

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 63, номер 1, 2021

---

---

Талин: структурно-функциональные связи <i>В. П. Иванова</i>	3
Липины: характеристика и функциональная роль в организме <i>С. С. Сайдакова, К. Н. Морозова, Е. В. Киселёва</i>	17
Мембранная биоэнергетика и разделение труда в системах электрически связанных клеток <i>Т. В. Потапова</i>	30
Роль мембранных везикул <i>Serratia grimesii</i> при взаимодействии бактерий с клетками CaCo-2 <i>Е. С. Божокина, Ю. М. Берсон</i>	43
Особенности повреждения астроцитов головного мозга под влиянием L-аминоадипиновой кислоты <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> <i>Д. Н. Воронков, А. А. Лыжин, Ю. В. Дикалова, А. В. Ставровская, Р. М. Худоерков, Л. Г. Хаспекоев</i>	53
Влияние криоконсервации на стабильность кариотипа трансформированных фибробластов легкого китайского хомячка <i>in vitro</i> <i>Т. М. Гринчук, М. А. Шилина</i>	63
Применение лазерной интерференционной микроскопии для оценки функционального состояния эритроцитов <i>А. В. Дерюгина, М. Н. Иващенко, А. А. Белов, П. С. Игнатъев, В. Б. Метелин</i>	74
Использование конфокальной микроскопии и программных методов 2D и 3D анализа для изучения структурной организации астроцитов <i>О. И. Носова, Д. А. Суфиева, Д. Э. Коржевский</i>	80
Взаимодействие мономеров в ближне-инфракрасных флуоресцентных биомаркерах <i>О. В. Степаненко, О. В. Степаненко</i>	88
Авторский указатель статей за 2020 год, том 62	94

---

---

# Contents

---

---

Vol. 63, No. 1, 2021

---

---

## Reviews

Talin: structural-functional relationships <i>V. P. Ivanova</i>	3
Lipins: Characteristics and functional role in the organism <i>S. S. Saidakova, K. N. Morozova, E. V. Kiseleva</i>	17
Membrane bioenergetics and distribution of functions in systems of electrically coupled cells <i>T. V. Potapova</i>	30

---

## Original articles

Role of outer membrane vesicles (OMVS) in <i>Serratia grimesii</i> interactions with CaCo-2 cells <i>E. S. Bozhokina, Yu. M. Berson</i>	43
Features of brain astrocyte damage under the influence of L-aminoadipic acid <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> <i>D. N. Voronkov, A. A. Lyzhin, Yu. V. Dikalova, A. V. Stavrovskaya, R. M. Khudoerkov, L. G. Khaspekov</i>	53
The influence of cryopreservation on the karyotype stability of transformed chinese hamster lung fibroblasts <i>in vitro</i> <i>T. M. Grinchuk, M. A. Shilina</i>	63
Assessing the functional state of red blood cells by using the laser interference microscopy <i>A. V. Deryugina, M. N. Ivashchenko, A. A. Belov, P. S. Ignatiev, V. B. Metelin</i>	74
Astrocyte structural organization analysis based on fluorescent microscopy with 2D and 3D quantitative approaches <i>O. I. Nosova, D. A. Sufieva, D. E. Korzhevsky</i>	80
Interaction of monomers in near-infrared fluorescent biomarkers <i>O. V. Stepanenko, O. V. Stepanenko</i>	88
Index of authors 2020. Vol. 62	94

---

---

## ТАЛИН: СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВЯЗИ

© 2021 г. В. П. Иванова\*

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия*

*\*E-mail: valet@iephb.ru*

Поступила в редакцию 02.10.2020 г.

После доработки 14.10.2020 г.

Принята к публикации 15.10.2020 г.

Взаимодействие внеклеточного матрикса (ВКМ) с цитоскелетом клетки осуществляют интегриновые рецепторы. После связывания интегринов с ВКМ в адгезионные структуры, формирующиеся в клетке, вовлекаются молекулы талина, которые участвуют как в регуляции активности интегриновых рецепторов, так и в связывании этих рецепторов с актиновым цитоскелетом. Талин является адаптерным белком, который содержит головной домен, представляющий собой атипичский FERM-домен, и палочковидный домен, состоящий из спирализованных пучков, построенных из 4-х или 5-ти  $\alpha$ -спиралей. Особенности укладки  $\alpha$ -спиралей в пучках определяют их устойчивость к воздействию сил натяжения и способность к растяжению. В представленном обзоре сделан акцент на выявлении связи между структурной организацией талина и распределением функций между головным и палочковидным доменами. Пространственная ориентация субдоменов (F0, F1, F2, F3) в головном домене обеспечивает доступность сайтов связывания в этих субдоменах для эффекторных молекул и быструю трансформацию самого домена при активации талина. Линейное расположение спирализованных пучков (R1–R13) в палочковидном домене с преобладанием 4-х спиральных пучков в N-конце домена и 5-ти спиральных пучков на его C-конце определяют: 1) эффективное межпучковое взаимодействие при образовании неактивной (автоингибированной) формы димера талина и 2) возможность изменения степени спирализации отдельных пучков под действием физических стимулов, в результате чего происходит демаскирование мест связывания с различными белками, скрытыми в спирализованных пучках палочковидного домена талина. Это означает, что N-концевая часть молекулы талина (головной домен) трансформирует одни биохимические сигналы в другие, а C-концевая часть молекулы (палочковидный домен) преобразует физические стимулы в биохимические или физиологические сигналы, регулирующие клеточный ответ. В обзоре рассматриваются и некоторые особенности взаимодействия талина с различными соединениями на молекулярном уровне.

**Ключевые слова:** домены и субдомены талина, автоингибирование талина, активация талина, интегрины, клеточная адгезия

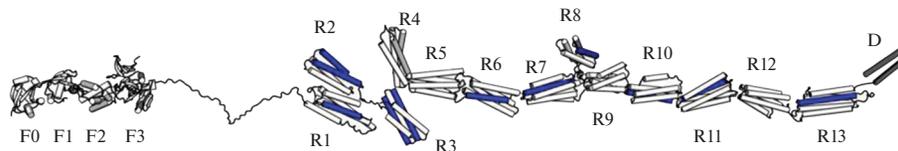
**DOI:** 10.31857/S0041377121010065

Главенствующее положение в формировании клеточных адгезионных структур занимают интегриновые рецепторы, обеспечивающие взаимосвязь между внеклеточными и внутриклеточными молекулами (Zaidel-Bar et al., 2007; Theocharis et al., 2016). Клеточно-матриксная адгезия, опосредованная интегринными, лежит в основе протекания многих клеточных процессов, включая изменение клеточной

формы, миграцию, рост, дифференциацию и апоптоз (Bergier, Yamada, 2007; Theocharis et al., 2016).

Интегрины представляют собой трансмембранные гетеродимерные рецепторы, состоящие из двух нековалентно связанных  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц. В настоящее время известно 18  $\alpha$ - и 8  $\beta$ -субъединиц, которые ассоциируют, формируя 24 различных вида интегриновых рецепторов, обладающих разной специфичностью (Takada et al., 2007; Barczyk et al., 2010; Pan et al., 2016). Каждая субъединица содержит крупный внеклеточный трансмембранный домен и короткий цитоплазматический домен (Campbell, Humphries, 2011). Внеклеточный домен  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц обеспечивает связывание интегринов с лигандами — белками внеклеточного матрикса (ВКМ) и поверхностными клеточными белками. Цитоплазматический домен обеих субъединиц взаимодействует с актиновым цитоскелетом клетки, а также с интегрин-ассоцииро-

**Принятые сокращения:** ВКМ — внеклеточный матрикс; ABS — сайт связывания с актином; DLC1 — опухолевый супрессор печени; FAK — киназа фокальных адгезий; FERM — семейство белков (протеин 4.1, эзрин, радиксин, мезин); IBS — сайт связывания с интегринными; KANK1–2 — белки почек, содержащие анкириновые повторы; PIP<sub>2</sub> — фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат; PIPK1 $\gamma$  — фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназа I типа; RIAM — адаптерная молекула, взаимодействующая с ГТФазой Rap1; TIAM1 — фактор индукции инвазии и метастазов T-клеточной лимфомы; VBS — сайт связывания с винкулином.



**Рис. 1.** Доменная и субдоменная организация молекулы талина. Талин состоит из N-концевого головного домена (субдомены F0, F1, F2, F3) и палочковидного (спирализованные пучки R1–R13). Между головным и палочковидным доменами расположен неструктурированный участок. D – субдомен димеризации.  $\alpha$ -Спирали, содержащие сайты связывания с винкулином, выделены синим цветом. По: Yao et al., 2016, публикуется с любезного разрешения авторов.

ванными и сигнальными белками (Legate, Fässler, 2009; Morse et al., 2014).

Большинство клеточных процессов, определяемых актиновыми филаментами, зависят от множества актин-связывающих белков и их регуляторов (Wolfenson et al., 2013). Одними из первых, после взаимодействия интегриновых рецепторов с компонентами ВКМ, в формирующиеся адгезионные структуры клетки вовлекаются молекулы талина, участвуя как в регуляции активности интегриновых рецепторов, так и осуществляя связь этих рецепторов с актиновым цитоскелетом клетки (Changede et al., 2015). Талин, являясь адаптерным белком, может контактировать также с другими адаптерными и регуляторными белками, формируя первичную платформу (базис) для построения клеточной адгезионной структуры (Critchley, Gingras, 2008; Das et al., 2014).

Цель представленного обзора состояла в анализе современных данных об особенностях строения и функционирования талина, а также о способах его активации и формах участия талина в структурировании адгезионных структур и проведении внутриклеточного и межклеточного сигнала. При этом основное внимание акцентировано на анализе структурно-функциональных связей талина.

### ОСОБЕННОСТИ ДОМЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ТАЛИНА

Молекула талина (2541 аминокислотных остатков) состоит из глобулярного N-концевого головного домена и крупного палочковидного C-концевого домена (рис. 1). Талин содержит два сайта связывания с интегринными, три сайта связывания с актином и 11 VBS (дополнительного компонента фокальных адгезий с актин-связывающей активностью), а также сайты связывания с другими структурными и регуляторными молекулами (табл. 1). В представленном обзоре описываются свойства талина 1 – доминирующей у позвоночных животных изоформы талина. (Более подробную информацию об изоформах талина см.: Gough, Goult, 2018).

Головной домен (около 400 аминокислотных остатков) талина включает 4 субдомена: F0 (85 аминокислот), а также F1, F2 и F3, образующие атипичный FERM (four-point-one-protein/*e*zrin/*r*adixin/*m*oes-

in) домен (остатки с 86 по 400) (табл. 2) (Goult et al., 2010). В отличие от белков, содержащих типичный FERM-домен, в молекуле талина субдомены F0–F3 в головном домене расположены линейно (Elliott et al., 2010). Субдомены F1, F2 и F3 могут контактировать с плазматической мембраной клетки. Субдомен F3 содержит сайт связывания (IBS1) с последовательностью, содержащей фрагмент NPxY (остатки 744–747), расположенной в цитоплазматической области  $\beta$ -субъединицы интегринового рецептора (Calderwood et al., 2002). Кроме того, субдомены F2 и F3 головного домена образуют сайт связывания с F-актином (ABS1) (остатки 202–435) (Lee et al., 2004). Предполагается, что указанные субдомены талина связываются с субдоменом 4 мономерной единицы F-актина и ингибируют элонгацию актиновых филаментов (Ciobanasi et al., 2018). Головной домен талина соединен с палочковидным неструктурированным линкерным участком последовательности (остатки с 401 по 481).

Палочковидный домен талина (около 2000 аминокислотных остатков) построен из 62 повторяющихся  $\alpha$ -спиральных участков (H1–H62), которые структурированы в 13 спирализованных пучков (R1–R13), состоящих из четырех (R2–R4, R8) или пяти (все, кроме H62)  $\alpha$ -спиралей (рис. 1, табл. 2) (Klapholz, Brown, 2017). У 4-х спиральных пучков R2–R4 N- и C-концевые последовательности расположены на одной стороне пучка. Наличие 4-х спиральных пучков (R2–R4) обуславливает более компактную организацию N-концевой части палочковидного домена. В отличие от четырехспиральных пучков, пятиспиральные пучки содержат протяженную петлю, которая при укладке пучка ориентирует расположение 1-ой спирали напротив 3-ей и 4-ой спиралей. Подобная укладка  $\alpha$ -спиралей приводит к тому, что N- и C-концы последовательности располагаются с противоположных сторон пятиспирального пучка. Именно указанная пространственная укладка  $\alpha$ -спиралей в пучке способствует линейной организации C-концевого участка (R5–R13, кроме R8) палочковидного домена, которая, в свою очередь, является необходимым структурным элементом для возможного приложения механических сил. Установлено, что для растягивания четырехспирального пучка требуется меньше силы, чем для раскрытия пятиспирального (Yan et al., 2015). Т.е. четырех-

**Таблица 1.** Сайты связывания с различными лигандами в субдоменах молекулы талина

Лиганды талина	Субдомены талина	Источник литературы
Актин	F2–F3 (ABS1)	Lee et al., 2004
	R4–R8 (ABS2)	Hemmings et al., 1996
	R13–D (ABS3)	Gingras et al., 2008
$\beta$ -интегрины	F3 (IBS1)	Calderwood et al., 2002
	R11 (IBS2)	Tremuth et al., 2004
Белок G $\alpha$ 13	F3	Schiemer et al., 2016
Моезин	R11–R13–D	Beaty et al., 2014
Паксиллин	F2–F3	Gao et al., 2017
$\alpha$ -синемин	R7–R8	Sun et al., 2008; Gingras et al., 2010
DLC1	R8	Zacharchenko et al., 2016
ФАК	F3	Lawson et al., 2012
KANK1–2	R7	Bouchet et al., 2016; Sun et al., 2016
PIP <sub>2</sub>	F2, F3	Chinthalapudi et al., 2018
PIP1 $\gamma$	F3	Di Paolo et al., 2002
Rap1	F0	Zhu et al., 2017
RIAM	F3, R2, R3, R8, R11	Goult et al., 2013b; Chang et al., 2014; Yang et al., 2014
TIAM1	F3	Wang et al., 2012

спиральные пучки менее устойчивы к воздействию сил натяжения и первыми теряют свернутую пространственную структуру.

В палочковидном домене талина расположен 2-ой сайт связывания с интегринами (IBS2) (Xing et al., 2001; Tremuth et al., 2004), который локализован внутри спирализованного пучка R11. По разным источникам, размеры IBS2 варьируют и соответствуют остаткам 1984–2113 (Tremuth et al., 2004), 1974–2139 (Gingras et al., 2009), 2077–2099 (Moes et al., 2007) и 2080–2099 (Rodius et al., 2008). При взаимодействии с интегринными имеет место ассоциация 50-ой  $\alpha$ -спирали пучка R11 палочковидного домена талина с  $\alpha$ -спиралью цитоплазматического сегмента 716–734 (KLLITINDR–KEFAKFEEER)  $\beta$ -субъединицы интегринов, расположенной проксимально от мембраны (Rodius et al., 2008). При этом положительно заряженные остатки Lys2085 и Lys2089 в IBS2 талина связываются с отрицательно заряженными остатками Glu726 и Glu733 в  $\beta$ -субъединице интегринов (Rodius et al., 2008). Установлено, что IBS2 участвует в процессах кластеризации интегриновых рецепторов в незрелых адгезиях (Changede et al., 2015).

