный для пируватной группы с шестичленным циклом и с экваториальной ориентацией метильной группы в этом цикле. В низкопольной части спектра присутствовали сигналы при $\delta_{\rm C}$ 173,1 и 173,9 м.д. Остальные сигналы находились в области 8_с 61-85 м.д. Спектры 2D-ЯМР, необходимые для расшифровки структуры, были сняты для суммарного препарата, но их анализ оказался сложным из-за многочисленных перекрытий протонных сигналов в области δ_H 3,4–4,2 м.д. Чтобы облегчить задачу, была сделана попытка разделить препарат на кислый и нейтральный компоненты с использованием хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой (см. «Материалы и методы»).

В результате разделения были получены две фракции. Первая, нейтральная фракция, содержала преимущественно *гликополимер 1* (рис. 1, δ) и небольшую примесь кислого полисахарида (*гликополимер 2*), а вторая, кислая фракция, содержала *гликополимер 2* (рис. 1, в) с небольшой примесью *гликополимера 1*.

Нейтральная фракция (гликополимер 1). Спектр ЯМР ¹³С нейтрального гликополиме*ра 1* (рис. 1, *б*; таблица) содержал четыре интенсивных сигнала при $\delta_{\rm C}$ 101,9–103,3 м.д. и сигнал при 110,0 м.д., характерный для фуранозида с транс-ориентацией заместителей при С-1 и С-2. Никаких интенсивных сигналов не наблюдалось в слабом поле при 165–185 м.д. В области сильного поля наблюдалось четыре сигнала 6-дезоксипиранозы (δ_с 17,8-18,3 м.д.). В спектре ЯМР ¹Н (рис. 2, вверху) в аномерной области наблюдалось пять интенсивных протонных сигналов (δ_H 4,96–5,22 м.д.). Четыре дуплетных сигнала были видны в области сильного поля (δ_H 1,27–1,34 м.д.), что типично для 6-дезоксипираноз (*J*_{5,6} 6 Гц).

Анализ моносахаридного состава *гликополимера* 1 выявил присутствие рамнозы и арабинозы в соотношении 4/1 как основных компонентов полисахарида.

Сигналы в спектрах ЯМР ¹³С и ¹Н были отнесены с помощью анализа двумерных гомоядерных ¹H, ¹H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных ¹H, ¹³C HSQC, HSQC-TOCSY и HMBCэкспериментов.

Анализ спектров ¹H,¹H COSY, TOCSY и ROESY показал наличие в *гликополимере 1* четы-



Рис. 1. Спектры ЯМР ¹³С гликополимеров из клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759: суммарный препарат (*a*); нейтральная фракция (*б*); кислая фракция (*в*)



Рис. 2. Части двумерного ¹H, ¹³C HSQC-спектра *еликополимера 1* нейтральной фракции из клеточной стенки *Rathayibacter* sp. BKM Ac-2759. Соответствующие части ¹H и ¹³C ЯМР-спектров приведены вверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с таблицей

рех остатков α -рамнопиранозы (α -Rhap) и одного остатка α -арабинофуранозы (α -Araf).

Смещение в спектре ¹H,¹³C HSQC (рис. 2; таблица) сигналов атомов углерода в сравнении с таковыми родоначальных пираноз свидетельствует о замещении двух остатков α -Rhap в положение 2 (δ_{C-2} 79,5 м.д. – остаток **B** и δ_{C-2} 79,3 м.д. – остаток **D**, таблица, *гликополимер 1*), замещении остатка α -Rhap в положение 3 (δ_{C-3} 78,9 м.д. – остаток **C**) и замещении остатка α -Rhap в положения 2 и 3 (δ_{C-2} 78,1 м.д. и δ_{C-3} 78,0 м.д. – остаток **A**). Сравнение химических сдвигов остатка α -Araf (**E**) с таковыми, например, в метил- α -арабинофуранозиде, указывает на отсутствие замещения у C-2, C-3 и C-5 в остатке **E**.

Последовательность остатков в гликополимере 1 следовала из анализов спектров ¹H,¹H ROESY и ¹H,¹³C HMBC. Гомоядерный 2D-спектр ¹H,¹H ROESY (рис. 3, таблица) содержал следующие корреляционные пики между протонами: $1\mathbf{A}/2\mathbf{B}$ (5,11/4,08); $1\mathbf{B}/3\mathbf{C}$ (5,17/3,85);1C/2D(4.96/4.06); $1\mathbf{D}/3\mathbf{A}$ (5,22/3,95)И 1E/2A (5,20/4,16). Очевидно, что корреляционные пики в спектре 1 H, ROESY соответствуют следующей последовательности остатков в повторяющемся звене *гликополимера* 1:

$$\rightarrow 3\mathbf{A}1 \rightarrow 2\mathbf{B}1 \rightarrow 3\mathbf{C}1 \rightarrow 2\mathbf{D}1 \rightarrow$$
2
$$\uparrow$$
1E

Анализ спектра ¹H,¹³С HMBC (рис. 4, таблица), содержавшего корреляционные пики: H-1(**A**)/C-2(**B**) (5,11/79,5); H-1(**B**)/C-3(**C**) (5,17/78,9); H-1(**C**)/C-2(**D**) (4,96/79,3); H-1(**D**)/ C-3(**A**) (5,22/78,0) и H-1(**E**)/C-2(**A**) (5,20/78,1), подтверждал последовательность остатков, представленную выше.

Газожидкостная хроматография обработанного оптически активным октанолом гидролизата *гликополимера 1* выявила D-абсолютную конфигурацию рамнозы и арабинозы. Такая же D-абсолютная конфигурация сахаров была подтверждена на основе правил, касающихся эффектов гликозилирования в спектрах ЯМР ¹³С полисахаридов [14]. Изучение спектра

Остаток		C-1 <i>H-1</i>	C-2 <i>H-2</i>	C-3 <i>H-3</i>	C-4 <i>H-4</i>	C-5 <i>H</i> -5	C-6 <i>H-6. H-6</i> ′
	П-1 П-2 П-3 П-4 П-3 Н-0, Н-0 Гликополимер 1						
α -D-Araf-(1 \downarrow	E	110,0 <i>5,20</i>	82,6 <i>4,16</i>	78,0 <i>3,95</i>	85,0 <i>4,06</i>	62,5 <i>3,80, 3,70</i>	
\rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow	A	102,4 <i>5,11</i>	78,1 <i>4,16</i>	78,0 <i>3,95</i>	73,5 <i>3,62</i>	70,7 <i>3,76</i>	17,8 <i>1,28</i>
\rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow	В	102,1 <i>5,17</i>	79,5 <i>4,08</i>	71,3 <i>3,88</i>	72,7 <i>3,51</i>	70,6 <i>3,75</i>	18,3 <i>1,34</i>
\rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow	C	103,0 <i>4,96</i>	71,3 <i>4,14</i>	78,9 <i>3,85</i>	73,0 <i>3,58</i>	70,7 <i>3,76</i>	17,9 <i>1,27</i>
\rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow	D	101,9 <i>5,22</i>	79,3 <i>4,06</i>	71,4 <i>3,94</i>	73,7 <i>3,50</i>	70,5 <i>3,81</i>	18,1 <i>1,31</i>
	Дenu	рувилированнь	ий гликополимо	ep 2 (dePyr-гли	икополимер 2)		1
\rightarrow 4)- β -D-Glc <i>p</i> A-(1 \rightarrow	A	104,6 <i>4,73</i>	74,5 <i>3,45</i>	75,5 <i>3,69</i>	81,5 <i>3,82</i>	75,7 <i>3,96</i>	173,1
\rightarrow 4)- β -D-Gal p -(1 \rightarrow	В	104,4 <i>4,47</i>	72,7 <i>3,62</i>	74,4 <i>3,76</i>	78,4 <i>4,15</i>	76,0 <i>3,74</i>	62,2 <i>3,77, 3,7</i> 7
\rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	C	101,4 <i>4,61</i>	74,2 <i>3,41</i>	76,3 <i>3,59</i>	80,1 <i>3,67</i>	75,7 <i>3,66</i>	61,6 <i>3,96, 3,80</i>
\rightarrow 3)- β -D-Man <i>p</i> -(1 \rightarrow	D	101,3 <i>4,66</i>	69,6 <i>4,17</i>	81,5 <i>3,85</i>	66,5 <i>3,70</i>	77,6 <i>3,41</i>	62,5 <i>3,93, 3,75</i>
Гликополимер 2							
\rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow	A	104,5 <i>4,75</i>	74,2 <i>3,43</i>	75,3 <i>3,67</i>	81,1 <i>3,83</i>	74,4 <i>4,09</i>	173,1
\rightarrow 4)- β -D-Gal p -(1 \rightarrow	В	104,2 <i>4,47</i>	72,8 <i>3,62</i>	74,3 <i>3,7</i> 7	78,5 <i>4,16</i>	75,9 <i>3,75</i>	62,2 <i>3,77, 3,7</i> 7
\rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	C	100,5 <i>4,63</i>	73,8 <i>3,45</i>	76,2 <i>3,59</i>	80,0 <i>3,67</i>	75,6 <i>3,67</i>	61,6 <i>3,97, 3,81</i>
$\rightarrow 3)-\beta-D-Manp-(1\rightarrow 4) \ 6) \\ \setminus / \\ C \\ ()$	D'	101,8 <i>4,73</i>	69,5 <i>4,23</i> 101,4	77,0 <i>4,10</i>	73,7 <i>3,83</i>	67,3 <i>3,48</i>	65,8 <i>4,14, 3,7</i> 6
HOOC CH ₃		173,9		25,9 <i>1,56</i>			

Химические сдвиги в спектрах ЯМР ¹³С и ¹Н гликополимеров клеточной стенки *Rathayibacter* sp. BKM Ac-2759 (TSP $\delta_C - 1,6$ м.д. и $\delta_H 0,00$ м.д.)



Рис. 3. Часть двумерного ¹H,¹H ROESY-спектра *еликополимера 1* нейтральной фракции из клеточной стенки *Rathayibacter* sp. BKM Ac-2759. Соответствующие части ¹H ЯМР-спектра показаны вдоль осей. Арабские цифры относятся к номерам атомов протона в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с таблицей. Косая черта обозначает пики корреляции между остатками

ЯМР ¹³С *еликополимера 1* показало большой положительный эффект гликозилирования (+8,1 м.д.) для C-1 α -Araf в дисахаридном фрагменте α -Araf-(1 \rightarrow 2)- α -Rhap-(1 \rightarrow , что характерно для одинаковой (то есть D-) абсолютной конфигурации обоих сахаров. Намного меньший (+3,5 м.д.) эффект в том же фрагменте можно было ожидать, если бы в качестве гликозилирующего сахара присутствовала α -L-Araf.

Таким образом, структуру повторяющегося звена *гликополимера 1* можно представить следующим образом: \rightarrow 3)- α -[α -D-Araf-(1 \rightarrow 2)]-D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 α -D-Rhap-(1 \rightarrow

Кислая фракция (гликополимер 2). Спектр ЯМР ¹³С гликополимера 2 (рис. 1, в) в области резонанса аномерных атомов углерода содержал четыре интенсивных сигнала при δ_{C} 101,3; 101,4; 104,4 и 104,6 м.д. В высокопольной области спектра наблюдались только минорные сигналы метильных групп от 6-дезоксисахаридов, а также слабый сигнал при 25,9 м.д. по сравнению с таковым в спектре исходного суммарного препарата (рис. 1, а). В низкопольной области спектра был виден слабый сигнал при 173,9 м.д., характерный для карбоксильной группы пирувата, и более интенсивный – при 173,1 м.д., характерный для карбоксильной группы уроновой кислоты. В спектре ЯМР ¹Н (рис. 5, вверху) в аномерной области наблюдались интенсивные сигналы четырёх протонов (δ_H 4,47, дублет $J_{1,2}$ 8 Hz; δ_H 4,61, дублет $J_{1,2}$
8 Нz; δ_H 4,66, уширенный синглет $J_{1,2} < 2$ Нz и δ_H 4,73, дублет $J_{1,2}$ 8 Hz). Только минорные сигналы метильных групп от четырёх остатков рамнопиранозы из *еликополимера* 1 и слабый синглет при 1,53 м.д. наблюдались в высокопольной области спектра. Почти полное исчезновение сигналов пируватных групп в *еликополимере* 2 при сравнении его спектров со спектрами для исходного суммарного препарата (рис. 1, *a*) выявило нестабильность пирувата в кислом растворе (вследствие автогидролиза). Локализация пирувата в исходном кислом препарате была установлена после изучения структуры депирувилированного *еликополимера* 2 (*dePyr-еликополимер* 2).

Анализ нейтральных моносахаридов в *dePyrсликополимере* 2 показал присутствие в качестве основных компонентов полисахарида галактозы, глюкозы и маннозы в соотношении 1/1/0,6.

Анализ спектров ¹H, ¹H COSY, TOCSY и ROESY *dePyr-гликополимера 2* из кислой фракции показал наличие остатков β-глюкуроновой кислоты (β-GlcpA, остаток A, таблица), β-галактопиранозы (β-Galp, остаток B), β-глюкопира-

нозы (β -Glc*p*, остаток **C**) и β -маннопиранозы (β -Man*p*, остаток **D**).

Отнесение сигналов атомов углерода в спектрах ¹H,¹³C HSQC (рис. 5) и ¹H,¹³C HSQC-ТОСЅҮ *dePyr-гликополимера 2*, а также сравнение спектров ЯМР ¹³C остатков со спектрами для соответствующих незамещённых пираноз выявило замещение остатков **A** (δ_{C-4} 81,5), **B** (δ_{C-4} 78,4) и **C** (δ_{C-4} 80,1) в положение 4 и замещение остатка **D** (δ_{C-3} 81,5) в положение 3.

Последовательность остатков в *dePyr-еликополимере* 2 следовала из анализов спектров ¹H,¹H ROESY и ¹H,¹³C HMBC. Гомоядерный 2D-спектр ¹H,¹H ROESY (рис. 6, таблица) содержал следующие корреляционные пики между протонами: 1A/4B (4,73/4,15); 1B/4C (4,47/3,67); 1C/2,3D (4,61/4,17; 3,85) и 1D/4A (4,66/3,82), демонстрируя линейное повторяющееся звено *dePyr-еликополимера* 2: \rightarrow 4A1 \rightarrow 4B1 \rightarrow 4C1 \rightarrow 3D1 \rightarrow .

Анализ спектра ¹H, ¹³С HMBC (рис. 7, таблица), содержащего корреляционные пики: H-1(**A**)/ C-4(**B**) (4,73/78,4); H-1(**B**)/C-4(**C**) (4,47/80,1); H-1(**C**)/C-3(**D**) (4,61/81,5); H-1(**D**)/C-4(**A**)



Рис. 4. Часть двумерного ¹H,¹³C HMBC-спектра *гликополимера 1* нейтральной фракции из клеточной стенки *Rathayibacter* sp. BKM Ac-2759. Соответствующие части ¹H и ¹³C ЯМР-спектров приведены вверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры до косой черты относятся к атомам протона, а после – к атомам углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с таблицей



Рис. 5. Части двумерного ¹H, ¹³C HSQC-спектра *dePyr-гликополимера 2* кислой фракции из клеточной стенки *Rathayibacter* sp. BKM Ac-2759. Соответствующие части ¹H и ¹³C ЯМР-спектров приведены вверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с таблицей

(4,66/81,5), так же как H-4(**B**)/C-1(**A**) (4,15/104,6); H-4(**C**)/C-1(**B**) (3,67/104,4); H-3(**D**)/C-1(**C**) (3,85/101,4) и H-4(**A**)/C-1(**D**) (3,82/101,3), показал согласование с последовательностью, представленной выше.

Газожидкостная хроматография обработанного оптически активным октанолом гидролизата *еликополимера* 2 выявила D-абсолютную конфигурацию глюкозы, галактозы и маннозы. Как положительный эффект β -гликозилирования по C-3 (+1,4 м.д.) остатка A (GlcpA) в дисахаридном фрагменте \rightarrow 3)- β -Manp-(1 \rightarrow 4)- β -GlcpA-(1 \rightarrow , так и отсутствие γ -эффекта по C-6 остатка B (Galp) в фрагменте \rightarrow 4)- β -GlcpA-(1 \rightarrow 4)- β -Galp-(1 \rightarrow указывают на одну и ту же D-конфигурацию остатков D, A и A, B в соответствующих фрагментах [14].

Таким образом, *dePyr-гликополимер 2* имеет следующую структуру повторяющегося звена: \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Manp-(1 \rightarrow .

Принимая во внимание структуру *dePyr-гли*кополимера 2, становится очевидной локализация пирувата с шестичленным циклом в интактном гликополимере 2 у С-4,6-маннопиранозы (остаток \mathbf{D}'), поскольку остатки \mathbf{B} и \mathbf{C} оказались гликозилированными в положение 4. Это утверждение можно было экспериментально подтвердить с помощью анализа двумерных спектров ЯМР исходного суммарного препарата, представляющего собой смесь гликополиме*ра 1* и интактного *гликополимера 2*, содержащего 4,6-пируват. Анализ спектров облегчался тем, что сигналы нейтрального гликополимера и сигналы остатков А, В и С кислого гликополимера в спектрах исходного препарата совпадали с таковыми в спектрах разделённых полимеров (рис. 2 и 5, таблица). Только в подспектре кислого гликополимера в спектре суммарного препарата существенно изменился сигнал остатка **D'** (с δ_{C-4} 73,7 – для остатка **D'** на δ_{C-4} 66,5 – для остатка **D**).

Низкопольный химический сдвиг сигналов С-4 и С-6 (эффекты α-замещения) и высокопольный химический сдвиг сигнала С-5 (два эффекта β-замещения) были типичными для

пирувата, расположенного в положениях 4 и 6 (таблица). Локализация пировиноградной кислоты на остатке D-маннопиранозы по положению O-4 и O-6, а также наличие интенсивного сигнала при $\delta_C 25,9$ м.д., характерного для пируватной группы с шестичленным циклом и с экваториальной ориентацией метильной группы в этом цикле, свидетельствовали об *S*-конфигурации пирувата [15].

Таким образом, *еликополимер 2* является тейхуроновой кислотой и имеет следующую структуру повторяющегося звена: \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -[4,6-*S*-Pyr]-D-Manp-(1 \rightarrow .