Два актин-связывающих сайта находятся в области субдоменов R4–R8 (остатки 957–1327) (ABS2)

(Hemmings et al., 1996; Atherton et al., 2015; Kumar et al., 2016) и субдоменов R13–D (остатки 2340–2541) (ABS3) (McCann, Craig, 1997; Gingras et al., 2008). Установлено, что димер талина через ABS3 связывается с 3 мономерами актиновых филаментов (Gingras et al., 2008). Существует представление, что связывание актина с ABS3 приводит к начальному разворачиванию субдомена R3, которое определяет последующее разворачивание молекулы талина. По сравнению с R1 и R2, субдомен R3 характеризуется наименьшей стабильностью из-за наличия в его структуре 4-х остатков треонина (Thr809, Thr833, Thr867, Thr901), которые локализованы в гидрофобном коре этого субдомена (Yao et al., 2014). В результате разворачивания R3 происходит высвобождение ABS2, расположенного в центральной зоне палочковидного домена талина, для взаимодействия с F-актином, что способствует стабилизации фокальных адгезий и генерации силы натяжения (Atherton et al., 2015; Kumar et al., 2016). Установлено, что активность ABS регулируется соседними субдоменами. Так, 57-я  $\alpha$ -спираль ингибирует связывание актина через ABS3 (58–62  $\alpha$ -спирали) (Gingras et al., 2008). А субдомены R3 и R9, фланкирующие последовательность ABS2, ингибируют его активность (Atherton et al.,

**Таблица 2.** Расположение субдоменов в первичной последовательности молекулы талина

Субдомены талина	Позиция субдомена в последовательности талина <sup>a</sup>
F0	1–85
F1	86–202
F2	203–309
F3	310–402
R1	482–655
R2	656–786
R3	787–911
R4	913–1044
R5	1045–1205
R6	1206–1357
R7	1358–1653
R8	1461–1580
R9	1654–1822
R10	1823–1973
R11	1974–2140
R12	2141–2294
R13	2300–2482
D	2494–2541

<sup>a</sup>Дано по: Yang et al., 2014.

2015). При этом указанный ингибирующий эффект отменяется в результате конформационных изменений молекулы талина.

Существует определенное разграничение в функционировании ABS2 и ABS3. Так, ABS3 регулирует распределение клеточных адгезий в клетке (периферическое или центральное), а ABS2 выполняет

функцию механосенсора, обеспечивающего передачу силового сигнала и изменение физико-химических свойств субстрата (Kumar et al., 2016). Кроме того, связывание молекулы талина с F-актином через разные сайты взаимодействия может регулировать направленность силы натяжения. Так, в случае связывания актиновых филаментов с ABS2 может происходить растягивание спирализованных пучков R1–R8, а при связывании с ABS3 – всего палочковидного домена (Goult et al., 2018). Однако каким образом сайты взаимодействия с актином регулируют ремоделирование актина, неизвестно. Недавно установлено участие ABS3 в поляризации и миграции клеток (Rahikainen et al., 2019).

Палочковидный домен талина содержит 11 сайтов связывания с головным доменом винкулина (табл. 3) (Bass et al., 2002; Gingras et al., 2005). VBS в свернутой форме молекулы талина скрыты внутри спирализованных пучков (состоящих из 4-х или 5-ти  $\alpha$ -спиралей) (Gingras et al., 2005; Patel et al., 2006).

Вслед за этими участками расположен субдомен димеризации (D), участвующий в образовании антипараллельного гомодимера талина (рис. 1) (Goult et al., 2013a).

#### АКТИВАЦИЯ ТАЛИНА. СТРУКТУРООБРАЗУЮЩАЯ РОЛЬ ТАЛИНА В ФОРМИРОВАНИИ ФОКАЛЬНЫХ АДГЕЗИЙ

В неактивном состоянии димер талина локализуется в цитоплазме и имеет компактную пространственную форму (рис. 2) (Goksoy et al., 2008; Goult et al., 2013a; Dedden et al., 2019). Предполагается, что неактивная форма димера талина представляет собой антипараллельную свернутую по кругу структуру палочковидных доменов вокруг общего центра, в котором располагаются головные домены каждого из

**Таблица 3.** Распределение сайтов связывания с винкулином в палочковидном домене талина

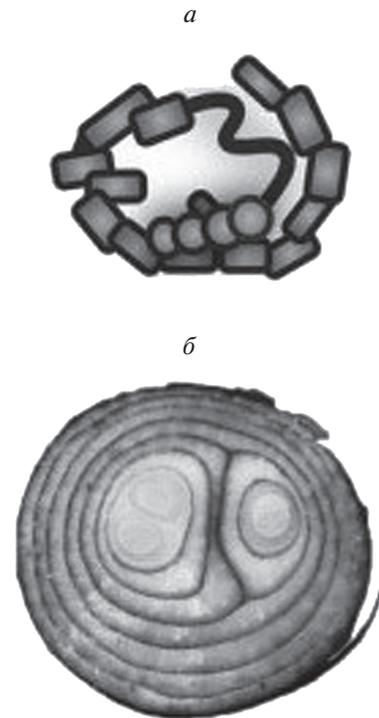
Локализация сайтов связывания в последовательности талина <sup>a</sup>	Порядковый номер $\alpha$ -спирали	Спирализованный пучок	
		из 4-х $\alpha$ -спиралей	из 5-ти $\alpha$ -спиралей
604–633	4		R1
664–688	6	R2	
765–789	9	R2	
820–844	11	R3	
852–876	12	R3	
1330–1354	27		R6
1520–1544	33	R8	
1628–1652	36		R7
1945–1969	46		R10
2077–2101	50		R11
2345–2369	58		R13

<sup>a</sup>Дано по: Gingras et al., 2005.

мономеров молекулы (модель “double donut”) (Goult et al., 2013a). Стабилизация неактивной формы талина осуществляется взаимодействиями между субдоменами F3 и R9 (Goult et al., 2009; Song et al., 2012), F2–F3 и R1–R2 (Banno et al., 2012), а также R3–R4 и R9–R10–R11–R12 (Goult et al., 2013a). Верхний слой компактной структуры димера стабилизируется контактами между участками палочковидного домена R3–R4 и R9–R10–R11–R12. Самая сильная связь формируется между субдоменами F3 головного домена с субдоменом R9 палочковидного домена талина. При этом Tyr377 субдомена F3 фиксируется в гидрофобном кармане на одном конце 5-спирально-го пучка R9. Одновременно кластер основных аминокислотных остатков основной петли субдомена F3, состоящий из Lys316, Lys318, Lys320, Lys322 и Lys324, взаимодействует с кластером отрицательно заряженных аминокислотных остатков Asp1676, Asp1763, Glu1770, Glu1798, Glu1805, локализованных в середине 4-ой  $\alpha$ -спирали R9 (Goksoy et al., 2008; Goult et al., 2009). Позднее было показано, что кроме 4-ой  $\alpha$ -спирали в процессе автоингибирования молекулы талина может участвовать и 5-я  $\alpha$ -спираль R9 (Zhang et al., 2016). Остальные взаимодействия, участвующие в стабилизации свернутой формы димера талина, относятся к слабым связям.

В настоящее время существуют разные точки зрения относительно способов активации молекулы талина (Lee et al., 2009; Kopp et al., 2010). Сторонники одной точки зрения считают, что главенствующее значение в активации и транслокации к мембране талина играет малая ГТФаза Rap1 и ее эффектор RIAM (Rap1-GTP-interacting adapter molecule – адаптерная молекула, взаимодействующая с ГТФазой Rap1) (Han et al., 2006). Молекула RIAM может взаимодействовать с головным и палочковидным доменами талина. RIAM, связываясь с субдоменом F3 головного домена, вытесняет субдомен R9 палочковидного домена из зоны формирования свернутой неактивной формы талина (Yang et al., 2014). Кроме того, молекула RIAM через сайт связывания с талином 1 (TBS1) (остатки 1–30) связывается с определенными участками, локализованными в субдоменах R2–R3 (остатки 655–911), R8 (остатки 1461–1580) и R11 (остатки 1974–2140) палочковидного домена талина (Lee et al., 2009; Goult et al., 2013b; Chang et al., 2014). Интересно, что RIAM может связываться с субдоменами R2 и R3 талина, которые находятся в исходной спирализованной конформации (Goult et al., 2013b). Взаимодействие RIAM с субдоменами палочковидного домена приводит к транслокации талина к мембране клетки, где он активирует интегриновые рецепторы (Yang et al., 2014).

Существуют данные, подтверждающие роль ГТФазы Rap1 в рекрутизации талина к плазматической мембране (Zhu et al., 2017). Мембраносвязывающая способность головного домена талина через положительно заряженную поверхность субдоменов F1, F2 и F3 усиливалась при связывании Rap1 с мем-



**Рис. 2.** Неактивная компактная форма талина. *а* – Свернутый мономер талина; *б* – глобула димера талина, в центре располагаются головные домены мономеров, вокруг которых свернуты палочковидные домены. Более подробно см. в тексте. Приводится частично по: Gough, Goult, 2018.

браной. Установлено, что Rap1 посредством  $\alpha 1$ -спирали и участка переключения 1 (switch1) (остатки Gln25, Val21, Val29, Asp33) связывается с  $\alpha 2$ -спиралью субдомена F0 головного домена талина (Glu38, Pro37, Ile36, Arg35), усиливая тем самым взаимодействие с мембраной (Zhu et al., 2017).

Активацию талина может регулировать не только RIAM. У тромбоцитов в этом процессе может участвовать гетеротримерный G-белок ( $G\alpha_{13}$ ), который, как известно, регулирует процессы гемостаза и тромбоза. Показано, что активация молекулы талина происходит в результате взаимодействия пептидного фрагмента VGGQRSEKRWFEFCFDS, локализованного в зоне переключения 2 (switch region 2) G-белка, с фрагментом 310–328 субдомена F3 головного домена талина (Schiemer et al., 2016). Передача сигнала посредством взаимодействия  $G\alpha_{13}$  с молекулой талина регулирует адгезионные процессы тромбоцитов. Предполагается, что зоны взаимодействия  $G\alpha_{13}$  и RIAM с субдоменом F3 талина перекрываются. Это означает, что связывание  $G\alpha_{13}$  с талином ингибирует или уменьшает эффективность связывания молекулы RIAM с талином и наоборот.

Другая точка зрения состоит в том, что активация молекулы талина является мембранозависимым процессом и обусловлена связыванием субдоменов

F2 и F3 головного домена с участками внутреннего листка липидного бислоя плазматической мембраны, обогащенными минорным фосфолипидом фосфатидилинозитол-4,5-бифосфатом (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> или PIP<sub>2</sub>) (Kopp et al., 2010; Song et al., 2012). Согласно последним данным, это взаимодействие обеспечивается остатками Lys272 субдомена F2, а также Lys316, Lys324, Glu342 и Lys343 субдомена F3 (Chinthalapudi et al., 2018). При этом 4'-фосфатная группа PIP<sub>2</sub> взаимодействует с головным доменом по остаткам Lys272, Glu342 и Lys343, а 5'-фосфатная группа связывается с Glu342 и Lys316. Два аминокислотных остатка Lys316 и Lys324 субдомена F3, как упоминалось выше, используются также при формировании неактивной формы молекулы талина. Т.е. имеет место перекрывание зон взаимодействия субдоменов F3 с различными лигандами (палочковидным доменом талина, аннулярыными липидами).

После контакта головного домена талина с мембраной и последующего связывания талина с F-актином под действием сил натяжения происходит частичная деспирализация трехмерной структуры палочковидного домена талина, которая приводит к демаскированию определенных мест связывания с различными белками, включая винкулин, скрытых до этого в спирализованных пучках палочковидного домена талина (Yao et al., 2014).

Имеющиеся в настоящее время данные о способах активации талина в клетке могут свидетельствовать о вариабельности этого процесса. В зависимости от типа клеток, физико-химических свойств ВКМ и условий микроокружения клетки в целом может использоваться тот или иной способ активации талина.

Постепенное раскрытие третичной структуры палочковидного домена талина определяет иерархию активации сайтов взаимодействия с различными молекулами (Hytönen, Vogel, 2008). Некоторые сайты (IBS1, IBS2 и ABS3) доступны для взаимодействия в молекуле талина с частично развернутой конформацией, но с сохранением третичной структуры у всех спирализованных пучков (Ascario, Tajkhorshid, 2014). Под действием силы натяжения происходит разворачивание спирализованных пучков с сохранением структуры  $\alpha$ -спиралей, которое приводит к доступности VBS, ранее скрытых в свернутой структуре палочковидного домена талина (del Rio et al., 2009; Margadant et al., 2011; Yao et al., 2014; Wang et al., 2019). В зависимости от места приложения механической силы (латерально или через N- и C-концы пучка) возможна различная последовательность раскрытия спиралей и, следовательно, доступность VBS может варьировать (Roberts, Critchley, 2009). При увеличении механической силы увеличивается число доступных для взаимодействия VBS, соответственно, возрастает количество молекул винкулина, связанных с молекулой талина (Hytönen, Vogel, 2008). Более того, показано, что связывание молекул винку-

лина с димером талина, пространственная структура которого находится в процессе разворачивания, является кооперативным процессом (Hu et al., 2016). Т.е. молекула винкулина, связываясь и стабилизируя развернутую структуру талина, ускоряет связывание дополнительных молекул винкулина с талином.

В настоящее время молекулярный механизм взаимодействия всех VBS полностью не изучен. Например, известно, что детерминанта VBS-1, локализованная в 4-ой  $\alpha$ -спирали пятиспирального пучка R1 (остатки 482–655) палочковидного домена талина, содержит 5 гидрофобных остатков (Leu608, Ala612, Leu615, Val619 и Leu623). Последние формируют локальную гидрофобную зону на поверхности пяти оборотов 4-ой  $\alpha$ -спирали. Указанная панель аминокислотных остатков осуществляет гидрофобное взаимодействие с бороздой, расположенной в головном домене винкулина, при этом образуется эквивалент пятиспирального пучка совместно с имеющимися N-концевыми 4-мя спиралями ( $\alpha 1$ – $\alpha 4$ ) головного домена винкулина (Papagrigrigoriou et al., 2004). Образование комплекса между VBS1 талина и винкулином требует разворачивания пятиспирального пучка R1. Другими словами, за счет дестабилизации структуры талина образуется новая трехмерная структура для связывания с другим белком. Можно предположить, что подобный механизм актуален и для других VBS.

Связывание молекул винкулина с развернутой структурой талина способствует как взаимодействию с актиновыми филаментами, так и укрупнению фокальных адгезий (Humphries et al., 2007). В целом, стабилизация вытянутой конформации молекулы талина через связывание с головным доменом винкулина обеспечивает усиление взаимодействия между интегринными и цитоскелетом (Yao et al., 2014; Yan et al., 2015).

Следует отметить, что талин можно отнести к механочувствительному адаптеру, который посредством конформационных изменений спирализованных пучков палочковидного домена, индуцированных сокращением актиновых филаментов, ассоциированных с фокальными адгезиями, может регулировать вовлечение молекул винкулина в фокальные адгезии и взаимодействие с другими белками через структурные изменения (Lee et al., 2007; del Rio et al., 2009; Yan et al., 2015; Goult et al., 2018).

### ЗНАЧЕНИЕ ТАЛИНА В РЕГУЛИРОВАНИИ АКТИВНОСТИ ИНТЕГРИНОВ И ПРОВЕДЕНИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО И МЕЖКЛЕТОЧНОГО СИГНАЛА

Не менее важным является участие талина в процессах активации интегринных рецепторов в ходе передачи сигнала из клетки (inside-out). Особая роль в этом процессе принадлежит головному домену талина, который характеризуется асимметрией распределения положительно заряженных аминокислот на

поверхности субдоменов F2 и F3. Установлено, что положительно заряженная зона на поверхности субдомена F2 (Lys256, Lys272, Lys274, Arg277) (Anthis et al., 2009; Chinthalapudi et al., 2018) и субдомена F3 (Lys322 (Wegener et al., 2007) и Lys324 (Saltel et al., 2009) или Lys316, Lys324, Lys343 (Chinthalapudi et al., 2018)) взаимодействует с анионными липидами клеточных мембран, включая  $PIP_2$  (Ye et al., 2016), что обеспечивает изменение пространственной ориентации субдоменов F0–F3 головного домена талина.

В частности, удалось показать, что в результате этих процессов происходит переход от линейного расположения указанных субдоменов в V-образную конфигурацию с углом  $60^\circ$  между F0–F1 и F2–F3 (Kalli et al., 2013). Подобная конформация, с одной стороны, оптимизирует контакты талина с отрицательно заряженными микродоменами липидного бислоя клеточной мембраны, с другой стороны, усиливает взаимодействие с интегриновыми рецепторами, увеличивая число водородных связей между субдоменом F3 и цитоплазматическим участком  $\beta$ -субъединицы интегринов (Saltel et al., 2009). Скорее всего, связывание субдомена талина F2 с мембранными участками, содержащими  $PIP_2$ , способствует необходимой ориентации головного домена талина для продуктивного взаимодействия субдомена F3 с  $\alpha$ -спиральным сегментом (остатки 716–734) цитоплазматического домена  $\beta$ -субъединицы интегриновых рецепторов, который локализован проксимально относительно мембраны (Anthis et al., 2009; Saltel et al., 2009; Ascario, Tajkhorshid, 2014). Ведущая роль во взаимодействии интегринов отводится отрицательно заряженным аминокислотным остаткам. По разным источникам, это может быть группа, состоящая из Asp723, Glu726, Glu733 (Saltel et al., 2009) или из Glu726 и Glu733 (Rodius et al., 2008). Установленный контакт F3 защищает  $\beta$ -субъединицу от реассоциации с  $\alpha$ -субъединицей рецепторов.

Кроме субдомена F2 установлено участие субдоменов F0 и F1 в пространственной подстройке субдомена F3 для оптимального взаимодействия талина с  $\beta$ -субъединицей интегринов (Voiaouina et al., 2008). По мнению некоторых исследователей, особенности пространственной укладки субдомена F1 талина играют существенную роль в активации интегринов (Goult et al., 2010). Субдомен F1 головного домена содержит большую петлю, которая при контакте с мембраной может формировать спираль, в которой основные аминокислотные остатки сгруппированы на одной стороне спирали, что обеспечивает наилучшие условия для взаимодействия с отрицательно заряженными фосфолипидами мембраны. Кроме того, в ходе спирализации петли субдомена F1 происходит уменьшение ее длины, что приводит к сближению субдоменов F0 и F1 с плазматической мембраной. В конечном итоге, взаимодействие субдомена F3 талина с цитоплазматическим доменом  $\beta$ -субъединицы рецептора вносит свой вклад в уско-

рение сборки фокальных адгезий и увеличение их количества (Kopp et al., 2010).

Для активации интегринов, помимо связывания талина с отрицательно заряженными липидами мембран, необходимо также взаимодействие субдомена F3 головного домена талина в зоне локализации IBS1 с фрагментом WxxxxNPxY (остатки 739–747 для  $\beta$ 3) цитоплазматического домена  $\beta$ -субъединицы интегринов (Calderwood, 2004; Legate, Fässler, 2009). Предполагается, что Trp739 интегрин связывается с карманоподобной структурой, образованной остатками Arg358, Ala360 и Tyr377, которые расположены в 5-ом тяжбе  $\beta$ -структуры субдомена F3 талина. Одновременно фрагмент NPxY  $\beta$ -субъединицы рецептора взаимодействует со спиралью H1 субдомена F3 талина на участке Ala389, Gln390, Ala393 и Ile398. А остаток Phe727  $\beta$ -субъединицы интегрин входит в петлю между тяжами 1–2 субдомена F3 талина, в состав которой входят остатки Lys318, Met319 и Lys320 (Garcia-Alvarez et al., 2003; Wegener et al., 2007; Mehrbod et al., 2013).

Присоединение талина приводит к разрушению зон ассоциации  $\alpha$ -спиралей в трансмембранных доменах  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, обуславливающих низкоаффинное состояние интегринов (Luo et al., 2004). В частности нарушается взаимодействие глицин-содержащих сегментов Gly972xxxGly976 (в  $\alpha$ -субъединице) и Gly708 (в  $\beta$ -субъединице), а также участков с гидрофобными аминокислотами Phe992–Phe993 (в  $\alpha$ -субъединице) и Trp715 (в  $\beta$ -субъединице). Нарушение тесного контакта в этих участках трансмембранных доменов интегринов приводит к разрушению электростатического взаимодействия между Arg995 и Asp723 в  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицах соответственно (Vinogradova et al., 2002; Lau et al., 2009). Скорее всего, Lys324 талина вытесняет Arg995  $\alpha$ -субъединицы из солевого мостика между  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами, ингибирующего активность интегриновых рецепторов. В результате этих процессов изменяется пространственная ориентация трансмембранного домена  $\beta$ -субъединицы, и  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы расходятся в плоскости мембраны, что приводит к активации внеклеточного домена и усилению аффинности интегриновых рецепторов к ВКМ (Luo et al., 2004; Wegener et al., 2007; Anthis et al., 2009; Shattil et al., 2010; Kim et al., 2012). Другими словами, Asp723  $\beta$ -субъединицы интегринов может участвовать в регуляции как инактивации рецепторов через взаимодействие с Arg995  $\alpha$ -субъединицы в отсутствии талина, так и активации рецепторов посредством взаимодействия с Lys324 талина (Saltel et al., 2009).

Кроме регулирования аффинности интегриновых рецепторов талин может влиять на формирование кластеров из этих рецепторов (Bunch, 2010). Возможно талин, образуя комплекс с лиганд-связанным рецептором, может вовлекать соседние интегриновые рецепторы, находящиеся в неактивном состоянии, в формирующиеся адгезионные структуры,

способствуя кластеризации рецепторов и образованию фокальных адгезий (Saltel et al., 2009; Goult et al., 2018).

Талин не только осуществляет связь между интегриновыми рецепторами и цитоскелетом клетки, но и участвует в проведении сигнала через другие белки, используя структурные элементы, как головного, так и палочковидного доменов (табл. 1). Так, связывание субдомена F3 головного домена талина с С-концевым участком фосфатидилинозитол-4фосфат-5киназы I типа (PIP<sub>1</sub> $\gamma$ ) в зоне гептапептидного фрагмента WVYSPLH (Di Paolo et al., 2002) обеспечивает транслокацию комплекса талина с киназой к плазматической мембране, где фермент осуществляет локальный синтез PIP<sub>2</sub> на необходимом уровне.

Связывание фрагмента PIP<sub>1</sub> $\gamma$  636–652 (PTDERSWVYSPLHYSAR) с субдоменом F3 талина происходит в зоне расположения  $\beta$ -листа, образованного тремя тяжами ( $\beta$ 5– $\beta$ 6– $\beta$ 7), и примыкающей к нему  $\alpha$ -спирали (H5) (De Pereda et al., 2005). Участок киназы 642–644 (WVY) располагается у тяжа  $\beta$ 5, создавая дополнительную структуру. Остаток Trp642 направлен в глубокий карман, образованный остатками  $\beta$ -тяжей талина: Trp377 ( $\beta$ 7), Asp369 ( $\beta$ 6) и Arg358 ( $\beta$ 5). Val643 киназы взаимодействует с Trp359 талина в гидрофобном коре  $\beta$ -структуры. На внешней стороне комплекса остаток киназы Trp644 связывается с Arg358 субдомена F3 талина. Участок киназы 645–648 (SPLH) направлен в противоположную сторону, при этом His648 взаимодействует с петлей между тяжами  $\beta$ 6 и  $\beta$ 7 талина.

Кроме того, субдомен F3 талина может взаимодействовать с С-концевым фрагментом 965–1012 нерцепторной тирозиновой киназы FAK, способствуя вовлечению FAK в фокальные контакты и ее активации (Chen et al., 1995). Вместе с тем имеются данные о том, что FAK способствует рекрутированию талина в незрелые адгезии независимо от связывания талина с интегринами во время клеточной миграции. При этом прямое взаимодействие F3 талина происходит на участке 1011–1042 тирозиновой киназы (Lawson et al., 2012).

Обнаружено прямое связывание головного домена талина в области субдоменов F2–F3 с белком цитоскелета паксиллином. Последний усиливает связывание талина с интегриновыми рецепторами и их активацию в тромбоцитах (Gao et al., 2017). Однако места связывания талина в аминокислотной последовательности паксиллина до настоящего времени не идентифицированы.

Белок TIAM1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis1), индуцирующий Т-клеточную лимфому и относящийся к регуляторам факторов обмена гуаниновых нуклеотидов, через прямое связывание с субдоменом талина F3 (остатки 305–400) участвует в регуляции динамических изменений адгезионных структур у мигрирующих клеток, определяя степень их поляризации (Wang et al., 2012).

Палочковидный домен талина может взаимодействовать с опухолевым супрессорным белком DLC1 (deleted in liver cancer1), что обеспечивает вовлечение последнего в фокальные адгезии. Установлено, что центральный участок DLC1 (остатки 448–500) связывается с пучком R8 палочковидного домена талина. Минимальный сайт связывания супрессора с талином представляет собой LD-содержащий участок 469–476 (LDDILYHV) (Li et al., 2011). Амфипатическая LD-спираль DLC1 укладывается между двумя соседними спиралями  $\alpha$ 2 и  $\alpha$ 3 на поверхности 4-спирального пучка R8 палочковидного домена талина, образуя 5-спиральный комплекс (Zacharchenko et al., 2016). Установлено, что при формировании этого комплекса конформация пучка R8 не изменяется.

Белки, содержащие анкириновые повторы KANK-1 и 2 (kidney ankyrin repeat-containing protein) и участвующие в регуляции полимеризации актина в мигрирующих клетках посредством ингибирования Rho-ГТФазной активности (Kakinuma et al., 2009), через взаимодействие с талином рекрутируются в фокальные адгезии (Bouchet et al., 2016; Sun et al., 2016).  $\alpha$ -Спираль LD-содержащего N-концевого фрагмента (остатки 30–68) KANK-1 и 2 связывается с консервативной поверхностью 5-спирального пучка R7 талина. Сайт связывания располагается в гидрофобной борозде пучка R7 талина между спиралями 29 и 36. Консервативные аминокислотные остатки Trp1630 и Trp1389 удерживают спирали в отдалении друг от друга, а Gly1404, благодаря отсутствию бокового радикала, создает пространственный карман между этими спиралями, тем самым обеспечивая формирование сайта связывания. Добавление спирали лиганда к спирализованному пучку является способом взаимодействия палочковидного домена талина без изменения степени спирализации пучков.

Талин может участвовать при определенных внешних стимулах в инвазии опухолевых клеток, регулируя процесс созревания инвадоподий. При этом активируется связывание талина с миезином (адаптерным белком, связывающим плазматическую мембрану и кортикальный актиновый цитоскелет (Ponuiwei, 2016)). Установлено, что С-концевые спирализованные пучки R11–R13 и субдомен димеризации D палочковидного домена талина связываются с N-концевым FERM-доменом миезина (Beatty et al., 2014). При этом место связывания миезина в талине перекрывается как с IBS2 (R11), так и с ABS3 (R13–D) (Hemmings et al., 1996; Gingras et al., 2008). В свою очередь, связывание талина с миезином приводит к рекрутированию в инвадоподии опухолевых клеток Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обменника (NHE-1), локального регулятора внутриклеточного pH (Beatty et al., 2014), который так же, как и талин, обеспечивает созревание инвадоподий, определяющих инвазивные характеристики клеток. Связано это с тем, что изменения значительный pH в клетке обуславливают протонирование или депротонирование боковых радикалов аминокислотных остатков во взаимодействующих белках,

регулируя тем самым степень межбелковых связей в белковых комплексах инвадоподий и, в конечном итоге, способность опухолевых клеток к метастазированию.

Наконец, палочковидный домен талина в зоне локализации пучков R7–R8 (остатки 1359–1659) может осуществлять связывание с белком промежуточных филаментов –  $\alpha$ -синеминном на С-концевом участке 1153–1464 (SNTIII), состоящем из семи тандемных повторов (по 39 аминокислот), каждый из которых включает последовательность S/T-X-R-H/Q (Sun et al., 2008; Gingras et al., 2010). Образующаяся связь обеспечивает механическую интеграцию промежуточных филаментов с актин-содержащим цитоскелетом в мышечных клетках.

На основе проведенного анализа структурной организации талина и способов взаимодействия с различными компонентами адгезионных структур и мембранных комплексов можно заключить, что головной домен талина определяет его связывание с клеточной мембраной и регулирует процессы сигнальной трансдукции, а палочковидный домен специализируется на формировании платформы для построения адгезионных структур.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя все вышеизложенное, можно выделить следующие особенности структурно-функциональной организации талина. Обращает на себя внимание разделение функциональной нагрузки между головным и палочковидным доменами молекулы талина. В головном домене сосредоточены сайты активации или связывания с различными белками: рецепторами (интегринами), ферментами (киназами, малыми ГТФазами) и их эффекторами (RIAM), структурными белками (актином) и др., а также анионными липидами клеточных мембран. Главная функция палочковидного домена состоит в трансформации физического стимула (механические силы, силы натяжения) в биохимический или физиологический ответ через активацию (демаскирование) сайтов связывания с определенными адаптерными белками (например, с молекулами винкулина), белками цитоскелета (актином) или рецепторами (интегринами).

Отмеченное распределение функций между доменами талина определяется структурной организацией талина. Пространственная локализация 4-х субдоменов (F0, F1, F2 и F3) в головном домене наилучшим образом обеспечивает доступность сайтов связывания в этих субдоменах для эффекторных молекул. Кроме того, линейное расположение субдоменов в пространстве обеспечивает энергетически выгодный способ конформационной подстройки этих субдоменов, определяющий в итоге конечный биологический эффект, например, при взаимодействии с анионными липидами или структурными

(регуляторными) белками. Следует также отметить, что компактная укладка глобулы головного домена при необходимости способствует быстрой конформационной трансформации домена, которая приводит к активации тех или иных сайтов связывания лигандов, необходимых для проведения сигнала.

Трехмерная структура палочковидного домена является эволюционным приспособлением для выполнения механико-адаптерных функций. Как отмечалось выше, в состав палочковидного домена входят спирализованные пучки, состоящие из 4-х или 5-ти  $\alpha$ -спиралей. Четырехспиральные пучки сосредоточены в N-концевой части домена (кроме R8) и сгруппированы довольно компактно, а 5-спиральные пучки локализованы в С-концевой части домена (кроме R1) и распределены линейно. Связано это с различиями в способах укладки  $\alpha$ -спиралей в пространстве у 4- и 5-спиральных пучков. Как уже отмечалось, N- и С-концевые последовательности в 4-спиральных пучках расположены на одной стороне пучка, а в 5-спиральных пучках – с противоположных сторон пучка. Именно особенностями пространственной укладки  $\alpha$ -спиралей определяется устойчивость пучка к воздействию сил натяжения, что имеет существенное значение при трансформации клеточного сигнала.

Столь заметное пространственное разграничение 4- и 5-спиральных пучков, во-первых, способствует эффективному межпучковому взаимодействию при образовании неактивной формы димера талина, а во-вторых, обеспечивает возможность под действием физических стимулов изменять степень спирализации определенных пучков. В результате указанных процессов степень доступности различным белкам сайтов связывания, которые были скрыты в спирализованных пучках неактивной формы талина, может варьировать с изменением внешних факторов. Такой тип структурной организации дает возможность регулировать не только активное (неактивное) состояние молекулы димера талина, но и уровень вовлечения других адаптерных молекул при формировании адгезионных клеточных структур.

Связывание палочковидного домена талина с другими белками может осуществляться и другим способом – без изменения степени спирализации пучков этого домена. Например, белки DLC1 и KANK связываются с палочковидным доменом талина посредством добавления дополнительной спирали. В этом случае  $\alpha$ -спираль молекулы лиганда, содержащая LD-последовательность, укладывается у одной из сторон палочковидного домена талина, формируя 5-ти или 6-спиральный комплекс по месту связывания. Таким образом, палочковидный домен талина в зависимости от структурных и функциональных характеристик молекулы лиганда может использовать тот или иной способ взаимодействия спирализованных пучков талина, изменяя или нет степень их спирализации.

В последнее время большое внимание уделяется изучению механизмов взаимодействия талина с другими соединениями на молекулярном уровне. В частности, установлено формирование в субдоменах (доменах) талина положительно заряженных платформ, которые электростатически взаимодействуют либо с анионными липидами, формирующими микродомены в клеточной мембране, либо с участками аминокислотной последовательности талина или белков-партнеров, содержащими компактные зоны из отрицательно заряженных аминокислот. Необходимо отметить, что взаимодействующие платформы заряженных аминокислотных остатков могут располагаться не только линейно в первичной структуре талина, но и концентрироваться на одной из сторон сформированных  $\alpha$ -спиральных структур молекулы. В ряде случаев имеет место формирование внутрибелковых или межбелковых гидрофобных взаимодействий, но чаще всего они действуют совместно с электростатическими связями. При этом смешанные платформы аминокислот могут быть распределены как в  $\alpha$ -спиралях, так и в  $\beta$ -структурах молекулы талина.