В настоящей работе представлены результаты изучения состава и структур гликополимеров клеточной стенки штамма ВКМ Ас-2759, являющегося претендентом на новый вид рода *Rathayibacter* [10]. Структуры полимеров описаны впервые у прокариотов. У штамма ВКМ Ас-2759 обнаружены D-рамнан и ацеталированная пировиноградной кислотой тейхуроновая кислота, отличные от гликополимеров представителей других видов рода [8, 9]. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными, свидетельствующими о видоспецифичности гликополимеров клеточных стенок для актинобактерий рода *Rathayibacter* [8].

Основная цепь выявленного рамнана построена из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, в которых остатки α -D-рамнопиранозы связаны чередующимися (1 \rightarrow 2) и (1 \rightarrow 3) гликозидными связями. Каждый остаток на нере-



Рис. 6. Часть двумерного ¹H,¹H ROESY-спектра *dePyr-еликополимера 2* кислой фракции из клеточной стенки *Rathayibacter* sp. BKM Ac-2759. Соответствующие части ¹H ЯМР-спектра показаны вдоль осей. Арабские цифры относятся к номерам атомов протона в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с таблицей. Косая черта обозначает пики корреляции между остатками



Рис. 7. Часть двумерного 1 Н, 13 С НМВС-спектра *dePyr-гликополимера 2* кислой фракции из клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759. Соответствующие части 1 Н и 13 С ЯМР-спектров приведены вверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры до косой черты относятся к атомам протона, а после – к атомам углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с таблицей

дуцирующем конце тетрасахарида гликозилирован по гидроксилу при C-2 боковыми остатками α -D-арабинофуранозы: \rightarrow 3)- α -[α -D-Araf-(1 \rightarrow 2)]-D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-R

Среди актинобактерий рода *Rathayibacter* D-рамнан (отличающийся по структуре) был обнаружен нами у *R. caricis* BKM Ac-1799^т [9]. Изученные к настоящему времени штаммы четырех других видов *Rathayibacter* содержали в клеточной стенке рамноманнаны [8]. Следует отметить, что все идентифицированные у *Rathayibacter* рамноманнаны и рамнаны имеют общую особенность: наличие в их составе рамнозы в D-конфигурации [8, 9], которая значительно реже встречается в гликополимерах бактерий по сравнению с широко распространенной L-рамнозой [16, 17] (Bacterial Carbohydrate Structure Database: http://csdb.glycoscience.ru). У представителей рода *Rathayibacter* L-изомер рамнозы присутствует в нейтральном полисахариде *R. toxicus* и тейхуроновых кислотах *R. iranicus* [7] и *R. caricis* [9].

Близкий по структуре к полисахариду штамма ВКМ Ас-2759 D-рамнан был описан в гликопротеине S-слоя *Aneurinibacillus thermoaerophilus* GS4-97, выделенном из сока сахарной свёклы [18]. Основная цепь полимера также состояла из тетрасахаридных повторяющихся звеньев с чередованием гликозидных связей (1 \rightarrow 2) и (1 \rightarrow 3), но в качестве боковых заместителей присутствовали остатки аминопроизводного фукопиранозы: \rightarrow 3)- α -[α -D-Fucp3NAc-(1 \rightarrow 2)]-D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -[α -D-Fucp3NAc-(1 \rightarrow 2)]-D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow .

D-Рамнаны довольно часто встречаются в биополимерах грамотрицательных бактерий (Bacterial Carbohydrate Structure Database: http:// csdb.glycoscience.ru). Среди них описаны поли-

сахариды, в том числе с тетрасахаридными повторяющимися звеньями, но с другим положением и чередованием гликозидных связей в структуре основной цепи. Например, у фитопатогенов *Burkholderia gladioli* ру. *agaricicola* такой Dрамнан присутствует в качестве экзополисахарида: \rightarrow 4)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow ; у *Pantoea agglomerans* – О-специфического полисахарида: \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- β -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow [19, 20]. Интересно отметить, что у представителей различных патоваров *Pseudomonas syringae* в составе О-полисахаридов были найдены линейные энантиомерные рамнаны [17].

Тейхуроновая кислота *Rathayibacter* sp. ВКМ Ac-2759, *гликополимер 2*, содержит в повторяющемся звене четыре моносахаридных остатка, один из которых, маннопираноза, несет ацеталь пировиноградной кислоты в *S*-конфигурации: \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -[4,6-*S*-Pyr]-D-Manp-(1 \rightarrow . Это второй случай обнаружения пирувата в структуре тейхуроновых кислот у представителей рода *Rathayibacter*. Ранее тейхуроновая кислоты, содержащая ацеталь пировиноградной кислоты с гептасахаридным повторяющимся звеном, была обнаружена у *R. caricis* ВКМ Ас-1799^T [9].

Таким образом, результаты настоящей работы и опубликованные ранее данные о наборе и структурах гликополимеров, представителей рода *Rathayibacter*, а также сведения о моносахаридном составе их клеточных стенок (рамноза, манноза, глюкоза, галактоза, арабиноза) позволяют более полно охарактеризовать род и его виды и могут быть использованы в таксономической практике для дифференциации таксонов видового и родового рангов на фенотипическом уровне. Кроме того, полученные результаты расширяют представления о разнообразии гликополимеров микробного происхождения и могут быть востребованы в работах по выяснению механизмов колонизации и инфекции растений бактериями рода *Rathayibacter*.

Финансирование. Работа выполнялась в рамках программы исследований № ЦИТИС: АА-АА-А16-116021660068-1, запланированных в МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра микробиологии 2016–2022 гг.

Благодарности. Авторы благодарны Галине Матвеевне Стрешинской за помощь в исследованиях и обсуждении статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zgurskaya, H. I., Evtushenko, L. I., Akimov, V. N., and Kalakoutskii, L. V. (1993) *Rathayibacter* gen, nov., including the species *Rathayibacter rathayi* comb. nov., *Rathayibacter tritici* comb. nov., *Rathayibacter iranicus* comb., nov., and six strains from annual grasses, *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 43, 143-149, doi: 10.1099/00207713-43-1-143.
- Evtushenko, L. I., and Dorofeeva, L. V. (2012) Genus XXII. *Rathayibacter* Zgurskaya, Evtushenko, Akimov and Kalakoutskii 1993, 147^{VP} in Bergey's manual of systematic bacteriology (Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Suzuki, K.-I., Ludwig, W., Whitman, W. B., eds.) 2nd Edn., Vol. 5, Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp. 953-964.
- Murray, T. D., Schroeder, B. K., Schneider, W. L., Luster, D. G., Sechler, A., et al. (2017) *Rathayibacter toxicus*, other *Rathayibacter* species inducing bacterial head blight of grasses, and the potential for livestock poisonings, *Phytopathology*, **107**, 804-815, doi: 10.1094/PHYTO-02-17-0047-RVW.
- Murray, T. D., Barrantes-Infante, B., and Schroeder, B. K. (2020) First report of bacterial head blight of *Pseudoroegneria spicata* subsp. *spicata* caused by *Rathayibacter agropyri* in Idaho, *Plant Disease*, **104**, 1534, doi: 10.1094/PDIS-06-19-1233-PDN.
- 5. Starodumova, I. P. (2018) Development of the classification system for actinobacteria of the genus *Rathayibacter*, candidate dissertation (in Russian), Moscow.
- 6. Shashkov, A. S., Tul'skaya, E. M., Dmitrenok, A. S., Streshinskaya, G. M., Potekhina, N. V., et al. (2018)

БИОХИМИЯ том 86 вып. 4 2021

Rhamnose-containing cell wall glycopolymers from *Rathayibacter toxicus* VKM Ac-1600 and "*Rathayibacter tanaceti*" VKM Ac-2596, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 717-726, doi: 10.1134/S0006297918060093.

- Dmitrenok, A. S., Shashkov, A. S., Streshinskaya, G. M., Tul'skaya, E. M., Potekhina, N. V., et al. (2019) New rhamnose-contaning glycopolymers from *Rathayibacter iranicus* VKM Ac-1602^T cell wall, *Carbohydr. Res.*, 482, 107728, doi: 10.1016/j.carres.2019.06.007.
- Shashkov, A. S., Tul'skaya, E. M., Streshinskaya, G. M., Dmitrenok, A. S., Potekhina, N. V., et al. (2020) Rhamnomannans and teichuronic acid from the cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603^T, *Biochemistry* (*Moscow*), **85**, 369-377, doi: 10.1134/S0006297920030128.
- Shashkov, A. S., Potekhina, N. V., Dmitrenok, A. S., Tul'skaya, E. M., Senchenkova, S. N., et al. (2021) D-Rhamnan and teichuronic acid from the cell wall of *Rathayibacter caricis* VKM Ac-1799^T, *Carbohydr. Res.*, 499, 108233.
- Tarlachkov, S. V., Starodumova, I. P., Dorofeeva, L. V., Prisyazhnaya, N. V., Leyn, S. A., et al. (2020) Complete and draft genome sequences of 12 plant-associated *Rathayibacter* strains of known and putative new species, *Microbiol. Resour. Announc.*, 9, e00316-20, doi: 10.1128/ MRA.00316-20.
- 11. Potekhina, N. V., Streshinskaya, G. M., Tul'skaya, E. M., and Shashkov, A. S. (2011) Cell wall teichoic acids in the taxonomy and characterization of Gram-positive bacteria, in *Methods in Microbiology* (Rainey, F. A., and

Oren, A., eds.) Vol. 38, Chap. 6, Academic Press, Elsevier, pp. 132-164, doi: 10.1016/B978-0-12-387730-7.00020-6.

- Leontein, K., Lindberg, B., and Lönngren, J. (1978) Assignment of absolute configuration of sugars by glc of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols, *Carbohyd. Res.*, **62**, 359-362, doi: 10.1016/S0008-6215(00)80882-4.
- Gerwig, G. J., Kamerling, I. P., and Vliegenthart, J. F. G. (1979) Determination of the absolute configuration of monosaccharides in complex carbohydrates by capillary GLC, *Carbohydr. Res.*, **77**, 1-7, doi: 10.1016/s0008-6215(00)83788-x.
- Shashkov, A. S., Lipkind, G. M., Knirel, Y. A., and Kochetkov, N. K. (1988) Stereometrical factors determining the effects of glycosylation on the ¹³C chemical shifts in carbohydrates, *Magn. Reson. Chem.*, 26, 735-747, doi: 10.1002/mrc.1260260904.
- Garegg, P. J., Jansson, P.-E., Lindberg, B., Lindh, F., Lönngren, J. (1980) Configuration of the acetal carbon atom of pyruvic acid acetals in some bacterial polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, **79**, 127-132, doi: 10.1016/S0008-6215(00)83666-6.

- Mistou, M.-Y., Sutcliffe, I. C., and van Sorge, N. M. (2016) Bacterial glycobiology: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, 40, 464-479, doi: 10.1093/femsre/fuw006.
- Knirel, Y. A. (2010) O-Specific polysaccharides of Gramnegative bacteria, in *Microbial Glycobiology* (Holst, O., Brennan, P. J., von Itzstein, M., eds.) Vol. 4, Academic Press, pp. 57-73, doi: 10.1016/B978-0-12-374546-0.X0001-6.
- Schaffer, C., Muller, N., Christian, R., Graninger, M., Wugeditsch, T., et al. (1999) Complete glycan structure of the S-layer glycoprotein of *Aneurinibacillus thermoaerophilus* GS4-97, *Glycobiology*, 9, 407-414, doi: 10.1093/glycob/9.4.407.
- Kaczynski, Z., Karapetyan, G., Evidente, A., Iacobellis, N. S., and Holst, O. (2006) The structure of a putative exopolysaccharide of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola*, *Carbohydr. Res.*, 341, 285-288, doi: 10.1016/j.carres. 2005.10.020.
- Cimmino, A., Marchi, G., Hanuszkiewicz, A., Surico, G., Evidente, A., and Holst, O. (2008) The structure of the Ospecific polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Pantoea agglomerans* strain FL1, *Carbohydr. Res.*, 343, 392-396, doi: 10.1016/j.carres.2007.10.023.

D-RHAMNAN AND PYRUVAT-CONTAINING TEICHURONIC ACID FROM THE CELL WALL OF *Rathayibacter* sp. VKM Ac-2759

A. S. Shashkov¹, E. M. Tul'skaya^{2*}, N. V. Potekhina², A. S. Dmitrenok¹, S. N. Senchenkova¹, V. A. Zaychikov², L. V. Dorofeeva³, and L. I. Evtushenko³

¹ Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 199334 Moscow, Russia

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

³ All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), Skryabin Institute of Biochemistry

and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research,

Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

Rathayibacter sp. VKM Ac-2759 (family of Microbacteriaceae, class Actinobacteria) contains two glycopolymers in the cell wall. The main chain of rhamnan, *glycopolymer 1*, is built from the repeating tetrasaccharide units carrying terminal arabinofuranose residues at the non-reducing end, \rightarrow 3)- α -[α -D-Araf-(1 \rightarrow 2)]-D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -[4,6-S-Pyr]-D-Manp-(1 \rightarrow . The polymer structures were established using chemical analysis and NMR spectroscopy, and described for the first time in prokaryotic microorganisms. The data obtained can be used in taxonomic studies and in studies elucidating mechanisms of colonization and infection of plants by bacteria of the *Rathayibacter* genus.

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

УДК 541.14

ВЛИЯНИЕ ДЕТЕРГЕНТОВ И ОСМОЛИТОВ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ НАТИВНЫХ И МУТАНТНЫХ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ *Rhodobacter sphaeroides*

© 2021 Т.Ю. Фуфина*, Л.Г. Васильева

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290 Пущино, Московская область, Россия; электронная noчma: tat fufina@yandex.ru

> Поступила в редакцию 07.12.2020 После доработки 18.02.2021 Принята к публикации 24.02.2021

Фотосинтетический реакционный центр (РЦ) пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* является одним из наиболее изученных трансмембранных пигмент-белковых комплексов. Он относительно стабилен, известны условия для его выделения из мембран, очистки и хранения. Однако при внесении аминокислотных замен в белковую структуру этого РЦ нередко наблюдается значительное снижение стабильности комплекса. Это выражается в падении выхода РЦ при его выделении и очистке, а также влияет на спектральные свойства РЦ при хранении и может приводить к гетерогенности образцов. С целью оптимизации условий работы с мутантными РЦ было исследовано влияние различных детергентов и осмолитов на устойчивость комплекса к повышенным температурам. Показано, что трегалоза и в меньшей степени сахароза, мальтоза и гидроксиэктоин в концентрации 1 М замедляют термальную денатурацию РЦ. Также продемонстрировано, что холат натрия оказывает значительный стабилизирующий эффект на структуру как нативных, так и генетически модифицированных РЦ. Использование холата натрия в качестве детергента для растворения РЦ имеет ряд преимуществ и может быть рекомендовано для хранения и изучения мутантных мембранных комплексов пурпурных бактерий в длительных экспериментах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: реакционный центр фотосинтеза, термостабильность мембранных белков, детергенты, осмолиты, трегалоза, холат натрия, *Rhodobacter sphaeroides*. **DOI:** 10.31857/S0320972521040126

введение

Мембранные белки играют важную роль во многих клеточных процессах и имеют значительный потенциал в области биотехнологий [1-3]. Для изучения и практического использования этих белков важен не только процесс выделения их из мембран, но также сохранение нативной структуры и биологической активности. Для солюбилизации белковых комплексов из мембран применяются детергенты, способствующие переводу интегральных белков в растворенное состояние. Используемая при солюбилизации концентрация детергентов близка к критической концентрации мицеллообразования, которая индивидуальна для каждого детергента [4]. При растворении и хранении мембранного белка концентрацию детергента снижают до уровня, достаточного для образования гидрофобного окружения белка, предотвращающего агрегацию и стабилизирующего природную структуру биополимера [5]. На сегодняшний день универсального для всех мембранных белков детергента не найдено, поэтому для каждого белка индивидуально подбираются как сами детергенты, так и соотношение детергент/белок, время и условия солюбилизации [4, 5].

Согласно одной из принятых классификаций, детергенты делятся на ионные, неионные и цвиттерионные [5]. Считается, что в отношении солюбилизации белков из мембран эффективность детергентов уменьшается в следующем порядке: ионные > цвиттерионные > неионные, в то время как эффективность детергентов в поддержании стабильности белков уменьшается в обратном порядке [6]. Отдельно выделяют соли желчных кислот, которые, хотя и являются ионными детергентами, характеризуются более мягким действием на структуру белка [7]. В последние годы опубликовано немало экспериментальных работ и обзоров, посвященных различным подходам, направленным на стабилизацию

Принятые сокращения: БФео – бактериофеофитин; БХл – бактериохлорофилл; ЛДАО – лаурилдиметиламиноксид; РЦ – реакционный центр; ТДМ – Тгіs–додецилмальтозид; ТЛ – Тгіs–ЛДАО; ТОГ – Тгіs – н-октилглюкозид; ТТ – Тгіs – Тритон-Х100; ТХ – Тгіs – холат натрия; Р – специальная пара бактериохлорофиллов P_A и P_B ; ФС2 – фотосистема 2.

^{*} Адресат для корреспонденции.

структуры мембранных белков в растворе [6, 8, 9]. В ряде исследований для этой цели использованы осмолиты – дисахариды, полиолы, некоторые аминокислоты, а также эктоины [10–14]. Известно, что осмолиты вырабатываются различными организмами в ответ на неблагоприятные условия, такие как нехватка воды и высокие температуры.

Фотосинтетический реакционный центр (РЦ) пурпурной бактерии Rhodobacter (Rba.) sphaeroides является одним их наиболее изученных трансмембранных пигмент-белковых комплексов. Он состоит из трех белковых субъединиц и десяти кофакторов переноса электрона [15]. Кофакторы представлены четырьмя молекулами бактериохлорофилла (БХл), две из которых образуют специальную пару, представляющую собой первичный донор электрона (Р), двумя молекулами бактериофеофитина (БФео), двумя молекулами убихинона, молекулой каротиноида и атомом негемового железа. Описанный РЦ относительно стабилен, для него подобраны условия солюбилизации из мембран, очистки и хранения, известны детергенты, способствующие сохранению его фотохимической активности [6, 16]. В последние годы в структурно-функциональных исследованиях РЦ активно используется сайт-направленный мутагенез с целью замены определенных аминокислотных остатков белковой цепи [17]. В спектре поглощения бактериальных РЦ хорошо различимы полосы поглощения бактериохлориновых кофакторов, что позволяет судить об изменении пигмент-белковых взаимодействий, вызванных как внесенными генетическими модификациями, так и воздействием неблагоприятных факторов среды. В ходе изучения мутантных РЦ было показано, что ряд аминокислотных замен вблизи кофакторов влияет на стабильность комплексов. В результате мутантные РЦ легче подвергаются денатурации, что снижает их выход при очистке, затрудняет кристаллизацию и проведение продолжительных экспериментов, а также может приводить к спектральной гетерогенности образцов [18]. Одним из примеров такого дестабилизирующего действия точечной мутации является описанный нами ранее РЦ Rba. sphaeroides с заменой изолейцина 177 в L-субъединице на гистидин I(L177)H [19]. В связи с этим оптимизация условий хранения и изучения мутантных РЦ является актуальной задачей.