И, наконец, следует выделить основную особенность структурно-функциональной организации талина, которая состоит в детерминированности функций головного и палочковидного доменов. Если N-концевая часть молекулы талина (головной домен) трансформирует одни биохимические сигналы в другие, то C-концевая часть молекулы (палочковидный домен) главным образом преобразует физические стимулы в биохимические или физиологические сигналы, которые активируют или ингибируют определенный клеточный ответ, актуальный или неактуальный в данных условиях.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (№ гос. регистрации АААА-А18-118012290371-3).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не было экспериментов с участием животных или людей.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Anthi N.J., Wegener K.L., Feng Y., Kim C., Goult B.T., Lowe E.D., Vakonakis I., Bate N., Critchley D.R., Ginsberg M.H., Campbell I.D.* 2009. The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *EMBO J.* V. 28. P. 3623.

*Ascario M.J., Tajkhorshid E.* 2014. Membrane-induced structural rearrangement and identification of a novel membrane anchor in talin F2F3. *Biophys. J.* V. 107. P. 2059.

*Atherton P., Stutchbury B., Wang D.Y., Jethwa D., Tsang R., Meiler-Rodriguez E., Wang P., Bate N., Zent R., Barsukov I.L., Goult B.T., Critchley D.R., Ballestrem C.* 2015. Vinculin controls talin engagement with the actomyosin machinery. *Nat. Commun.* V. 6. P. 10038. <https://doi.org/10.1038/ncomms10038>

*Banno A., Goult B.T., Lee H., Bate N., Critchley D.R., Ginsberg M.H.* 2012. Subcellular localization of talin is regulated by inter-domain interactions. *J. Biol. Chem.* V. 287. P. 13799.

*Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D.* 2010. Integrins. *Cell Tissue Res.* V. 339. P. 269.

*Bass M.D., Patel B., Barsukov I.G., Fillingham I.J., Mason R., Smith R.J., Bagshaw C.R., Critchley D.R.* 2002. Further characterization of the interaction between the cytoskeletal proteins talin and vinculin. *Biochem. J.* V. 362. P. 761.

*Beatty B.T., Wang Y., Bravo-Cordero J.J., Sharma V.P., Miskolci V., Hodgson L., Condeelis J.* 2014. Talin regulates moesin-NHE-1 recruitment to invadopodia and promotes mammary tumor metastasis. *J. Cell Biol.* V. 205. P. 737.

*Berrier A.L., Yamada K.M.* 2007. Cell-matrix adhesion. *J. Cell Physiol.* V. 213. P. 565.

*Bouaouina M., Lad Y., Calderwood D.A.* 2008. The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate  $\beta_1$  and  $\beta_3$  integrins. *J. Biol. Chem.* V. 283. P. 6118.

*Bouchet B.P., Gough R.E., Ammon Y.C., van der Willige D., Post H., Jacquemet G., Altelaar A.F.M., Heck A.J.R., Goult B.T., Akhmanova A.* 2016. Talin-KANK1 interaction controls the recruitment of cortical microtubule stabilizing complexes to focal adhesions. *eLIFE.* V. 5. e18124. <https://doi.org/10.7554/eLife.18124>

*Bunch T.A.* 2010. Integrin  $\alpha_5\beta_3$  activation in Chinese hamster ovary cells and platelets increases clustering rather than affinity. *J. Biol. Chem.* V. 285. P. 1841.

*Calderwood D.A.* 2004. Talin controls integrin activation. *Biochem. Soc. Trans.* V. 32. P. 434.

*Calderwood D.A., Yan B., de Pereda J.M., Garcia-Alvarez B., Fujioka Y., Liddington R.C., Ginsberg M.H.* 2002. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J. Biol. Chem.* V. 277. P. 21749.

*Campbell I.D., Humphries M.J.* 2011. Integrin structure, activation and interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 3. a004994. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004994>

*Chang Y.C., Zhang H., Franco-Barraza J., Brennan M.L., Patel T., Cukierman E., Wu J.* 2014. Structural and mechanistic insights into the recruitment of talin by RIAM in integrin signaling. *Structure.* V. 22. P. 1810.

*Changede R., Xu X., Margadant F., Sheetz M.P.* 2015. Nascent integrin adhesions form on all matrix rigidities after integrin activation. *Dev. Cell.* V. 35. P. 614.

*Chen H.C., Appeddu P.A., Parsons J.T., Hildebrand J.D., Schaller M.D., Guan J.L.* 1995. Interaction of focal adhe-

- sion kinase with cytoskeletal protein talin. *J. Biol. Chem.* V. 270. P. 16995.
- Chinthalapudi K., Rangarajan E.S., Izard T.* 2018. The interaction of talin with the cell membrane is essential for integrin activation and focal adhesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 115. P. 10339.
- Ciobanasiu C., Wang H., Henriot V., Mathieu C., Fente A., Csillag S., Vigouroux C., Faivre B., Clainche C.* 2018. Integrin-bound talin head inhibits actin filament barbed-end elongation. *J. Biol. Chem.* V. 293. P. 2586.
- Critchley D.R., Gingras A.R.* 2008. Talin at a glance. *J. Cell Sci.* V. 121. P. 1345.
- Das M., Ithychanda S.S., Qin J., Plow E.F.* 2014. Mechanisms of talin-dependent integrin signaling and crosstalk. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1838. P. 579.
- Dedden D., Schumacher S., Kelley C.F., Zacharias M., Bieriümpfel C., Fässler R., Mizuno N.* 2019. The architecture of talin1 reveals an autoinhibition mechanism. *Cell.* V. 179. P. 120.
- De Pereda J.M., Wegener K.L., Santelli E., Bate N., Ginsberg M.H., Critchley D.R., Campbell I.D., Liddington R.C.* 2005. Structural basis for phosphatidylinositol phosphate kinase type I $\gamma$  binding to talin at focal adhesions. *J. Biol. Chem.* V. 280. P. 8381.
- del Rio A., Perez-Jimenez R., Liu R., Roca-Cusachs P., Fernandez J.M., Sheetz M.P.* 2009. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science.* V. 323. P. 638.
- Di Paolo G., Pellegrini L., Letinje K., Cestra G., Zoncu R., Voronov S., Chang S., Guo J., Wenk M.R., De Camilli P.* 2002. Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type I $\gamma$  by the FERM domain of talin. *Nature.* V. 420. P. 85.
- Elliott P.R., Goult B.T., Kopp P.M., Bate N., Grossmann J.G., Roberts G.C.K., Critchley D.R., Barsukov I.L.* 2010. The structure of the talin head reveals a novel extended conformation of the FERM domain. *Structure.* V. 18. P. 1289.
- Gao J., Huang M., Lai J., Mao K., Sun P., Cao Z., Hu Y., Zhang Y., Schulte M.L., Jin C., Wang J., White G.C., Xu Z., Ma Y.Q.* 2017. Kindlin supports platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation by interacting with paxillin. *J. Cell Sci.* V. 130. P. 3764.
- Garcia-Alvarez B., de Pereda J.M., Calderwood D.A., Ulmer T.S., Critchley D.R., Campbell I.D., Ginsberg M.H., Liddington R.C.* 2003. Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol. Cell.* V. 11. P. 49.
- Gingras A.R., Bate N., Goult B.T., Hazelwood L., Canestrelli I., Grossmann I.G., Liu H., Putz N.S.M., Roberts G.C.K., Volkmann N., Hanein D., Barsukov I.L., Critchley D.R.* 2008. The structure of the C-terminal actin-binding domain of talin. *EMBO J.* V. 27. P. 458.
- Gingras A.R., Bate N., Goult B.T., Patel B., Kopp P.M., Emsley J., Barsukov I.L., Roberts G.C.K., Critchley D.R.* 2010. Central region of talin has a unique fold that binds vinculin and actin. *J. Biol. Chem.* V. 285. P. 29577.
- Gingras A.R., Wolfgang H.Z., Bobkov A.A., Joyce M.G., Fasci D., Himmel M., Rothmund S., Ritter A., Grossmann J.G., Patel B., Bate N., Goult B.T., Emsley J., Barsukov I.L., Roberts G.C.K., Liddington R.C., Ginsberg M.H., Critchley D.R.* 2009. Structural determinants of integrin binding to the talin rod. *J. Biol. Chem.* V. 284. P. 8866.
- Gingras A.R., Ziegler W.H., Frank R., Barsukov I.L., Roberts G.C.K., Critchley D.R., Emsley J.* 2005. Mapping and consensus sequence identification for multiple vinculin binding sites within the talin rod. *J. Biol. Chem.* V. 280. P. 37217.
- Goksoy E., Ma Y.Q., Wang X., Kong X., Perera D., Plow E.F., Qin J.* 2008. Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation. *Mol. Cell.* V. 31. P. 124.
- Gough R.E., Goult B.T.* 2018. The tail of two talins – two isoforms to fine-tune integrin signalling. *FEBS Lett.* V. 592. P. 2108.
- Goult B.T., Bate N., Anthis N.J., Wegener K.L., Gingras A.R., Patel B., Barsukov I.L., Campbell I.D., Roberts G.C.K., Critchley D.R.* 2009. The structure of an interdomain complex that regulates talin activity. *J. Biol. Chem.* V. 284. P. 15097.
- Goult B.T., Bouaouina M., Elliott P.R., Bate N., Patel B., Gingras A.R., Grossmann J.G., Roberts G.C.K., Calderwood D.A., Critchley D.R., Barsukov I.L.* 2010. Structure of a double ubiquitin-like domain in the talin head: a role in integrin activation. *EMBO J.* V. 29. P. 1069.
- Goult B.T., Xu X.P., Gingras A.R., Swift M., Patel B., Bate N., Kopp P.M., Barsukov I.L., Critchley D.R., Volkmann N., Hanein D.* 2013a. Structural studies on full-length talin1 reveal a compact auto-inhibited dimer: implications for talin activation. *J. Struct. Biol.* V. 184. P. 21.
- Goult B.T., Yan J., Schwartz M.A.* 2018. Talin as a mechanosensitive signaling hub. *J. Cell Biol.* V. 217. P. 3276.
- Goult B.T., Zacharchenko T., Bate N., Tsang R., Hey F., Gingras A.R., Elliott P.R., Roberts G.C.K., Ballestream C., Critchley D.R., Barsukov I.L.* 2013b. RIAM and vinculin binding to talin are mutually exclusive and regulate adhesion assembly and turnover. *J. Biol. Chem.* V. 288. P. 8238.
- Han J., Lim C.J., Watanabe N., Soriani A., Ratnikov B., Calderwood D.A., Puzon-McLaughlin W., Lafuente E.M., Boussiotis V.A., Shattil S.J., Ginsberg M.H.* 2006. Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Curr. Biol.* V. 16. P. 1796.
- Hemmings L., Rees D.J.G., Ohanian V., Bolton S.J., Gilmore A.P., Patel B., Priddle H., Trevithick J.E., Hynes R.O., Critchley D.R.* 1996. Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding sites. *J. Cell Sci.* V. 109. P. 2715.
- Hu X., Jing C., Xu X., Nakasawa N., Cornish V.W., Margadant F.M., Sheetz M.P.* 2016. Cooperative vinculin binding to talin mapped by time-resolved super resolution microscopy. *Nano Lett.* V. 16. P. 4062.
- Humphries J.D., Wang P., Streuli C., Geiger B., Humphries M.J., Ballestream C.* 2007. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.* V. 179. P. 1043.
- Hytönen V.P., Vogel V.* 2008. How force might activate talin's vinculin binding sites: SMD reveals a structural mechanism. *PLoS Comput. Biol.* V. 4. e24. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0040024>

- Kakinuma N., Zhu Y., Wang Y., Roy B.C., Kiyama R.* 2009. Kank proteins: structure, functions and diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 66. P. 2651.
- Kalli A.C., Campbell I.D., Sansom M.S.P.* 2013. Conformational changes in talin on binding to anionic phospholipid membranes facilitate signaling by integrin transmembrane helices. *PLoS Comput. Biol.* V. 9. a1003316. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003316>
- Kim C., Ye F., Hu X., Ginsberg M.H.* 2012. Talin activates integrin by altering the topology of the  $\beta$  transmembrane domain. *J. Cell Biol.* V. 187. P. 605.
- Klapholz B., Brown N.H.* 2017. Talin — the master of integrin adhesions. *J. Cell Sci.* V. 130. P. 2435.
- Kopp P.M., Bate N., Hansen T.M., Brindle N.P.J., Praekelt U., Debrand E., Coleman S., Mazzeo D., Goult B.T., Gingras A.R., Pritchard C.A., Critchley D.R., Monkley S.J.* 2010. Studies on the morphology and spreading of human endothelial cells define key inter- and intramolecular interactions for talin1. *Eur. J. Cell Biol.* V. 89. P. 661.
- Kumar A., Ouyang M., van den Dries K., McGhee E.J., Tanaka K., Anderson M.D., Groisman A., Goult B.T., Anderson K.I., Schwartz M.A.* 2016. Talin tension sensor reveals novel features of focal adhesion force transmission and mechanosensitivity. *J. Cell Biol.* V. 213. P. 371.
- Lau T.L., Kim C., Ginsberg M.H., Ulmer T.S.* 2009. The structure of the integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *EMBO J.* V. 28. P. 1351.
- Lawson C., Lim S.T., Uryu S., Chen X.L., Calderwood D.A., Schlaepfer D.D.* 2012. FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *J. Cell Biol.* V. 196. P. 223.
- Lee H.S., Bellin R.M., Walker D.L., Patel B., Powers P., Liu H., Garcia-Alvarez B., de Pereda J.M., Liddington R.C., Volkmann N., Hanein D., Critchley D.R., Robson R.M.* 2004. Characterization of an actin-binding site within the talin FERM domain. *J. Mol. Biol.* V. 343. P. 771.
- Lee H.S., Lim C.J., Puzon-McLaughlin W., Shattil S.J., Ginsberg M.H.* 2009. RIAM activates integrins by linking talin to Ras GTPase membrane-targeting sequences. *J. Biol. Chem.* V. 284. P. 5119.
- Lee S.E., Kamm R.D., Mofrad M.R.* 2007. Force-induced activation of talin and its possible role in focal adhesion mechanotransduction. *J. Biomech.* V. 40. P. 2096.
- Legate K.R., Fässler R.* 2009. Mechanisms that regulate adaptor binding to  $\beta$ -integrin cytoplasmic tails. *J. Cell Sci.* V. 122. P. 187.
- Li G., Du X., Vass W.C., Papageorge A.G., Lowy D.R., Qian X.* 2011. Full activity of the deleted in liver cancer 1 (DLC1) tumor suppressor depends on an LD-like motif that binds talin and focal adhesion kinase (FAK). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 108. P. 17129.
- Luo B.H., Springer T.A., Takagi J.* 2004. A specific interface between integrin transmembrane helices and affinity for ligand. *PLoS Biol.* V. 2. e153. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020153>
- Margadant F., Chew L.L., Hu X., Yu H., Bate N., Zhang X., Sheetz M.* 2011. Mechanotransduction in vivo by repeated talin stretch-relaxation events depends upon vinculin. *PLoS Biol.* V. 9. e1001223. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001223>
- McCann R.O., Craig S.W.* 1997. The I/LWEQ module: a conserved sequence that signifies F-actin binding in functionally diverse proteins from yeast to mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 94. P. 5679.
- Mehrbod M., Trisno S., Mofrad M.R.K.* 2013. On the activation of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: outside-in and inside-out pathways. *Biophys. J.* V. 105. P. 1304.
- Moes M., Rodius S., Coleman S.J., Monkley S.J., Goormaghtigh E., Tremuth L., Kox C., van der Holst P.P., Critchley D.R., Kieffer N.* 2007. The integrin binding site2 (IBS2) in the talin rod domain is essential for linking integrin beta subunits to the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* V. 282. P. 17280.
- Morse E.M., Brahme N.N., Calderwood D.A.* 2014. Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry.* V. 53. P. 810.
- Pan L., Zhao Y., Yuan Z., Qin G.* 2016. Research advances on structure and biological functions of integrins. *Springer-Plus.* V. 5. 1094. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2502-0>
- Papagrigoriou E., Gingras A.R., Barsukov I.L., Bate N., Fillingham I.J., Patel B., Frank R., Ziegler W.H., Roberts G.C.K., Critchley D.R., Emsley J.* 2004. Activation of a vinculin-binding site in the talin rod involves rearrangement of a five-helix bundle. *EMBO J.* V. 23. P. 2942.
- Patel B., Gingras A.R., Bobkov A.A., Fujimoto L.M., Zhang M., Liddington R.C., Mazzeo D., Emsley J., Roberts G.C.K., Barsukov I.L., Critchley D.R.* 2006. The activity of the vinculin binding sites in talin is influenced by the stability of the helical bundles that make up the talin rod. *J. Biol. Chem.* V. 281. P. 7458.
- Ponuwai G.A.* 2016. A glimpse of the ERM proteins. *J. Biomed. Sci.* V. 23. 35. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0246-3>
- Rahikainen R., Öhman T., Turkki P., Varjosalo M., Hytönen V.P.* 2019. Talin-mediated force transmission and talin rod domain unfolding independently regulate adhesion signaling. *J. Cell Sci.* V. 132. jcs226514. <https://doi.org/10.1242/jcs.226514>
- Roberts G.C.K., Critchley D.R.* 2009. Structural and biophysical properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Biophys. Rev.* V. 1. P. 61.
- Rodius S., Chaloin O., Moes M., Schaffner-Reckinger E., Landrieu I., Lippens G., Lin M., Zhang J., Kieffer N.* 2008. The talin rod IBS2  $\alpha$ -helix interacts with the  $\beta$ 3 integrin cytoplasmic tail membrane-proximal helix by establishing charge complementary salt bridges. *J. Biol. Chem.* V. 283. P. 24212.
- Saltel F., Mortier E., Hytönen V.P., Jacquier M.C., Zimmerman P., Vogel V., Liu W., Wehrle-Heller B.* 2009. New PI(4,5)P<sub>2</sub>- and membrane proximal integrin-binding motifs in the talin head control  $\beta$ 3-integrin clustering. *J. Cell Biol.* V. 187. P. 715.
- Schiemer J., Bohm A., Lin L., Merrill-Skoloff G., Flaumenhaft R., Huang J.S., Le Breton G.C., Chishti A.H.* 2016. G $\alpha$ <sub>13</sub> switch region 2 relieves talin autoinhibition to activate  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin. *J. Biol. Chem.* V. 291. P. 26598.