Существует ряд подходов для определения стабильности мембранных белков, такие как SDS-электрофорез в ПААГ, дифференциальная сканирующая калориметрия, метод кругового дихроизма [5], использование фьюжн-белков с флуоресцентными метками [20]. При изучении

фотосинтетических комплексов в некоторых работах использовали мониторинг спектров поглощения при инкубировании РЦ в течение длительного времени в темноте при 4 °C [8] или при воздействии 25, 48 и 70 °C [7, 19, 21]. Скорость денатурации белка оценивали методом динамического светорассеяния, методом регистрации флуоресценции с использованием фьюжн-белков или по изменению полос бактериохлориновых кофакторов и появлению полос агрегированных пигментов в спектре поглощения ком-плексов.

В данной работе была исследована устойчивость фотосинтетических РЦ *Rba. sphaeroides* дикого типа и мутантного комплекса I(L177) H к повышенным температурам в присутствии ряда детергентов и осмолитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе мы изучали изолированные реакционные центры Rba. sphaeroides. Бактериальную культуру выращивали на среде Хатнера в присутствии тетрациклина (1 мкг/мл) («PanReac AppliChem», Испания, Германия) и канамицина (5 мкг/мл) («MP Biomedicals», США), как описано ранее [22]. Реакционные центры выделяли методом ионообменной хроматографии [23]. Полученные РЦ растворяли в 20 мМ Tris-HCl буфере рН 8,0, содержащем 0,1% лаурилдиметиламиноксид (ТЛ-буфер) («Sigma-Aldrich», США), 0,05% Тритон-Х100 (ТТ-буфер) («Helicon», Россия), 0,6% н-октил-глюкозид (ТОГ-буфер) («Serva», США) [24], 0,03% додецилмальтозид (ТДМ-буфер) («PanReac AppliChem»), 0,2% холат натрия (TX-буфер) («Sigma-Aldrich») [24]. Для смены детергента образец в ТЛ-буфере концентрировали, затем разбавляли буферным раствором с необходимым детергентом и снова концентрировали, повторяя эту процедуру дважды. Во всех экспериментах использовали образец РЦ с оптической плотностью, равной единице – при 804 нм для дикого типа и при 807 нм для мутанта I(L177) Н. К образцам добавляли аскорбат натрия (1 мМ) («Sigma-Aldrich») для поддержания первичного донора электрона в восстановленном состоянии. Для изучения действия осмолитов образцы РЦ в ТЛ-буфере помещали в 1 М раствор дисахаридов или гидроксиэктоина, как описано ранее [25]. Термостабильность РЦ оценивали при 48, 55 и 70 °C в течение 60 мин согласно описанной нами методике [19]. Измерение спектров поглощения производили на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Япония). Количество интактных РЦ в образце оценивали по поглощению мономерных БХл при 804 нм для дикого типа и при 807 нм для

I(L177)H), как описано в работе Holden-Dye et al. [21], с учетом светорассеяния образца. Разложение спектров поглощения на гауссианы и построение кривых изменения поглощения проводилось с помощью программы Origin («OriginLab», США). Дифференциальные (свет минус темнота) спектры поглощения измеряли при постоянном освещении с использованием скрещенных светофильтров C3C-22 и KC-19 на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu»).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В спектре поглощения РЦ дикого типа длинноволновая полоса с максимумом при 865 нм соответствует поглощению первичного донора электрона, полоса с максимумом при 804 нм поглощению мономерных БХл, а полоса с максимумом при 760 нм — поглощению молекул БФео активной и неактивной цепи переноса электрона (рис. 1, *a*, спектр *I*).

На рисунке 1, а с увеличением времени прогревания при 48 °С заметно уменьшение амплитуды длинноволновой полосы поглощения первичного донора электрона и ее сдвиг в коротковолновую область. Амплитуда полосы поглощения мономерных БХл при 804 нм также уменьшается. В то же время поглощение в области 700-800 нм растет в связи с увеличением светорассеяния и появлением в буферном растворе свободных бактериохлоринов вследствие температурной денатурации белка РЦ. Инкубация образца РЦ в течение 60 мин при температуре 48 °С приводит к практически полному исчезновению полос поглощения димера и мономеров БХл, значительному увеличению поглощения бактериохлоринов при 760 нм, появлению полосы агрегированного БХл при 857 нм, а также к увеличению светорассеяния образца, свидетельствующему о денатурации белка (рис. 1, *a*, спектр 7).

На рисунке 1, б приведены спектры поглощения РЦ дикого типа до нагревания (спектр *I*), через 10 и 20 мин прогревания при 48 °С (спектры 2 и 3 соответственно). Спектры поглощения РЦ описаны гауссианами, которые отражают положение полос поглощения БХл и БФео. По изменению амплитуды гауссиан хорошо заметно уменьшение поглощения БХл специальной пары и мономерных БХл и увеличение поглощения свободных бактериохлоринов при 760 нм.

На примере трегалозы и гидроксиэктоина мы определили, что стабилизирующее действие осмолитов на РЦ дикого типа проявлялось при концентрации выше 500 мМ (данные не приведены), поэтому для эксперимента была выбрана концентрация 1 М, используемая также и в ряде других работ [13, 25]. При нагревании РЦ в присутствии осмолитов в спектре поглощения образца наблюдались изменения, аналогичные представленным на рис. 1, а, однако денатурация РЦ была замедлена. Так, амплитуда Q_v полосы мономерных БХл при 804 нм за 60 мин инкубации при 48 °С в присутствии трегалозы, мальтозы, сахарозы или гидроксиэктоина уменьшилась на 55, 60, 65 и 70% соответственно. В контрольном образце РЦ поглощение при 804 нм уменьшилось в 5 раз (рис. 2).

На рисунке 3, *а* отражено влияние неионных (Тритон X-100, додецилмальтозид, н-октил-глюкозид), цвиттерионного (лаурилдиметиламиноксид – ЛДАО) и анионного (холат натрия) детергентов на термостабильность РЦ дикого типа. Показано, что после 60 мин инкубирования РЦ при 48 °C в буфере, содержащем ЛДАО, додецилмальтозид, Тритон X-100, н-октил-глюкозид или холат натрия, амплитуда Q_Y полосы мономерных БХл при 804 нм уменьшалась на 80, 55, 50, 15 и



Рис. 1. *а* – Изменение спектра поглощения РЦ дикого типа в ТЛ-буфере до нагревания и после прогревания при 48 °С в течение 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мин (спектры *1*–7 соответственно); *б* – разложение спектра поглощения РЦ дикого типа на гауссианы до нагревания и после прогревания при 48 °С в течение 10 и 20 мин (спектры *1–3* соответственно)



Рис. 2. Изменение поглощения в спектре РЦ дикого типа при 804 нм в условиях инкубирования в ТЛ-буфере в течение 60 мин при 48 °С без добавок (■); в присутствии 1 М раствора трегалозы (•); мальтозы (▲); сахарозы (▼); гидроксиэктоина (◆)

5% соответственно. Таким образом, наибольшая устойчивость РЦ к указанной температуре была отмечена в буферных растворах, содержащих холат натрия и н-октил-глюкозид (рис. 3, *a*). На рисунке 3, δ представлены спектры поглощения РЦ дикого типа в ТХ-буфере, измеренные в процессе инкубирования при 48 °C в течение 60 мин. При прогревании РЦ дикого типа в ТХ-буфере, в отличие от ТЛ-буфера (рис. 1, *a*), не происходит заметных изменений в спектре поглощения – соотношение полос пигментов и светорассеяние образца остаются постоянными.

В связи с обнаружением выраженного стабилизирующего эффекта холата натрия и в меньшей степени н-октил-глюкозида на структуру РЦ при 48 °С спектры поглощения образца были исследованы и при более высоких температурах, 55 и 70 °С (рис. 4, *а* и *б* соответственно). При 55 °С разрушение комплекса происходило в течение первых 10 мин, однако в ТОГ-буфере после 60 мин инкубирования в данных условиях в образце сохранялось 60% нативных комплексов РЦ, в ТХ-буфере – 85% (рис. 4). При повышении температуры до 70 °С в ТЛ и ТОГ буферных растворах происходила быстрая денатурация РЦ с появлением полос агрегированных пигментов в спектре поглощения образца, что затрудняло количественную оценку. В то же время использование ТХ-буфера позволило сохранить 35% интактных РЦ после 60 мин инкубирования при 70 °С (рис. 4, δ).

В РЦ дикого типа в ТЛ-буфере на свету регистрируется уменьшение поглощения полосы первичного донора электрона, а также коротковолновый сдвиг полосы поглощения мономерных БХл и длинноволновый сдвиг полосы поглощения БФео в поле зарядов Р⁺Q₋⁻. В нашей работе показано, что на свету в РЦ дикого типа в ТХ-буфере, как и в ТЛ-буфере, происходят аналогичные спектральные изменения, что указывает на перенос электрона от первичного донора Р к акцептору Q_A. Амплитуды полос в дифференциальном спектре (свет минус темнота) для РЦ в ТЛ- и ТХ-буферах совпадают (рис. 5). Эти данные свидетельствуют о том, что холат натрия не оказывает существенного влияния на процесс фотоиндуцированного переноса электрона в РЦ *Rba. sphaeroides*.

Значительное увеличение устойчивости РЦ к повышенным температурам в присутствии холата натрия было также продемонстрировано на мутантном РЦ с аминокислотной заменой I(L177)H. Ранее было показано, что замена изолейцина в позиции реакционного центра L177 на гистидин привела к снижению термостабильности генетически модифицированного РЦ в TT-буфере [19]. После 60 мин инкубирования в TT-буфере при 48 °C амплитуда длинноволно-



Рис. 3. *а* – Изменение поглощения при 804 нм в спектре РЦ дикого типа в условиях инкубирования при 48 °C в течение 60 мин в ТЛ-буфере (\bullet), ТТ-буфере (\bullet), ТДМ-буфере (\bullet), ТОГ-буфере (\bullet), ТХ-буфере (\bullet), ТС-буфере (\bullet), ТСГ-буфере (



Рис. 4. Изменение поглощения при 804 нм в спектре РЦ дикого типа при 55 °С (*a*) и при 70 °С (δ) в ТЛ-буфере (**•**), ТОГ-буфере (**•**) и ТХ-буфере (**▲**)

вой полосы поглощения мономерных БХл в РЦ дикого типа снизилась на 45%, а в мутантном РЦ – на 55% [19]. В настоящей работе продемонстрировано, что при инкубировании РЦ дикого типа и мутантного образца I(L177)Н при 48 °С в течение 60 мин в ТЛ-буфере амплитуда полосы мономерных БХл снижалась на 80 и 85% соответственно, при этом для мутантного РЦ в ТХ-буфере амплитуда снижалась менее чем на 10%, что также близко к термостабильности РЦ дикого типа в аналогичных условиях (рис. 3, *a*; 6, *a*). На рисунке 6, б показано изменение поглощения РЦ I(L177)Н при 807 нм в условиях инкубирования образца при 55 °С в буфере, содержащем ЛДАО или холат натрия, в присутствии или в отсутствие 1 М трегалозы. Показано, что при 55 °С в ТЛ-буфере денатурация мутантного РЦ происходила в первые 10 мин инкубирования, однако в ТХ-буфере спустя 60 мин инкубирования поглощение при 807 нм оставалось на уровне 80%. Добавление трегалозы в буфер с холатом натрия дополнительно способствовало повышению термостабильности РЦ I(L177)H (рис. 6, б). Таким образом, добавление в буфер холата натрия способствует достижению устойчивости мутантного комплекса к повышенным температурам на уровне РЦ дикого типа.

Мы отметили, что хранение РЦ I(L177)Н в буфере с холатом натрия при –20 °С не приводит к изменениям спектров поглощения образцов после процедуры оттаивания, в отличие от ТЛ-буфера (Фуфина, неопубликованные данные). Согласно полученным результатам, холат натрия может быть использован для хранения описанных генетически модифицированных РЦ без нарушения их свойств.

Мы также изучили возможность использования холата натрия для кристаллизации РЦ I(L177)H. Было показано, что в течение 4–5 недель при кристаллизации методом *in surfo* в ра-

БИОХИМИЯ том 86 вып. 4 2021

нее описанных условиях [26] в буфере, содержащем холат натрия, кристаллы не образовывались, тогда как в буфере с ЛДАО появились тригональные кристаллы. Эти результаты свидетельствует в пользу того, что холат натрия не подходит для кристаллизации РЦ *Rba. sphaeroides* в данных условиях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Реакционный центр *Rba. sphaeroides* характеризуется относительной стабильностью и значительной устойчивостью к повышенным температурам [21, 27]. Необходимость стабилизации структуры РЦ возникает при работе с мутантными комплексами, поскольку внесение направленных аминокислотных замен вблизи кофакторов нередко нарушает пигмент-белковые



Рис. 5. Дифференциальные (свет минус темнота) спектры поглощения РЦ дикого типа в ТЛ-буфере (пунктирная линия) и ТХ-буфере (сплошная линия), измеренные в диапазоне 700–1000 нм



Рис. 6. Изменение поглощения при 807 нм в спектре РЦ I(L177)Н в условиях инкубирования в течение 60 минут при 48 °С (*a*) и 55 °С (*б*) в ТЛ-буфере (●), ТХ-буфере (■), ТТ-буфере (▲), а также в ТЛ-буфере в присутствии 1 М трегалозы (○) и в ТХ-буфере буфере в присутствии 1 М трегалозы (□)

взаимодействия. В нашей работе показано, что такие осмолиты, как трегалоза и в меньшей степени сахароза, мальтоза и гидроксиэктоин в концентрации 1 М замедляют термальную денатурацию РЦ. Не исключена возможность того, что влияние осмолитов на термостабильность РЦ Rba. sphaeroides, продемонстрированное в данной работе, не является специфичным и связано с увеличением плотности буфера за счет высокой концентрации дисахаридов, замедляющей термальную денатурацию белка. Тем не менее полученные результаты согласуются с имеющимися литературными данными о влиянии осмолитов на стабильность других фотосинтетических белков. Так, показано, что гидроксиэктоин стабилизирует препараты фотосистемы 2 (ФС2) растений и способствует поддержанию функциональной активности этого комплекса in vitro [14]. Сообщается также, что добавление 1 М трегалозы значительно стимулирует фотоиндуцированную активность изолированных комплексов ФС2 [13, 28]. Согласно литературным данным протекторные свойства трегалозы как осмолита предположительно обусловлены такими ее свойствами, как относительная инертность гликозидной связи, высокая температура стеклования, высокая стабильность в широком диапазоне рН и температуры, а также высокая гидрофильность [12, 29]. В отношении действия трегалозы на РЦ пурпурных бактерий следует отметить работы лаборатории проф. Venturoli из университета Болоньи, в которых эти РЦ были исследованы в составе высушенных стеклообразных матриц с трегалозой [10]. В таких образцах при 44 °С спектр поглощения РЦ не изменялся в течение 96 ч [30]. Авторами было продемонстрировано, что в процессе первичного переноса электрона вблизи сайта связывания первичного хинона Q_A происходят конформационные изменения белка, стабилизирующие состояние с разделенными зарядами Р⁺Q_A⁻ [31].

В нашей работе показано, что выбор подходящего детергента для растворения и хранения РЦ Rba. sphaeroides является значительно более важным фактором для стабилизации комплекса по сравнению с добавлением осмолитов. Выявлено, что в присутствии холата натрия устойчивость РЦ к повышенным температурам близка к параметрам, характерным для РЦ в составе мембран [21]. При использовании буфера с холатом натрия при 48 °С термостабильность РЦ I(L177)Н соответствует таковой дикого типа, а при одновременном использовании буфера с холатом натрия и трегалозой термостабильность РЦ мутанта и дикого типа не различаются и при 55 °С. Ранее положительное влияние дезоксихолата на РЦ пурпурных бактерий было отмечено при изучении электронной структуры катионрадикала P^{+•} в работе Rautter et al. [32]. Заслуживает внимания и работа Gall and Scheer о влиянии детергентов на стабильность изолированных комплексов ФС2 растений, более сложного аналога РЦ пурпурных бактерий [7]. Авторами было отмечено, что среди целого ряда использованных детергентов наиболее выраженное стабилизирующее действие на лабильный комплекс ФС2 проявляли соли желчных кислот – холат, дезоксихолат и 3-[(3-холамидопропил)-диметиламмонио]-пропан-сульфонат (CHAPS). Авторы предположили, что наблюдаемый эффект обусловлен скорее структурными особенностями молекул солей желчных кислот, чем их ионными свойствами [7]. Отметим, что результаты описанной работы в отношении других детергентов не вполне согласовались с данными нашего исследования. Это несоответствие подтверждает тезис о том, что не существует универсального детергента: для каждого мембранного белка необходимо отдельно подбирать условия для солюбилизации и состав буфера для хранения [4, 5].

Холат натрия, являясь мягким детергентом, не эффективен для изолирования белков из

мембран и при солюбилизации мембранных комплексов обычно используется совместно с другими детергентами [24]. Вместе с тем данная работа показывает, что выбор холата натрия в качестве детергента в буферном растворе для РЦ Rba. sphaeroides имеет ряд несомненных преимуществ. Первое, мицеллы холата обладают небольшими размерами, 10-12 Å [33], поэтому при концентрировании РЦ на мембранах с порами 50-100 кДа молекулы детергента проходят сквозь них, и концентрация холата натрия в растворе РЦ не повышается. Это выгодно отличает холат натрия от других часто используемых детергентов, таких как Тритон Х-100, ДМ, ОГ и ЛДАО [4]. Второе, РЦ, растворенные в буфере с холатом натрия, при необходимости можно перевести в буфер с другими детергентами, что затруднительно, например, при использовании Тритона Х-100. Наконец, третье важное преимущество – холат натрия не только обладает большим стабилизирующим действием на РЦ, но также он значительно дешевле мягких неионных детергентов додецилмальтозида и н-октилглюкозида. Холат натрия нечасто используется в экспериментах с фотосинтетическими комплексами, что может объясняться потенциальной возможностью влияния этого детергента на фотохимические процессы в связи с его анионной природой. Однако, согласно полученным в нашей работе результатам, холат натрия не оказывает существенного влияния на фотохимическую активность РЦ Rba. sphaeroides, что позволяет рекомендовать этот детергент для использования в решении фундаментальных и прикладных задач с привлечением фотосинтетических мембранных белков пурпурных бактерий.