- Shattil S.J., Kim C., Ginsberg M.H.* 2010. The final steps of integrin activations: the end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 11. P. 288.
- Song X., Yang J., Hirbawi J., Ye S., Perera H.D., Goksoy E., Dwivedi P., Plow E.F., Zhang R., Qin J.* 2012. A novel membrane-dependent on/off switch mechanism talin FERM domain at sites of cell adhesion. *Cell Res.* V. 22. P. 1533.
- Sun N., Critchley D.R., Paulin D., Li Z., Robson R.M.* 2008. Identification of a repeated domain within mammalian  $\alpha$ -synemin that interacts directly with talin. *Exp. Cell Res.* V. 314. P. 1839.
- Sun Z., Tseng H.Y., Tan S., Senger F., Kursawa L., Dedden D., Mizuno N., Wasik A.A., Thery M., Dunn A.R., Fässler R.* 2016. Kank2 activates talin, reduces force transduction across integrins and induces central adhesion formation. *Nat. Cell Biol.* V. 18. P. 941.
- Takada Y., Ye X., Simon S.* 2007. The integrins. *Genome Biol.* V. 8. P. 215.1.
- Theocharis A.D., Skandalis S.S., Gialeli C., Karamanos N.K.* 2016. Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Delivery Rev.* V. 97. P. 4.
- Tremuth L., Kreis S., Melchior C., Hoebcke J., Rondé P., Plancon S., Takeda K., Kieffer N.* 2004. A fluorescence cell biology approach to map the second integrin-binding site of talin to a 130-amino acid sequence within the rod domain. *J. Biol. Chem.* V. 279. P. 22258.
- Vinogradova O., Velyvis A., Velyviene A., Hu B., Haas T.A., Plow E.F., Qin J.* 2002. A structural mechanism of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 “inside-out” activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell.* V. 110. P. 587.
- Wang S., Watanabe T., Matsuzawa K., Katsumi A., Kakeno M., Matsui T., Ye F., Sato K., Murase K., Sugiyama I., Kimura K., Mizoguchi A., Ginsberg M.H., Collard J.G., Kaibuchi K.* 2012. Tiam 1 interaction with the PAR complex promotes talin-mediated Rac1 activation during polarized cell migration. *J. Cell Biol.* V. 199. P. 331.
- Wang Y., Yan J., Goult B.T.* 2019. Force-dependent binding constants. *Biochemistry.* V. 58. P. 4696.
- Wegener K.L., Partridge A.W., Han J., Pickford A.R., Liddington R.C., Ginsberg M.H., Campbell I.D.* 2007. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell.* V. 128. P. 171.
- Wolfenson H., Lavelin I., Geiger B.* 2013. Dynamic regulation of the structure and functions of integrin adhesions. *Dev. Cell.* V. 24. P. 447.
- Xing B., Jedsadayamata A., Lams S.C.T.* 2001. Localization of an integrin binding site to the C terminus of talin. *J. Biol. Chem.* V. 276. P. 44373.
- Yan J., Yao M., Goult B.T., Sheetz M.P.* 2015. Talin dependent mechanosensitivity of cell focal adhesions. *Cell. Mol. Bioeng.* V. 8. P. 151.
- Yang J., Zhu L., Zhang H., Hirbawi J., Fukuda K., Dwivedi P., Liu J., Byzova T., Plow E.F., Wu J., Qin J.* 2014. Conformational activation of talin by RIAM triggers integrin-mediated cell adhesion. *Nat. Commun.* V. 5. P. 5880. <https://doi.org/10.1038/ncomms6880>
- Yao M., Goult B.T., Chen H., Cong P., Sheetz M.P., Yan J.* 2014. Mechanical activation of vinculin binding to talin locks talin in an unfolded conformation. *Sci. Rep.* V. 4. P. 4610. <https://doi.org/10.1038/srep04610>
- Yao M., Goult B.T., Klapholz B., Hu X., Toseland C.P., Guo Y., Cong P., Sheetz M.P., Yan J.* 2016. The mechanical response of talin. *Nat. Commun.* V. 7. P. 11966. <https://doi.org/10.1038/ncomms11966>
- Ye X., McLean M.A., Sligar S.G.* 2016. Conformational equilibrium of talin is regulated by anionic lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1858. P. 1833.
- Zacharchenko T., Qian X., Goult B.T., Jethwa D., Almeida T.B., Ballestrem C., Critchley D.R., Lowy D.R., Barsukov I.L.* 2016. LD motif recognition by talin: structure of the talin-DLC1 complex. *Structure.* V. 24. P. 1130.
- Zaidel-Bar R., Itzkovitz S., Ma'ayan A., Iyengar R., Geiger B.* 2007. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat. Cell Biol.* V. 9. P. 858.
- Zhang H., Chang Y.C., Huang Q., Brennan M.L., Wu J.* 2016. Structural and functional analysis of a talin triple-domain module suggests an alternative talin autoinhibitory configuration. *Structure.* V. 24. P. 721.
- Zhu L., Yang J., Bromberger T., Holly A., Lu F., Liu H., Sun K., Klapproth S., Hirbawi J., Byzova T.V., Plow E.F., Moser M., Qin J.* 2017. Structure of Rap1b bound to talin reveals a pathway for triggering integrin activation. *Nat. Commun.* V. 8. P. 1744. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01822-8>

## Talin: Structural-Functional Relationships

V. P. Ivanova\*

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS, St. Petersburg, 194223 Russia*

\*e-mail: valet@iephb.ru

The extracellular matrix (ECM) ligands are linked to cytoskeleton by integrin receptors. After integrin binding to the ECM talin molecules are recruited into forming cell adhesion structures. As a result, talin can both regulate integrin activity and connect these receptors to actin cytoskeleton. Talin is an adaptor protein which consists of a head domain being atypical FERM-domain, and a rod domain composed of the 4- or 5-helical bundles. Peculiarities of  $\alpha$ -helices packing in bundles determinate their resistance to the tension forces exertion and ability to stretching of talin subdomains. In this review our attention is focused on the revelation of relationships between the structural organization of talin domains and the function distribution between the head and rod domains. Spatial orientation of subdomains (F0, F1, F2, F3) in the head domain maintains the accessibility of binding sites for effector molecules in these subdomains and rapid structural changes in the head domain during the talin activation. Linear configuration

of helical bundles (R1-R13) in the rod domain with predominance of 4-helical bundles in the N-terminal part and 5-helical bundles in its C-terminus determines 1) effective interbundle interactions during the formation of inactive (autoinhibited) dimer form of talin; 2) possibility of alteration in spiralization level of  $\alpha$ -helical rod subdomains under physical stimuli effects. This alteration leads to force-regulated exposure of protein interaction sites to be masked in helical bundles of the talin rod domain. It signifies that the N-terminal part of talin (the head domain) transforms some biochemical signals into others but the C-terminal part of talin (the rod domain) converts physical stimuli into biochemical and physiological signals regulating cell response. Some peculiarities of interactions between talin and different compounds at the molecular level are also discussed.

**Keywords:** talin domains and subdomains, autoinhibition and activation of talin, integrins, cell adhesion

УДК 577.151.6

## ЛИПИНЫ: ХАРАКТЕРИСТИКА И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ В ОРГАНИЗМЕ

© 2021 г. С. С. Сайдакова<sup>1, 2, \*</sup>, К. Н. Морозова<sup>1, 2</sup>, Е. В. Киселёва<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра цитологии и генетики Новосибирского государственного университета, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

\*E-mail: [custodian.of.midnight@gmail.com](mailto:custodian.of.midnight@gmail.com)

Поступила в редакцию 17.09.2020 г.

После доработки 12.10.2020 г.

Принята к публикации 12.10.2020 г.

Семейство липинов объединяет ферменты-участники пути биосинтеза фосфолипидов (пути Кеннеди), дефосфолирирующие фосфатидную кислоту до диацилглицерина. Помимо этого, липины способны транспортироваться из цитоплазмы в ядро и функционировать в нем в качестве коактиваторов экспрессии генов. Такая дуальная функция обосновывает высокий интерес к изучению этих белков. Настоящий обзор суммирует последние данные, полученные исследователями в этой области, и дает общее представление о структуре, функциях и механизмах регуляции различных ортологов и изоформ липина в тканях и организмов эукариот. Отдельный раздел посвящен заболеваниям человека, вызываемым избытком или недостатком липина.

**Ключевые слова:** липин, липиды, фосфатидат-фосфатаза, мыши с мутацией *fld*, липодистрофия, транскрипционный кофактор

DOI: 10.31857/S0041377121010090

Липин относится к классу фосфогидролаз и представляет собой Mg<sup>2+</sup>-зависимый фермент, катализирующий дефосфорилирование фосфатидной кислоты до диацилглицерина и неорганического фосфата. Этому белку в настоящее время уделяется большое внимание, так как он входит в число белков мембран эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Этот компартмент не только является “кровеносной” системой клетки, по которой перемещаются синтезируемые белки, но и обеспечивает запасом фосфолипидов все внутриклеточные мембранные органеллы. Липин катализирует реакцию, занимающую важное место в пути Кеннеди – синтезе триацилглицеринов из глицеро-3-фосфатов. Эта функция неотъемлемо связана с регуляцией динамики внутриклеточных мембран. Кроме того, в ядре липин выступает в роли транскрипционного фактора, изменяя экспрессию генов, участвующих в окислении жирных кислот и митохондриальном метаболизме. Такая двойственная функция делает липин уникальным белком, без корректной работы которого невозможно функцио-

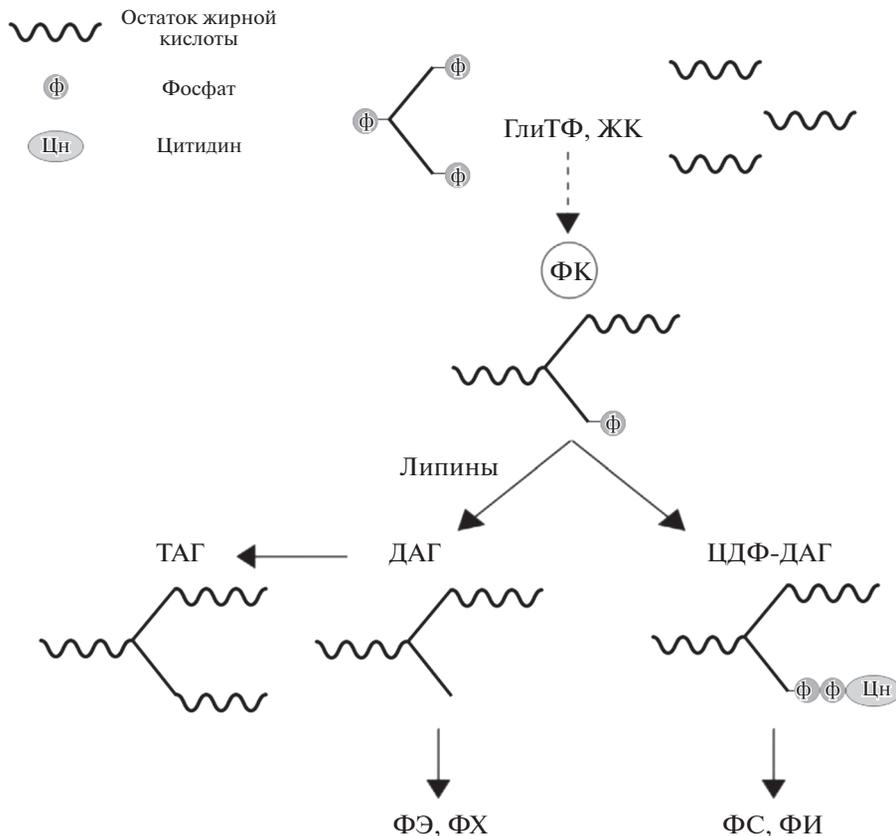
нирование клеток, в частности, адипоцитов и гепатоцитов, так как они специализируются на синтезе и запасании жиров. Показано, что нарушение экспрессии гена, кодирующего этот белок, вызывает задержки в развитии у насекомых и повышение риска возникновения хронических заболеваний у млекопитающих. Дефицит липина у человека может лежать в основе таких болезней как атеросклероз, колит, раковые опухоли, рабдомиолиз или алкогольное заболевание печени.

Настоящий обзор ставит целью не только дать общее представление о липинах как белках-участниках липидного метаболизма, но и собрать новейшие данные о его строении, функциях и связи с заболеваниями млекопитающих, в частности, человека. Прогресс в изучении роли этого белка в организме и механизмов его взаимодействия с другими внутриклеточными системами имеет большое значение для решения фундаментальных и практических задач современной медицины.

### БИОСИНТЕЗ ЛИПИДОВ И ОТКРЫТИЕ ЛИПИНА

Липиды – незаменимый класс органических соединений в клетке, которые вследствие наличия в их составе полярных групп и длинных цепей углеводородной структуры (остатков жирных кислот) обла-

**Принятые сокращения:** ГлиТФ – глицеринтрифосфат; ДАГ – диацилглицерин; ЖК – жирные кислоты; ЛОНП – липопротеины очень низкой плотности; ТАГ – триацилглицерин; ФК – фосфатидная кислота; ФХ – фосфатидилхолин; ФЭ – фосфатидилэтаноламин; ФЭ/Х/С/И – фосфатидилэтаноламин/холин/серин/инозитол; ЦДФ – цитидиндифосфат; NES – сигнал ядерного экспорта; TLR – Toll-подобные рецепторы.



**Рис. 1.** Упрощенная схема пути биосинтеза липидов (путь Кеннеди). Липины катализируют реакцию дефосфорилирования фосфатидной кислоты (ФК) в диацилглицерин (ДАГ). ГлиТФ – глицеринтрифосфат, ЖК – жирные кислоты, ТАГ – триацилглицерин, ФЭ/Х/С/И – фосфатидилэтаноламин/холин/серин/инозитол, ЦДФ – цитидиндифосфат.

дают уникальным свойством – амфипатичностью, то есть одна часть молекулы гидрофильна, другая – гидрофобна. Это свойство определяет основные функции липидов. Все мембраны клеток, ядер и органоидов построены из бислоя фосфолипидов с различными полярными группами. Триацилглицерин выполняет запасующую функцию, образуя жировые капли, и в дальнейшем может использоваться для получения энергии и воды. Кроме того, из липидов синтезируются гормоны, витамины и сигнальные молекулы, без которых нарушается метаболизм и регуляция физиологических функций живых организмов.