Таким образом, в данной работе показано, что присутствие дисахаридов в растворе оказывает слабый стабилизирующий эффект на структуру РЦ Rba. sphaeroides к повышенным температурам, в то время как использование детергента холата натрия значительно повышает устойчивость структуры РЦ, что важно при исследовании мутантных мембранных комплексов в длительных экспериментах. Эта характеристика холата натрия может способствовать его применению при создании искусственных преобразователей световой энергии на основе бактериальных РЦ, поскольку модификации, вносимые в комплекс для адаптации белковой структуры к технологическим требованиям (например, изменение величины редокс-потенциала Р, присоединение к полупроводниковой подложке, улучшение взаимодействия с искусственным донором или акцептором электрона и др.), с большой вероятностью приведут к снижению стабильности структуры РЦ [3].

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А17-117030110140-5 (направленный мутагенез реакционных центров), а также при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 17-00-00207 и № 17-00-00218 (К) (изучение термостабильности реакционных центров).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bayley, H., and Jayasinghe, L. (2004) Functional engineered channels and pores (review), *Mol. Membr. Biol.*, 21, 209-220, doi: 10.1080/09687680410001716853.
- Reimhult, E., and Kumar, K. (2008) Membrane biosensor platforms using nano- and microporous supports, *Trends Biotechnol.*, 26, 82-89, doi: 10.1016/j.tibtech.2007.11.004.
- Singh, V. K., Ravi, S. K., Ho, J. W., Wong, J. K. C., Jones, M. R., and Tan, S. C. (2018) Biohybrid photoproteinsemiconductor cells with deep-lying redox shuttles achieve a 0.7 V photovoltage, *Adv. Funct. Mater.*, 28, 1703689, doi: 10.1002/adfm.201703689.
- Le Maire, M., Champeil, P., and Moller, J. V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents, *Biochim. Biophys. Acta*, **1508**, 86-111, doi: 10.1016/s0304-4157(00)00010-1.
- Roy, A. (2015) Membrane preparation and solubilization, Methods Enzymol., 557, 45-56, doi: 10.1016/bs.mie.2014.11.044.
- 6. Sadaf, A., Cho K. H., Byrne, B., and Chae, P. S. (2015) Amphipathic agents for membrane protein study, *Methods Enzymol.*, **557**, 57-94, doi: 10.1016/bs.mie.2014.12.021.
- Gall, B., and Scheer, H. (1998) Stabilization of photosystem II reaction centers: influence of bile salt detergents and low pH, *FEBS Lett.*, 431, 161-166, doi: 10.1016/s0014-5793(98)00739-x.

8. Odahara, T. (2004) Stability and solubility of integral membrane proteins from photosynthetic bacteria solubilized in different detergents, *Biochim. Biophys. Acta*, **1660**, 80-92, doi: 10.1016/j.bbamem.2003.11.003.

- Breibeck, J., and Rompel, A. (2019) Successful amphiphiles as the key to crystallization of membrane proteins: Bridging theory and practice, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1863**, 437-455, doi: 10.1016/j.bbagen.2018.11.004.
- Francia, F., Dezi, M., Mallardi, A., Palazzo, G., Cordone, L., and Venturoli, G. (2008) Protein matrix coupling/ uncoupling in "dry" systems of photosynthetic reaction center embedded in trehalose/sucrose: the origin of trehalose peculiarity, J. Am. Chem. Soc., 130, 10240-10246, doi: 10.1021/ja801801p.
- Jain, N. K., and Roy, I. (2010) Trehalose and protein stability, *Curr. Protoc. Protein Sci.*, **59**, 4.9.1-4.9.12, doi: 10.1002/0471140864.ps0409s59.
- 12. Ohtake, S., and Wang, Y. J. (2011) Trehalose: current use and future applications, *J. Pharm. Sci.*, **100**, 2020-2053, doi: 10.1002/jps.22458.
- Мамедов М. Д., Петрова И. О., Яныкин Д. В., Заспа А. А., Семенов А. Ю. (2015) Влияние трегалозы на выделение кислорода и перенос электрона в комплексах фотосистемы 2, *Биохимия*, 80, 79-86, doi: 10.1134/S0006297915010071.

- 14. Yanykin, D. V., Malferrari, M., Rapino, S., Venturoli, G., Semenov, A. Yu., and Mamedov, M. D. (2019) Hydroxyectoine protects Mn-depleted photosystem II against photoinhibition acting as a source of electrons, *Photosynth. Res.*, **141**, 165-179, doi: 10.1007/s11120-019-00(17 00617-w.
- Allen, J. P., Feher, G., Yeates, T. O., Komiya, H., and Rees, D. S. (1987) Structure of reaction center from *Rhodobacter* 15. sphaeroides R-26: the cofactors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
- *sphaerolaes* R-26: the colactors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5730-5734, doi: 10.1073/pnas.84.16.5730.
 Jones, M.R. (2008) Structural plasticity of reaction centers from purple bacteria, in *The Purple Phototorophic Bacteria* (Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C., J. Beatty, N., eds) Springer, pp. 295-321.
 Леонова М. М., Фуфина Т. Ю., Шувалов В. А., Васильнова П. Б. (2014) Интеритические составляется и польские и составляется и польски с составляется и польски с составляется и польски с составляется и польских с сос
- ева Л. Г. (2014) Исследование пигмент-белковых взаимодействий в фотосинтетическом реакционном центре пурпурных бактерий. Глава в кн. Современные проблемы фотосинтеза, том. 1 (под ред. Аллахвердиева С.И., Рубина А.Б., Шувалова В.А.), Ижевский Институт компьютерных исследований, Москва-Ижевск, c. 157-196.
- 18. Васильева Л. Г., Фуфина Т. Ю., Габдулхаков А. Г., Шувалов В. А. (2015) Разные последствия одинаковых симметричных мутаций вблизи димера бактериохлорофилла в реакционном центре *Rhodobacter sphaeroides*, *Биохимия*, **80**, 767-774, doi: 10.1134/S0006297915060012.
- Фуфина Т. Ю., Васильева Л. Г., Шувалов В. А. (2010) 19 Исследование стабильности мутантного фотосинтетического реакционного центра Rhodobacter sphaeroides I(L177)Н и установление местоположения бактериохлорофилла, ковалентно связанного с белком, Био*xumua*, **75**, 256-263, doi: 10.1134/s0006297910020112. 20. Kawate, T., and Gouaux, E. (2006) Fluorescence-detec-
- tion size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins, Structure, 14, 673-681, doi: 10.1016/j.str.2006.01.013.
- Holden-Dye, K., Crouch, L. I., Williams, C. M., Bone, R. A., Cheng, J., et al. (2011) Opposing structural changes 21. in two symmetrical polypeptides bring about opposing changes to the thermal stability of a complex integral membrane protein, Arch. Biochem. Biophys., 505, 160-170, doi: 10.1016/j.abb.2010.09.029.
- Хатыпов Р. А., Васильева Л. Г., Фуфина Т. Ю., Болга-22. рина Т. И., Шувалов В. А. (2005) Влияние замещения изолейцина L177 гистидином на пигментный состав и свойства реакционных центров пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides, Биохимия*, **70**, 1527-1533, doi: 10.1007/s10541-005-0256-3.
- Fufina, T. Y., Vasilieva, L. G., Khatypov, R. A., Shkuropatov, A. Y., and Shuvalov, V. A. (2007) Substitution 23 of isoleucine L177 by histidine in Rhodobacter sphaeroides

reaction center results in the covalent binding of PA bacteriochlorophyll to the L subunit, FEBS Lett., 581, 5769-5773, doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.032.

- Dezi, M., Francia, F., Mallardi, A., Colafemmina, G., Palazzo, G., and Venturoli, G. (2007) Stabilization of charge separation and cardiolipin confinement in antenna-24 reaction center complexes purified from Rhodobacter sphaeroides, Biochim Biophys Acta, **1767**, 1041-56, doi: 10.1016/j.bbabio.2007.05.006.
- 25.
- doi: 10.1016/j.bbabio.2007.05.006.
 Lippert, K., and Galinski, E. A. (1992) Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes, Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 61-65, doi: 10.1007/BF00174204.
 Vasilieva, L. G., Fufina, T. Y., Gabdulkhakov, A. G., Leonova, M. M., Khatypov, R. A., and Shuvalov, V. A. (2012) The site-directed mutation I(L177)H in Rhodobacter relations of El(A) and Shuvalov. 26. sphaeroides reaction center affects coordination of P(A) and B(B) bacteriochlorophylls, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1407-1417, doi: 10.1016/j.bbabio.2012.02.008. Hughes, A. V., Rees, P., Heathcote, P., and Jones, M. R. (2006) Kinetic analysis of the thermal stability of the pho-
- 27. tosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*, *Biophys. J.*, **90**, 4155-4166.
- Yanykin, D. V., Khorobrykh, A. A., Mamedov, M. D., and Klimov, V. V. (2015) Trehalose stimulation of photoin-duced electron transfer and oxygen photoconsumption in Mn-depleted photosystem 2 membrane fragments, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **152**, 279-285, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.033. 28.
- Fernandez, O., Bethencourt, L., Quero, A., Sangwan, R. S., and Clement, C. (2010) Trehalose and plant stress responses: friend or foe, *Trends Plant Sci.*, **15**, 409-417, doi: 10.1016/j.tplants.2010.04.004. 29.
- Malferrari, M., Francia, F., and Venturoli, G. (2015) Retardation of protein dynamics by trehalose in dehydrat-30. ed systems of photosynthetic reaction centers. Insights from electron transfer and thermal denaturation kinetics, *J. Phys. Chem. B*, **119**, 13600-13618, doi: 10.1021/acs. jpcb.5b02986.
- Francia, E., Malferrari, M., SacquinMora, S., and Venturoli, G. (2009) Charge recombination kinetics and protein dynamics in wild type and carotenoidless bacterial 31. reaction centers: studies in trehalose glasses, *J. Phys. Chem.*, **113**, 10389-10398, doi: 10.1021/jp902287y. Rautter, J., Lendzian, F., Lubitz, W., Wang, S., and Allen,
- 32. J. P. (1994) Comparative study of reaction centers from photosynthetic purple bacteria: electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance spectroscopy, *Biochemistry*, **33**, 12077-12084, doi: 10.1021/bi00206a010.
- Маслова, В. А., Киселев, М. А. (2018) Структура ми-33. целл холата натрия, Кристаллография, **63**, 446-450, doi: 10.7868/S0023476118030141.

EFFECT OF DETERGENTS AND OSMOLYTES ON THERMAL STABILITY OF NATIVE AND MUTANT *Rhodobacter sphaeroides* **REACTION CENTERS**

T. Yu. Fufina* and L. G. Vasilieva

Institute of basic biological problems, Russian Academy of Sciences, PSCBR RAS, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: tat-fufina@yandex.ru

Photosynthetic reaction center (RC) of the purple bacterium Rhodobacter sphaeroides is one of the most well-studied transmembrane pigment-protein complexes. It is a relatively stable protein with established conditions for its isolation from membranes, purification, and storage. However, it has been shown that some amino acid substitutions can affect stability of the RC, which results in a decrease of the RCs yield during its isolation and purification, disturbs spectral properties of the RCs during storage, and can lead to sample heterogeneity. To optimize conditions for studying mutant RCs, the effect of various detergents and osmolytes on thermal stability of the complex was examined. It was shown that trehalose and, to a lesser extent, sucrose, maltose, and hydroxyectoin at 1 M concentration slow down thermal denaturation of RCs. Sodium cholate was found to have significant stabilizing effect on the structure of native and genetically modified RCs. The use of sodium cholate as a detergent has several advantages and can be recommended for the storage and investigation of the unstable mutant membrane complexes of purple bacteria in long-term experiments.

Keywords: photosynthetic reaction center, thermal stability of membrane proteins, detergents, osmolytes, trehalose, sodium cholate, Rhodobacter sphaeroides

=В ПОМОЩЬ АВТОРУ=

Новый раздел журнала: В ПОМОЩЬ АВТОРУ

Тривиальная, хотя и не всеми принимаемая истина состоит в том, что поставить хороший эксперимент и получить интересные результаты — это полдела. Вторая половина — это донести их до других исследователей. Для этого надо написать и опубликовать статью с изложением эксперимента и его результатов. Если эксперимент поставлен плохо, есть риск дезинформировать коллег и, конечно, нанести урон собственной научной репутации. Если статья написана плохо, то это вызовет трудности с опубликованием и тоже нанесет урон репутации в глазах редактора, рецензентов да и читателей, если статью всё же удастся протолкнуть. Мозг человека устроен так, что он ассоциирует качество формы с качеством содержания.

Имея всё это в виду, журнал открывает новую рубрику «В помощь автору», в которой будут публиковаться короткие заметки с советами по написанию и оформлению рукописей, переписке с редакцией и близким вопросам. Надеемся, что эта рубрика будет полезной, прежде всего, начинающим авторам и поможет улучшить качество поступающих рукописей. Рубрика открывается заметкой члена редакционной коллегии журнала проф. А.А. Байкова «Изучить или измерить?»

DOI: 10.31857/S0320972521040138

ИЗУЧИТЬ ИЛИ ИЗМЕРИТЬ?

Существуют два главных принципа написания хорошего научного текста: краткость и точность. Вся необходимая информация должна быть передана минимальным числом слов. Это относится как к построению отдельных предложений (не должно быть слов, которые можно убрать без ущерба для информативности), так и к тексту в целом. Сейчас не приветствуется, например, выходить в разделе «Обсуждения» за рамки приведённых в статье данных. Тенденция понятна и имеет причиной резкое увеличение количества научной информации, которую всё труднее, вернее, невозможно переварить полностью.

Точность текста достигается правильным использованием слов, прежде всего, научной терминологии. Два хорошо известных «сорняка» из недавнего прошлого – «первичная последовательность» и «степень гомологии». Первый из них незаконно рождён в результате скрещивания «первичной структуры» и «аминокислотной последовательности». Второй не учитывает того, что «гомология» – понятие качественное и степеней она не может иметь (степени имеет процент идентичности структуры и т.п.). С этими «пришельцами» боролись всем научным миром [1–4], и, хотя их «популяция» сократилась, она не исчезла полностью [5]. С «первичной последовательностью» всё ещё можно столкнуться и в *Nature*, не говоря уже про «степень гомологии», которая труднее поддается «выкорчёвыванию».

Есть ещё два близких по смыслу слова, которые вызывают досаду у рецензентов, редакторов и читателей. Это глаголы «изучить» и «исследовать». Они почти синонимы, но «изучить» более нацелен на результат, а «исследовать» – на процесс. Согласно словарю русского языка, изучить означает познать в результате научного исследования. Использование этих слов правомерно, если есть объект изучения/исследования, который должен присутствовать априори, до начала изучения, и может быть как материальным (белок, клетка, организм и т.п.), так и нематериальным (идея, теория, концепция и т.п.). Нельзя изучать то, существование чего не доказано. Это относится, прежде всего, к нематериальным объектам (активность, зависимость и т.п.). Кроме того, «изучение» не является синонимом слов «измерить», «определить», рассчитать» и т.п. и не может их заменять. В таких случаях следует искать другие слова, которые более точно передают желаемый смысл, или даже перефразировать текст.

Это же относится и к существительным «изучение» и «исследование», но у них есть и особая роль. Их часто помещают в начало заголовков статей, диссертаций и их разделов, чтобы подчеркнуть принадлежность текста к высокой

науке. В этой роли они чаще всего лишние и не несут существенной информации; то, что это научное исследование, и так понятно. В инструкции для авторов журнала Journal of Biological *Chemistry* [6] такие слова иронически характеризуются как «throat clearers» – труднопереводимо, но понятно. «Механизм влияния» не только короче варианта «исследование механизма влияния», но и сильнее по воздействию, потому что первый вариант ориентирует на результат, а второй – на процесс. Ведь часто бывает так: исследовали, исследовали и ничего не открыли – для отчета пойдёт, а для науки – ноль. Заголовок – это лицо публикации, он должен стимулировать интерес к ней, акцентируя внимание на самом важном – на результате, а не на процессе.

Значит ли это, что от использования слов «изучить» и «исследовать» и производных от них надо вообще отказаться? В заглавиях, пожалуй, да, но в остальном тексте эти термины могут быть вполне уместны в определённом контексте. В таблице приведены варианты их правильного и неправильного использования на примере выражения «изучить активность». В первых двух примерах необходима замена на более точное слово, что достаточно легко сделать – русский язык богат. Следует заметить, что данная проблема существует и в англоязычной научной литературе, но там она менее остра ввиду лучшей подготовки авторов и более строгого контроля со стороны редакторов журналов.

Примеры правильного и неправильного использования часто встречающегося словосочетания «изучить активность»

Подразумеваемый смысл	Оценка	Правильный вариант
Определить численную величину известной априори активности	неправильно	измерить, определить, рассчитать активность/числен- ную величину активности
Определить, проявляет ли объект некоторую априори неизвестную для него активность	неправильно	проверить, установить наличие интересующей актив- ности, установить субстратную специфичность (фер- мента и т.п.)
Разобраться в причинах наличия или механиз- ме проявления априори известной, но в чём- то необычной, неканонической активности	правильно	

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Reeck, G. R., de Haën, C., Teller, D. C., Doolittle, R. F., Fitch, W. M., et al. (1987) "Homology" in proteins and nucleic acids: a terminology muddle and a way out of it, *Cell*, 50, 667.
- Lewin, R. (1987) When does homology mean something else? *Science*, 237, 1570.
- 3. Kimelberg, H. K. (1987) "Homology" controversy, *Science*, **238**, 1217.
- 4. Aboitiz, F. (1987) Nonhomologous views of a terminology muddle, *Cell*, **51**, 515-516.
- 5. Marabotti, A., and Facchiano, A. (2009) When it comes to homology, bad habits die hard, *Trends Biochem. Sci.*, **34**, 98-99.
- 6. URL: https://www.asbmb.org/getmedia/e8a20699-34d4-4e02-9687-39ab743b46d0/jbc-abstracts-titles.

А.А. Байков

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: baykov@belozersky.msu.ru

616