Общий путь биосинтеза фосфолипидов консервативен от дрожжей до млекопитающих (рис. 1). Он был назван в честь Юджина Кеннеди, который вместе с коллегами в 1950-х годах объединил два известных в то время пути синтеза фосфатидной кислоты (ФК) из глицерина и фосфолипидов из диацилглицерина (ДАГ) в единую схему, предположив существование ферментов, обладающих фосфатазной активностью по отношению к ФК (Harris, Finck, 2011). Это соединение занимает центральное место в пути

Кеннеди и служит предшественником всех фосфолипидов в клетке.

Преобразования ФК могут пойти по двум основным путям. По одному пути ФК превращается в цитидиндифосфат-ДАГ (ЦДФ-ДАГ), который дает фосфатидилинозитол (ФИ) (Harris, Finck, 2011; Siniosoglou, 2013; Chen Y. et al., 2015). Клетки дрожжей способны синтезировать фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтаноламин (ФЭ) и фосфатидилхолин (ФХ) через ЦДФ-ДАГ (Harris, Finck, 2011; Siniosoglou, 2013). Другой путь начинается с предсказанной Кеннеди реакции: ФК дефосфорилируется до ДАГ, который затем используется для синтеза наиболее распространенных фосфолипидов – ФЭ и ФХ в присутствии этаноламина и холина соответственно. В гепатоцитах млекопитающих возможно также получение ФХ путем метилирования ФЭ (Siniosoglou, 2013). ЭПР является основным компартментом, ответственным за производство структурных фосфолипидов, которые затем перераспределяются для образования других мембранных органелл везикулярным и невезикулярным путями. Кроме того, присоединение к ДАГ еще одного остатка жирной

кислоты приводит к получению триацилглицерина (ТАГ), накапливающегося в липидных включениях (Siniossoglou, 2013).

В 1989 г. Лангнер с соавторами описали мышей с мутацией *fld* (fatty liver dystrophy), которая проявляется в уменьшении размеров тела в совокупности с замедлением темпов роста, липодистрофией, гипертриглицеридемией, инсулинорезистентностью, периферической невропатией, сниженной выживаемостью и практической стерильностью (Langner et al., 1989). Эту мутацию можно идентифицировать сразу же после рождения, поскольку у новорожденных *fld*-мышат (до 28 сут) наблюдается гипертрофированная печень, имеющая характерную бледность (Langner et al., 1989). В 2001 г. лабораторией Петерфай методом позиционного клонирования был установлен ген, мутация которого вызывает такой фенотип и является причиной липодистрофии мышей (Peterfy et al., 2001). Этому гену присвоили название *lipin 1*. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, являющихся основной удобной моделью для исследования функции белков-липинов, ортолог этого гена носит название *Pah 1p* (также известный как *Smp2*) (Han et al., 2006). Активное изучение свойств и функции фосфатидат-фосфатазной активности в дрожжевых лизатах велось еще с 1989 г. (Lin, Carman, 1989), однако принадлежность выделенного белка к липинам была установлена позже (Han et al., 2006).

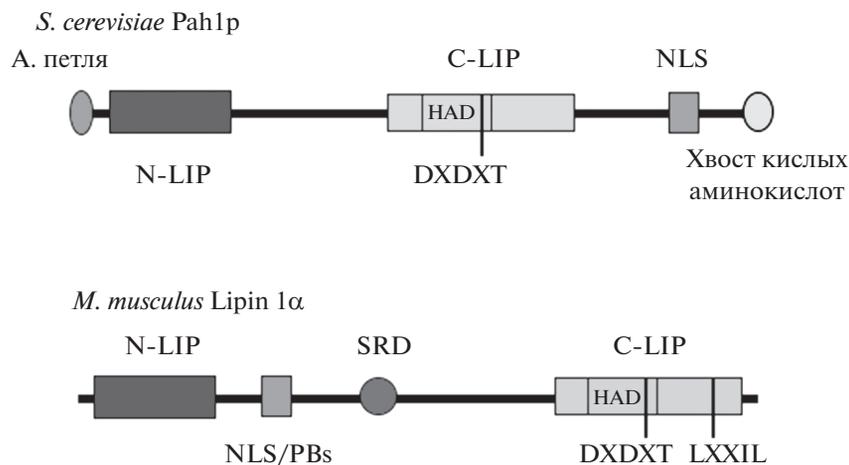
Белки семейства липинов катализируют  $Mg^{2+}$ -зависимое дефосфорилирование ФК в ДАГ, который затем может быть использован для производства фосфолипидов по пути Кеннеди (рис. 1) (Harris, Finck, 2011; Siniossoglou, 2013; Chen et al., 2015). Активность этих ферментов строго специфична для ФК, липины не могут дефосфорилировать другие фосфолипиды, например, такие, как лизоФК, керамид-1-фосфат или сфингозин-1-фосфат (Chen et al., 2015). Эта специфичность, вероятно, обусловлена взаимодействием с полярным глицериновым скелетом, о чем свидетельствует конформация активного сайта фермента (Khayuo et al., 2020). Поскольку ФК также используется для синтеза фосфолипидов через ЦДФ-ДАГ, регуляция активности липина влияет на распределение потока ФК между этими двумя путями. Липиновые белки обычно присутствуют в свободной форме в цитозоле и в ответ на повышение концентрации жирных кислот могут прикрепляться к мембранам ЭПР, содержащим субстрат для этих ферментов – ФК (Chen et al., 2015). Кроме того, наличие последовательности внутриядерной локализации в составе белка свидетельствует о том, что липины присутствуют и в ядре (Chen et al., 2015).

## ОРТОЛОГИ И ИЗОФОРМЫ ЛИПИНА

Гены липинов консервативны от дрожжей до млекопитающих. У дрожжей и большинства беспозвоночных имеется только один ортолог липина, в то время как у растений, рыб и многих червей (за исключением *C. elegans*) были обнаружены два ортолога, а у большинства позвоночных – три (липиды 1, 2 и 3) (Chen et al., 2015). Кроме того, Петерфай и соавторы показали, что у мышей существуют две изоформы липина 1, обозначаемые как липины 1 $\alpha$  и 1 $\beta$ , которые образуются в результате альтернативного сплайсинга, отличаются по своим временным паттернам экспрессии и субклеточной локализации, и имеют комплементарные функции (Peterfy et al., 2001).

Липин 1 $\alpha$  в основном образуется в преадипоцитах и функционирует на ранних стадиях их дифференцировки, тогда как липин 1 $\beta$  преобладает в зрелых адипоцитах и индуцирует экспрессию липогенных генов и накопление липидов. Липин 1 человека имеет три изоформы (1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1 $\gamma$ ), получающиеся путем альтернативного сплайсинга мРНК. Недавние исследования показали, что липин 1 $\gamma$  локализуется в липидных каплях и изменяет морфологию липидных капель, не влияя на уровень триацилглицерина (Chen et al., 2015). Ген, кодирующий липин 1 $\gamma$ , активно экспрессируется в мозге человека; напротив, синтез липинов 1 $\alpha$  и 1 $\beta$  в головном мозге очень низок. Это говорит о том, что липин 1 $\gamma$  может быть специализированным регуляторным белком в метаболизме липидов мозга. Ортологи липина 2 и 3 имеют 49 и 46% сходства аминокислотной последовательности с липином 1 (Siniossoglou, 2013). Фосфатидат-фосфатазная активность липина 1 $\beta$  выше, чем у липина 1 $\alpha$ ; липин 1 $\gamma$  обладает низкой активностью, но большей аффинностью к ФК. Ортолог липина 1 несколько более активен, чем липин 2, в то время как липин 3 обладает более низкой относительной активностью (Donkor et al., 2007; Han, Carman, 2010). Все три ортолога демонстрируют  $Mg^{2+}$ -зависимую активность (Donkor et al., 2007).

Все три липина имеют различную концентрацию в тканях млекопитающих и, по-видимому, выполняют специфические физиологические функции. Липин 1 активно синтезируется в скелетных мышцах, жировой ткани и яичках, но слабо представлен во многих других тканях, в том числе печени, почках, мозге, сердце и легких. Несмотря на примерно одинаковый уровень экспрессии гена в скелетной мускулатуре и жировой ткани, липин 1 оказывает совершенно разное влияние на чувствительность к инсулину и уровень глюкозы в этих тканях (Chen et al., 2015). Липин 2 синтезируется преимущественно в печени и мозге, а также в почках и легких. Жировая ткань людей богата липином 2, в отличие от жировой



**Рис. 2.** Первичная структура ортологов липина у дрожжей *S. cerevisiae* (Pah1p) и мыши *M. musculus* (липин 1α). N-LIP и C-LIP – N- и C-концевые консервативные домены соответственно. Липин дрожжей имеет на N-конце амфипатическую петлю, которая позволяет закоривать липин в мембране. На C-конце имеется последовательность кислых аминокислот, предположительно отвечающая за поддержание баланса в содержании липина в цитозоле и ядре; NLS – сигнал ядерной локализации, который у мышей представляет собой последовательность основных аминокислот (PBs) с двойной функцией – связывание ФК и транспорт в ядро. SRD – серин-богатый домен, опосредующий взаимодействие с белком 14-3-3 и необходимый для накопления липина в цитоплазме; DXDXXT – каталитический центр фермента дефосфорилазы (HAD-домен); LXXIL – мотив, обеспечивающий взаимодействие с ядерными рецепторами.

вой ткани мышей (Donkor et al., 2007). Интересно, что уровень липина 2 в печени несколько выше у мышей с липодистрофией, вызываемой дисфункцией липина 1. Кроме того, у взрослых *fld*-мышей в этой ткани не наблюдается изменения уровня фосфатидат-фосфатазной активности, необходимой для образования ТАГ.

Синтез липина 3 у *fld*-мышей почти в 4 раза превышает таковую у мышей дикого типа. Это позволяет предположить, что липины 2 и 3 могут частично компенсировать дисфункцию липина 1 (Chen et al., 2015). Тем не менее, при рассмотрении функций липина в иммунном ответе, оказывается, что липин 1 и 2 выступают в роли антагонистов: первый оказывает провоспалительное, второй – противовоспалительное действие (Valboa et al., 2019). Липин 3 синтезируется на низком уровне в большинстве тканей; однако его содержание увеличено в печени у свиней, а также кишечнике людей и мышей (Donkor et al., 2007). В нескольких исследованиях сообщается, что липин 3 и липин 1 могут совместно влиять на активность фосфатидат-фосфатазы жировой ткани *in vivo* (Csaki et al., 2013). Подобно липину 1, липины 2 и 3 также содержат мотив LXXIL. Как показали некоторые исследования, липин 2 может выступать коактиватором транскрипции для внутриядерного рецептора PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  – активируемый пероксисомным пролифератором рецептор  $\gamma$ ), аналогично липину 1 в гепатоцитах (Finck et al., 2006).

Любопытен тот факт, что, несмотря на наличие одной и той же NLS-последовательности, липины 1 $\alpha$  и 1 $\beta$  имеют разное распределение в клеточных линиях: первый преимущественно накапливается в ядре, второй – в цитоплазме. Это объясняется их различной ролью: липин 1 $\alpha$  отвечает за дифференциацию адипоцитов, активируя нужные транскрипционные факторы, а липин 1 $\beta$  необходим для непосредственного биосинтеза липидов (Siniossoglou, 2013).

Гомологи липина имеются и у растений. У *Arabidopsis thaliana* описаны две Mg<sup>2+</sup>-зависимые фосфогидролазы фосфатидной кислоты, называемые Pah1 и Pah2, которые подавляют биосинтез фосфолипидов в эндоплазматическом ретикулуме. Потеря их функции повышает уровни ФК и других фосфолипидов в растении, однако, что удивительно, не влияет на содержание ТАГ в семенах (Eastmond et al., 2010).

## ДОМЕННАЯ СТРУКТУРА ЛИПИНОВ

Все липины имеют схожую структурную организацию (рис. 2). В их составе выделяют две большие консервативные области: N-концевой (N-LIP) и C-концевой (C-LIP) домены, разделенные варибельным линкером, составляющим в длину 250–300 аминокислот (Chen et al., 2015; Khayyo et al., 2020). Домен C-LIP содержит два ключевых функциональных мотива: мотив в составе галогенкислотной дегалогеназоподобной фосфатазы (известен как HAD-домен) – DXDXXT-мотив, который необходим для дефосфорилирования ФК, и мотив взаимодействия с ядерным

рецептором – LXXII, который позволяет липинам взаимодействовать с ядерными рецепторами и функционировать в качестве регуляторов транскрипции (Chen et al., 2015). Функция домена N-LIP начала проявляться только недавно: некоторые исследования показывают, что он важен для каталитической активности, ядерной локализации и связывания липина с протеинфосфатазой-1 $\gamma$  (PP-1 $\gamma$ ) (Reue, Dwyer, 2009; Siniossoglou, 2013).

Изучение кристаллической структуры липинов показало, что N-LIP связывается с первыми 45 аминокислотными остатками C-LIP и образует атипичный иммуноглобулин-подобный домен (Khayyo et al., 2020). Канонический иммуноглобулин-подобный домен представляет собой двуслойный  $\beta$ -сэндвич из 7  $\beta$ -цепей, которые обозначаются буквами A-G. Атипичный домен в липинах имеет вставку в цепи  $\beta$ E, которая выходит из плоскости  $\beta$ -сэндвича и образует шпильку. Именно в этой шпильке находится линкер, разделяющий N-LIP и C-LIP. Такая конформация обнажает NAD-домен и способствует работе фермента (Khayyo et al., 2020). Мутации, нарушающие трехмерную структуру липина, приводят к потере его каталитической функции.

Липины млекопитающих формируют стабильные гомо-олигомерные комплексы, в которых белки располагаются в ориентации “голова к голове” и “хвост к хвосту” (соответственно N-LIP с N-LIP и C-LIP с C-LIP) (Harris, Finck, 2011; Khayyo et al., 2020). Высказываются предположения о возможном формировании комплексов с транс-взаимодействием N-LIP одной молекулы с C-LIP другой. Липин 1 обычно присутствует в клетке в форме ди- или тетрамера, а также способен образовывать гетеро-олигомеры с липинами 2 и 3; все три белка по отношению друг к другу являются гомологичными (Harris, Finck, 2011). У липинов дрожжей образования олигомеров не обнаружено (Harris, Finck, 2011; Khayyo et al., 2020).

У *S. cerevisiae* помимо N-LIP на N-конце (в составе иммуноглобулин-подобного домена) имеется амфипатичная  $\alpha$ -петля, обеспечивающая заякоривание фермента в мембране (Harris, Finck, 2011; Khayyo et al., 2020). Фосфорилирование этой петли приводит к потере возможности дрожжевого липина связываться с мембранами. Трансмембранный мотив, как таковой, у всех липинов отсутствует, что позволяет им динамично перемещаться из цитозоля к ЭПР и наоборот. Кроме того, в липиновых белках дрозофилы, червей и млекопитающих присутствует богатый лизином и аргинином сигнал ядерной локализации (NLS), мутация в котором нарушает транспорт этих белков в ядро (Siniossoglou, 2013). NLS также необходим для связывания ФК и, следовательно, каталитическая функция и транспорт липинов в ядро взаимоисключают друг друга (Loewen et al., 2004;

Ren et al., 2010). Несмотря на то, что еще ни в одном липине не было обнаружено сигнала ядерного экспорта (NES), имеются данные о том, что потеря C-концевого участка после 204 аминокислоты (в эту область также входит часть C-LIP домена) вызывает накопление липина 1 $\beta$  в ядре, например, у мышей (Ren et al., 2010).

## ФУНКЦИИ ЛИПИНОВ

Актуальность изучения липинов обусловлена тем, что их дефицит или дисфункция в организмах млекопитающих нарушает метаболизм, приводя к печеночной дистрофии, дефектам развития жировой ткани, миопатии и, как следствие, связанным с ними болезням: диабету второго типа, атеросклерозу, рабдомиолизу, синдрому Маджида (Reue, Wang, 2019). Кроме того, была обнаружена связь этого белка с жизнеспособностью аденокарциномы легких (Fan et al., 2018). Такой широкий круг ассоциированных заболеваний свидетельствует о многообразии процессов, в которых принимают участие эти белки. В число их функций входят: адипогенез, синтез фосфолипидов, аутофагия, секреция хиломикрона, синтез жирных кислот, участие в энергетическом обмене клетки (Khayyo et al., 2020). Во многих работах выделяют особенную дуальную ферментативно-генорегулирующую функцию липинов, обусловленную их способностью находиться как в свободном, так и связанном с мембранами состоянии (Siniossoglou, 2013; Chen et al., 2015; Reue, Dwyer, 2019).

**Липины как ферменты пути биосинтеза фосфолипидов.** Как уже было упомянуто выше, липины обладают специфичной  $Mg^{2+}$ -зависимой фосфатазной активностью и способны отщеплять фосфат от ФК с образованием ДАГ, который является ключевым субстратом для синтеза ТАГ, ФЭ и ФХ. Липиновые белки обычно находятся в цитозоле и ассоциируются с мембраной ЭПР в ответ на повышение уровня жирных кислот (Chen et al., 2015).

Триацилглицерин, синтезируемый из ДАГ, играет ключевую роль в поддержании энергетического гомеостаза, поскольку является основной молекулой для запасания энергии. Накопление ТАГ позволяет животным выживать в условиях недостатка пищи, давая не только энергию, но и основу для синтеза фосфолипидов, а также является необходимым для созревания эмбрионов у червей, дрозофилы, мышей и человека (Bahmanyar et al., 2014). Клетки большинства мутантов с нефункциональным липином имеют маленькие липидные капли по сравнению с контролем, что, скорее всего, связано с повышенным отношением фосфолипидов к нейтральным липидам (Ugrankar et al., 2011). Таким образом,

липиды способствуют образованию липидных капель в клетках.

Временной и пространственный контроль активности липинов может оказывать существенное влияние на биогенез органелл, так как ФК и ДАГ служат в качестве метаболитических интермедиатов, сигнальных молекул и регуляторов физических свойств мембран. Непосредственно определяя фосфолипидный состав билипидного слоя, липиды способны задавать такие физические свойства мембранам, как кривизна и вязкость. Данные, полученные на различных модельных системах, подтверждают важную роль липинов в контроле структурной организации мембран ядерной оболочки и ЭПР (Siniossoglou et al., 1998; Golden, Liu, Cohen-Fix, 2006; Bahmanyar et al., 2014).

Важная роль липинов в организации ядерной оболочки была впервые продемонстрирована на дрожжах, у которых инактивация комплекса фосфатазы *Nem1p-Spo7p* (активатора дрожжевого липина) вызывает образование длинных тяжей ядерной оболочки, выдающихся в цитоплазму (Siniossoglou et al., 1998). Интересно то, что такие тяжи формируются в области субдомена ядерной оболочки дрожжей, который прилегает к ядрышку, лишен связывания с хроматином и, судя по всему, обладает большей гибкостью (Campbell et al., 2006).

Деформация ядерной мембраны вызывается каталитически неактивным белком *Pah1p*. Этот фенотип наблюдается и при чрезмерном количестве трансмембранной ДАГ-киназы, которая производит избыточную ФК. Насколько непосредственна роль именно ФК в перестройке мембран, пока неизвестно. Генетический анализ показывает, что усиление биосинтеза фосфолипидов по пути ЦДФ-ДАГ, возникающее в результате инактивации *Pah1p*, необходимо, но недостаточно для подобной деформации ядерной оболочки в клетках с делециями *pah1Δ*, *nem1Δ* или *spo7Δ* (Santos-Rosa et al., 2005). Следовательно, в дополнение к увеличению синтеза фосфолипидов должны быть вовлечены и другие факторы. Поскольку инактивация белка *Pah1p* приводит к изменениям в фосфолипидном составе мембран (увеличению ФК и изменению отношения ФЭ : ФХ), возможно, что эти количественные изменения в составе ядерной оболочки и (или) ЭПР также приводят к деформации мембран, входящих в ее состав, с образованием длинных тяжей (Siniossoglou, 2013).

В клетках живых организмов ядерная оболочка претерпевает значительные структурные изменения во время клеточного цикла. Поскольку дрожжи вступают в закрытый митоз, она не распадается, но значительно увеличивается и растягивается, позволяя сестринским хроматидам разойтись. Регулирование соотношения фосфолипидов в составе ядер-

ной оболочки и ЭПР с помощью *Pah1p* может играть важную роль в этом процессе. Конститутивное дефосфорилирование *Pah1p* репрессирует синтез фосфолипидов *de novo* и препятствует растяжению ядерной оболочки дрожжей во время митоза. Основные механизмы, с помощью которых активность *Pah1p* регулирует этот процесс, еще не определены (Siniossoglou, 2013).

У *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans* липиды необходимы для сохранения сферической формы ядра. Снижение уровня синтеза липина или его активатора СNEP-1 у *C. elegans* вызывает нарушение процессов деполимеризации ламины, разборки ядерной оболочки и сегрегации хромосом во время митоза, а также изменяет организацию мембран ЭПР, формирующих крупные мембранные стопки в цитоплазме (Golden et al., 2006; Bahmanyar et al., 2014). Тем не менее, поскольку было установлено, что опосредованные отсутствием липина нарушения в процессе разборки ядерной оболочки могут быть значительно скомпенсированы одновременным снижением уровня ламин, исследователи сделали вывод, что липиды играют специфическую роль в разборке ядерной оболочки, регулируя своевременную деполимеризацию филаментов ламины во время митоза, и эта функция хотя бы частично отделима от влияния липидов на морфологию ЭПР (Gorjanacz, Mattaj, 2009). Имеются данные о роли липидов в содействии разборке ламины в культивируемых клетках млекопитающих (Mall et al., 2012).

В ядрах млекопитающих было обнаружено множество пулов ДАГ, которые через протеинкиназу С опосредуют фосфорилирование и разборку ламины (Siniossoglou, 2013). Липиды могут также регулировать форму ядра посредством образования ФК и ДАГ, которые имеют коническую форму и тем самым способствуют искривлению мембраны. Авторами показано, что искривление внутренней мембраны ядерной оболочки инициирует формирование фрагментарных инвагинаций, которые, возможно, принимают участие в изменении внутриядерной концентрации ионов кальция, росте ядерной оболочки или экспрессии генов, ассоциированных с ламинной и внутренней ядерной оболочкой. Синтезированный с участием липидов ДАГ может также играть роль в биогенезе ядерных пор и формировании сильно изогнутых мембранных доменов ядерных пор, которые связывают внутреннюю и внешнюю мембраны ядра (Siniossoglou, 2013).

**Липиды как транскрипционные коактиваторы генов метаболизма липидов.** В условиях голодания липиды активно привлекаются в ядро и могут выступать там в роли транскрипционного коактиватора. Имеется не так много информации о подобной его функции в клетках дрозофилы, однако исследования ортологов

липина в печени млекопитающих позволяют предположить, что в ядре гепатоцитов липин действует как активатор транскрипции генов, участвующих в утилизации ФК, и как репрессор липогенных генов (Heier, Kühnlein, 2018). Главную роль в этом играет мотив LXXII, который способен связываться с ядерными рецепторами. Важно отметить, что у липинов отсутствуют выраженные ДНК-связывающие последовательности, поэтому их роль в качестве транскрипционных факторов, вероятно, опосредована взаимодействием с белками скаффолда: гистонами или транскрипционным комплексом (Siniossoglou, 2013).

В 2006 г. Финк и соавторы впервые выявили активность липинов как транскрипционных коактиваторов в исследованиях на мышах, у которых был нокаутирован активируемый пролифератором пероксисом рецептор  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) (Finck et al., 2006). Эти авторы показали, что липин 1 способен формировать физический комплекс с PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha-коактиватор PPAR $\gamma$  1 $\alpha$ ) и PPAR $\alpha$ . Этот комплекс контролирует экспрессию генов, продукты которых участвуют в реакциях  $\beta$ -окисления жирных кислот в митохондриях. Кроме того, активация PPAR $\gamma$  липинами очень важна для дифференциации адипоцитов (Siniossoglou, 2013; Chen et al., 2015). Исследования этого процесса показали, что понижение содержания липина в ядре этанолом может привести к ухудшению функционирования PPAR $\alpha$ /PGC-1 $\alpha$ , что способствует падению уровня окисления жирных кислот и развитию алкогольного стеатоза печени (Chen et al., 2015). В дополнение к PGC-1 $\alpha$  и PPAR $\alpha$ , липины могут также взаимодействовать с другими ядерными рецепторами, такими как ядерный фактор гепатоцитов 4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ ) и глюкокортикоидный рецептор (Harris, Finck, 2011; Siniossoglou, 2013; Chen et al., 2015).

Липины не только участвуют в коактивации этих транскрипционных факторов, но также в некоторых случаях функционируют как транскрипционные репрессоры. Например, липин 1 ингибирует активность ядерного фактора активированных Т-клеток c4 (NFATc4), участвуя в рекрутировании гистондеацетилаз в промоторы-мишени. Следовательно, липины могут служить важным эпигенетическим регулятором для активации или подавления экспрессии генов в зависимости от типа клеток, стадии их дифференцировки и клеточного цикла (Harris, Finck, 2011; Chen et al., 2015). Липины 2 и 3 также содержат LXXII-мотив, и имеются данные относительно их способности взаимодействовать с PPAR $\alpha$  в качестве коактиваторов, однако степень функциональной значимости этих взаимодействий пока не определена (Finck et al., 2006; Donkor et al., 2009).

Регуляция экспрессии генов липинами может осуществляться не только через непосредственное взаимодействие с транскрипционным комплексом. Например, накопление не утилизируемой ФК в отсутствие липина ведет к подавлению раннего адипогенеза у мышей (Siniossoglou, 2013). Адипоциты у таких мышей остаются незрелыми, и накапливают жировые капли меньшего размера, чем у мышей в контрольной группе. У дрожжей уровень ФК влияет на экспрессию генов-участников пути Кеннеди, которые управляются промотором UAS<sub>INO</sub>. ФК-связывающий белок Opi1p при низком уровне ФК переносится из ЭПР в ядро и подавляет экспрессию генов. Липины могут также регулировать транскрипцию через перестройку или изменение формы ядра, непосредственно влияя на пространственную конформацию хроматина, прилегающего к ядерной оболочке (Siniossoglou, 2013).

Любопытен тот факт, что у высших организмов функции липина, как фермента и как транскрипционного фактора, четко разнесены и независимы. Так, в клетках млекопитающих каталитически нефункциональный липин 1 сохраняет способность коактивировать ядерные рецепторы и подавлять активность ядерного фактора активированных Т-клеток NFATc4. В дрожжевых клетках каталитическая активность липина необходима для регуляции экспрессии генов (Donkor et al., 2009; Harris, Finck, 2011).

**Прочие функции липинов.** Липиновые белки участвуют в регуляции клеточного цикла в клетке. Отсутствие фосфорилирования Smp2 (он же Pah1p) в почкующихся дрожжах вызывает задержку митоза, формирование коротких веретен деления по причине недостатка фосфолипидов для формирования двух дочерних ядер (Santos-Rosa et al., 2005). Когда липин инактивируется путем фосфорилирования, скорость биосинтеза фосфолипидов увеличивается, и вся эндомембранная система, включающая ядерную оболочку и ЭПР, интенсивно растет (Santos-Rosa et al., 2005). Липин важен для правильного развития крыльев мушки дрозофилы, принимая участие в репликации ДНК. Дисфункция продукта гена *dLipin* (ортолога липина у *D. melanogaster*) приводит к накоплению в крыловом имагинальном диске клеток в S-фазе и множественной активации точки контроля G<sub>2</sub>/M в клеточном цикле, приводящей к апоптозу. Как результат, формируется малофункциональное крыло меньшего размера с неровным краем (Duy Vinh et al., 2019). В кератиноцитах млекопитающих липин 1 способствует активации протеинкиназы C, которая подавляет синтез белка p21 и тем самым приводит к дифференцировке этих клеток. Нокаунт липина 1 приводит к аресту клеточного цикла кератиноцитов на стадии G<sub>1</sub> (Chae et al., 2016).

Способность липинов связываться со сложными фосфолипидами, которые могут служить лигандами для ядерных рецепторов, дает возможность полагать, что липины выполняют функцию сенсоров фосфолипидного содержимого клетки. Таким образом, связанные фосфолипиды позволяют тонко регулировать липидный метаболизм и биосинтез мембран с помощью липинов, которые в данном случае функционируют как шапероны, переносящие лиганды к соответствующим рецепторам (Harris, Finck, 2011).

Имеются противоречивые данные, полученные на мышах и крысах, описывающие вклад липинов в синтез и секрецию липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП) (Chen et al., 2015). В то время как у мышей дефицит липина 1 вызывает увеличение скорости секреции ЛОНП, а увеличенный синтез липина 1 подавляет секрецию ЛОНП, на клеточной линии гепатоцитов крыс выявлена противоположная картина: повышенный синтез липина 1 стимулирует секрецию ЛОНП, а нокдаун эндогенного липина 1 ее снижает (Chen et al., 2008; Khalil et al., 2008).

Липины регулируют экспрессию не только генов, связанных с липидным метаболизмом. Несколько работ свидетельствуют в пользу того, что липин 1 необходим для активации IL4-зависимых генов, экспрессирующихся в макрофагах, как сигнал к поляризации макрофагов для заживления ран. Без данного коактиватора экспрессия *Arg1*, *Socs2*, *Ccl17*, *Mannr*, *Il10*, *Pparg* значительно снижена, и раны на экспериментальных животных заживают значительно медленнее (Chandran et al., 2020). При активации макрофагов посредством Toll-подобных рецепторов (TLR), продуцируемый с помощью липина ДАГ включается в регуляцию преобразований арахидоновой кислоты и синтез эйкозаноидов (Balboa et al., 2019). Как следствие своей поддерживающей роли TLR4-опосредованной передачи сигнала, липин 1 влияет на величину продукции многих воспалительных факторов в активированных макрофагах мыши и человека, тем самым влияя на развитие воспаления. Есть данные об антагонистичной функции липина 2, участвующего в противовоспалительных реакциях (Balboa et al., 2019). Липин 1 регулирует также образование липидных капель в макрофагах, однако это, по-видимому, не связано с продукцией ТАГ, поскольку при отсутствии фермента уровень включения свободных кислот в ТАГ не изменяется (Balboa et al., 2019).

Последние исследования на клеточных линиях человека свидетельствуют о  $\beta$ -TRCP-опосредованной деградации липина 2 в макрофагах. Было показано, что липин 2 взаимодействует с убиквитинлигазным комплексом SCF <sup>$\beta$ -TRCP</sup>, а именно с входящим в его состав белком F-box, который является важ-

ным медиатором воспалительных реакций и играет решающую роль в контроле разнообразных клеточных процессов, включая клеточный цикл, дифференцировку и иммунный ответ. Убиквитинирование и деградация липина 2 способствует активации митоген-активируемой протеинкиназы и последующей индукции провоспалительных факторов. Это делает SCF <sup>$\beta$ -TRCP</sup> потенциальной терапевтической мишенью для аутовоспалительных заболеваний, вызванных изменением уровня белка липина-2 в макрофагах (Watahiki et al., 2020).

## МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЛИПИНОВ

Наиболее распространенным механизмом регуляции активности липинов является фосфорилирование. Интересно то, что при всей консервативности этого семейства белков у разных групп организмов сайты фосфорилирования различны. У дрожжей фосфорилирование Smp2 снижает его внутреннюю функциональную ферментативную активность, а также способность к ассоциации с хроматином (Santos-Rosa et al., 2005; Makarova et al., 2016). В серии экспериментов было показано, что комплекс Nem1p-Spo7p дефосфолирует Smp2 и тем самым способствует поддержанию в интерфазе сферической формы ядра. В митозе этот процесс блокируется, и фосфорилированный киназами Smp2 перестает репрессировать гены ферментов пути биосинтеза фосфолипидов, тем самым вызывая короткий импульс активного мембранного синтеза, что позволяет веретены деления разделить материнское ядро на два дочерних (Santos-Rosa et al., 2005).

Было установлено, что в клетках дрожжей *S. cerevisiae* дефицит цинка служит индуктором синтеза липина по Zap1-зависимому пути (Soto-Cardalda et al., 2012). Фосфатаза CNEP-1 (CTD nuclear envelope protein 1, также известная как Dullard) — белок ядерной оболочки, который активирует липин у *S. elegans* вблизи ядра, тем самым ограничивая концентрацию ФИ в этой области для поддержания формы ядра и предотвращения атипичных взаимодействий наружной мембраны ядерной оболочки с ЭПР (Bahmanyar, 2015). При отсутствии липина или его активатора вблизи ядра синтез фосфолипидов сдвинут в сторону ФИ, градиент ФИ отсутствует, и вследствие этого, а также сходства состава мембран ЭПР и наружной мембраны ядерной оболочки, происходит их аномальное слипание (Bahmanyar, 2015).

Различные липиды способны оказывать регуляторное воздействие на активность липина у дрожжей. Так, фосфолипиды (ЦДФ-ДАГ, ФИ, кардиолипин) действуют на фермент как активаторы, а сфингоиды (сфингозин, фитосфингозин и сфинганин),

напротив, конкурируют с ФК за место в активном центре липина и выступают в роли ингибиторов (Pascual, Carman, 2013).

У млекопитающих фосфорилирование влияет также на ферментативную активность липина, ингибируя ее. В ответ на повышение уровня инсулина аминокислоты 19–23 в белке фосфорилируются, обеспечивая его транслокацию от ЭПР в цитозоль, а оттуда в ядро для участия в регуляции генов, ответственных за липидный обмен (Harris, Finck, 2011). За дефосфорилирование липина 1 у млекопитающих отвечает комплекс STDNEP1–(NEP1-R1), гомологичный дрожжевому Nem1p–Spo7p (Han et al., 2012). Сумоилирование производит схожий эффект с фосфорилированием.

Гипоксия, недостаток нутриентов и факторов роста приводят к перемещению липина 1 в ядро для репрессии генов, вовлеченных в биосинтез липидов (Siniossoglou, 2013). Кроме того, повышение концентрации глюкокортикоидов приводит к увеличению фосфатаз-фосфатазной активности липина 1 (но не липина 2) в печени и ускоряет дифференциацию адипоцитов в жировой ткани. Тем не менее, в разных тканях имеют место различные механизмы регуляции активности липинов. Так, голодание и диабет приводят к активному привлечению липиновых белков к работе в печени, но в жировой ткани наблюдается противоположное действие. Синтез липина 1 в адипоцитах усиливается воздействием инсулин-чувствительных соединений (таких как тиазолидиндионы и гармин), и в целом коррелирует с чувствительностью клеток к инсулину (Chen et al., 2015). Кроме того, экспрессия гена, кодирующего липин, индуцируется понижением концентрации стеролов, контролирующими накопление ТАГ в цитозоле (Chen et al., 2015).

Недостаток TORC1 (мишени комплекса рапамицина 1) приводит к дефосфорилированию и транслокации липина 1 в ядра клеток млекопитающих для увеличения синтеза SREBP1 – транскрипционного фактора, ответственного за регуляцию генов-участников биосинтеза жирных кислот, холестерина, ТАГ и фосфолипидов (Peterson et al., 2011). По этому же механизму протекает индукция повышенного синтеза липина 1 в печени с помощью этанола и активный перенос фермента в цитоплазму (Hu et al., 2013). Недавние исследования показали, что воздействие ультрафиолетового излучения на кератиноциты подавляет синтез SREBP1, а, следовательно, и липина 1 (Chae et al., 2020).

Ингибирование синтеза липина 1 вызывают такие факторы, как индукторы стресса ЭПР, но эта репрессия снимается при активации PPAR- $\gamma$  (Chen et al., 2015). Подобное наблюдается и с экспрессией гена

*lipin 2* при стрессе ЭПР, но только в печени (Chen et al., 2015). Эстрогены также подавляют синтез липина 1 в матке и печени, демонстрируя его возможную роль в репродуктивной функции. Липополисахариды и глюкан зимозан воздействуют соответственно на рецепторы TLR4 и TLR2 адипоцитов, приводя к понижению синтеза липина 1. Провоспалительные цитокины имеют отрицательное воздействие на уровень этого фермента (Chen et al., 2015).

## ЗАБОЛЕВАНИЯ И СОСТОЯНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ЛИПИНАМИ

Исходя из специфики выполняемых липиновыми белками функций, можно заключить, что нарушения в их работе оказывают влияние на морфологию мембран в клетке. Если принять во внимание тот факт, что большая часть компартментов в живой клетке ограничена билипидными мембранами, становится ясно, насколько обширно влияние этих белков. Нарушение регуляции уровня экспрессии генов или мутации, приводящие к изменению концентрации фосфатаз-фосфатазы в тканях, может приводить к различного рода заболеваниям и синдромам у людей. Не менее интересно то, что изменение экспрессии кодирующих липиновые белки генов может облегчить развитие атеросклероза, онкологии и ожирения (Balboa et al., 2019; Dinarvand et al., 2020; Phan, Reue, 2005). Экспериментальные данные, полученные на животных моделях и клеточных линиях с истощением или гиперэкспрессией гена, кодирующего липин, крайне необходимы для изучения этих состояний и построения стратегии по их лечению и коррекции.

Как уже было описано, мутантные по гену *lipin 1 fld*-мышцы страдают значительной липодистрофией, которая вносит вклад в развитие инсулинрезистентности, гипертонии, дисгликемии и атеросклероза. Тем не менее, люди, которые несут две копии мутантного гена *lipin 1*, липодистрофией не страдают. Мутации липина 1 приводят к болям в скелетной мускулатуре, слабости, рецидивирующему рабдомиолизу и миоглобинурии в детском возрасте. Есть множество работ, свидетельствующих, что делеция гена липина у млекопитающих ведет к тяжелым хроническим поражениям соматической мышечной ткани (Zhang, Reue, 2014; Alshudukhi et al., 2018; Schweitzer et al., 2019). На ультраструктурном уровне это проявляется как двукратное увеличение площади липидных капель (вследствие накопления ФК) и увеличение содержания округлых митохондрий с малым содержанием крист. Именно эти нарушения, как предполагают, являются причиной мышечной аутофагии, приводящей к различным формам мышечных повреждений и миопатии, включая мышечную

дистрофию (Zhang, Reue, 2014; Alshudukhi et al., 2018; Schweitzer et al., 2019). Имеются данные, что ВИЧ-положительные пациенты с липодистрофией имеют очень низкий уровень всех изоформ липина по сравнению с пациентами без липодистрофии, что в действительности очень напоминает фенотип *fld*-мышей (Chen et al., 2015).

Аналогичная картина наблюдается при рассмотрении влияния липина 1 и 2 на центральную нервную систему больных TOR1A дистонией (обусловлена рецессивной мутацией в гене *TOR1A*, который кодирует белок, работающий на внутренней мембране ЭПР). Мыши и люди с таким заболеванием имеют повышенный уровень активности липинов, что приводит к нарушению роста аксонов и смерти нейронов. Искусственное понижение этой активности теоретически может помочь в коррекции этого заболевания. Исходя из симптоматики, описанной при мутациях в липинах 1 и 2, люди, в отличие от мышей, не имеют нарушений в центральной нервной системе, что может означать большую толерантность клеток человека к модификации в такой ситуации (Cascalho et al., 2020).

Несколько миссенс-мутаций в гене *lipin2* у людей ассоциированы с развитием аутоиммунных заболеваний, таких как псориаз и синдром Маджида, характеризующийся рецидивирующей лихорадкой, поражением костей, анемией и воспалительными поражениями кожи. Единичные нуклеотидные полиморфизмы в этом гене коррелируют с диабетом 2 типа. Предполагается, что эти заболевания могут развиваться по SCF<sup>β</sup>-TRCP-зависимому пути, и этот убиквитин-лигазный комплекс может служить мишенью для контроля уровня липина 2 в макрофагах (Watahiki et al., 2020). Синдромы, вызванные биаллельными мутациями гена *lipin3*, все еще не описаны.

Липин 1 присутствует в атеросклеротических бляшках человека и колокализуется с CD68, маркером макрофагов. Было обнаружено, что липин 1 участвует в накоплении ДАГ и нейтральных липидов в пенистых клетках во время обработки окисленными липопротеинами низкой плотности. Активность липина 1 коррелирует с количеством и размером бляшек в аорте животных. В отсутствие липина 1 в миелоидных клетках развитие атеросклероза замедляется. По-видимому, в макрофагах липин 1 является связующим звеном между накоплением липидов и повышенной выработкой провоспалительных факторов (Balboa et al., 2019).

В настоящее время показана связь между липиновыми белками и развитием колита. На животной модели колита было установлено, что липин 1 влияет на тяжесть заболевания, усиливая активацию макрофагов и выработку IL-23 в толстой кишке (Balboa et al., 2019). Этот цитокин вырабатывается дендритными клетками и макрофагами в кишечнике, и его наработка усиливается у пациентов с болезнью Крона или язвенным колитом. Важность липина 1 в макрофагах во время развития колита была экспери-

ментально продемонстрирована путем переноса синтезирующих липин 1 макрофагов животным с дефицитом этого фермента (Balboa et al., 2019). Кроме того, обработка цитокином IL-23 животных с дефицитом липина 1 усугубляла течение заболевания, подтверждая важность IL-23 в развитии этой болезни. Известно, что прогрессирование колита может привести к развитию опухолей, и в этом, как и во многих других видах опухолей, не последнюю роль играет липин 1 (Balboa et al., 2019). В таких опухолях, как рак предстательной железы, рак молочной железы и рак легких, синтез липина 1, по-видимому, важен для выживания и распространения опухолевых клеток. Экспрессия гена, кодирующего липин 1, увеличивается в вышеупомянутых типах рака человека, за исключением рака толстой кишки человека, данных о синтезе липина 1 в котором пока недостаточно (Balboa et al., 2019; Dinarvand et al., 2020). Проведенные эксперименты показали, что фармакологическое ингибирование экспрессии *lipin 1* пропранололом, блокатором β-адренергических рецепторов, подавляет пролиферацию и миграцию клеток рака молочной железы (Dinarvand et al., 2020). Совокупность перечисленных выше данных говорит о липине 1 как о потенциальном кандидате для прогноза и лечения онкологических заболеваний.

Гиперэкспрессия гена, кодирующего липин 1, в адипоцитах мышей приводит к активному накоплению ТАГ в липидных каплях и способствует развитию ожирения (Phan, Reue, 2005; Chen et al., 2015). Согласно экспериментам этих авторов, повышенный синтез липина приводит к резкому увеличению массы жировой ткани в организме мышей в диапазоне от 10% до трехкратного превышения нормы. Это дает основания предполагать, что ген *lipin 1* человека может быть геном-кандидатом на роль виновника расстройств, связанных с увеличением массы жировой ткани. Кроме того, показано, что более слабые генетические вариации уровня экспрессии гена *lipin 1* могут вносить вклад в развитие ожирения в популяциях людей (Phan, Reue, 2005).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение липиновых белков в настоящее время высоко актуально. На протяжении последних десяти лет каждый год выходит порядка 30 статей, посвященных этой теме. Липины уникальны среди ферментов биосинтеза глицеролипидов своей способностью перемещаться между клеточными мембранами, диффундируя через цитозоль, а также служить кофактором транскрипции в ядре. Растущий объем знаний о биохимической и клеточной активности липиновых белков крайне ценен для понимания физиологических функций липиновых белков в поддержании здоровья или развития патологических состояний. Тем не менее, в этой области все еще остается множество вопросов, на которые предстоит найти ответ. Для чего высшим организмам необхо-

димо более одного ортолога липина? Почему разные члены семейства липиновых белков синтезируются в разных тканях, и есть ли между ними какая-либо взаимосвязь? Как клетки координируют активность различных липинов во время роста и развития? Почему иногда схожий дефицит липиновых белков имеет отличные эффекты у разных организмов? Возникновение подобных вопросов подогревает интерес к дальнейшему изучению роли и механизма действия липинов и построению полной картины всех процессов, которые с ними связаны.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства высшего образования и науки РФ № 2019-0546 (FSUS-2020-0040), а также в рамках бюджетного проекта № 0324-2019-0042-С-01 ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не было экспериментов с участием животных или людей.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alshudukhi A. A., Zhu J., Huang D., Jama A., Smith J. D., Wang Q.J., Esser K.A., Ren H.* 2018. Lipin-1 regulates Bnip3-mediated mitophagy in glycolytic muscle. *FASEB J.* V. 32. P. 6796.
- Bahmanyar S., Biggs R., Schuh A. L., Desai A., Müller-Reichert T., Audhya A., Dixon J. E., Oegema K.* 2014. Spatial control of phospholipid flux restricts endoplasmic reticulum sheet formation to allow nuclear envelope breakdown. *Genes Dev.* V. 28. P. 121.
- Bahmanyar S.* 2015. Spatial regulation of phospholipid synthesis within the nuclear envelope domain of the endoplasmic reticulum. *Nucleus.* V. 6. P. 102.
- Balboa M.A., de Pablo N., Meana C., Balsinde J.* 2019. The role of lipins in innate immunity and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids.* V. 1864. P. 1328.
- Campbell J.L., Lorenz A., Witkin K.L., Hays T., Loidl J., Cohen-Fix O.* 2006. Yeast nuclear envelope subdomains with distinct abilities to resist membrane expansion. *Mol. Biol. Cell.* V. 17. P. 1768.
- Cascalho A., Foroozandeh J., Hennebel L., Swerts J., Klein C., Rous S., Gonzalez B.D., Pisani A., Meringolo M., Gallego S. F., Verstreken P., Seibler P., Goodchild R.E.* 2020. Excess Lipin enzyme activity contributes to TOR1A recessive disease and DYT-TOR1A dystonia. *Brain.* V. 143. P. 1746.
- Chae M., Jung J.Y., Bae I.H., Kim H.J., Lee T.R., Shin D.W.* 2016. Lipin-1 expression is critical for keratinocyte differentiation. *J. Lipid Res.* V. 57. P. 563.
- Chae M., Son E.D., Bae I.H., Cho E.G., Kim H.J., Jung J.Y.* 2020. UVB-dependent inhibition of lipin-1 protects against proinflammatory responses in human keratinocytes. *Exp. Mol. Med.* V. 52. P. 293.
- Chandran S., Schilke R.M., Blackburn C.M.R., Yurochko A., Mirza R., Scott R.S., Finck B.N., Woolard M.D.* 2020. Lipin-1 contributes to IL-4 mediated macrophage polarization. *Front. Immunol.* V. 11. P. 787.
- Chen Y., Rui B.B., Tang L.Y., Hu C.M.* 2015. Lipin family proteins - key regulators in lipid metabolism. *Ann. Nutr. Metab.* V. 66. P. 10.
- Chen Z., Gropler M.C., Norris J., Lawrence Jr J.C., Harris T.E., Finck B.N.* 2008. Alterations in hepatic metabolism in fld mice reveal a role for lipin 1 in regulating VLDL-triacylglyceride secretion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* V. 28. P. 1738.
- Csaki L.S., Dwyer J.R., Li X., Nguyen M.H., Dewald J., Brindley D.N., Lusic A.J., Yoshinaga Y., de Jong P., Fong L., Young S.G., Reue K.* 2013. Lipin-1 and lipin-3 together determine adiposity *in vivo*. *Mol. Metab.* V. 3. P. 145.
- Dinarvand N., Khanahmad H., Hakimian S. M., Sheikhi A., Rashidi B., Bakhtiari H., Pourfarzam M.* 2020. Expression and clinicopathological significance of lipin-1 in human breast cancer and its association with p53 tumor suppressor gene. *J. Cell. Physiol.* V. 235. P. 5835.
- Donkor J., Zhang P., Wong S., O'Loughlin L., Dewald J., Kok B.P., Brindley D.N., Reue K.* 2009. A conserved serine residue is required for the phosphatidate phosphatase activity but not the transcriptional coactivator functions of lipin-1 and lipin-2. *J. Biol. Chem.* V. 284. P. 29968.
- Donkor J., Sariahmetoglu M., Dewald J., Brindley D.N., Reue K.* 2007. Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J. Biol. Chem.* V. 282. P. 3450.
- Duy Binh T., L A Pham T., Nishihara T., Thanh Men T., Kamei K.* 2019. The function of lipin in the wing development of *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 3288.
- Eastmond P.J., Quettier A.L., Kroon J.T., Craddock C., Adams N., Slabas A.R.* 2010. Phosphatidic acid phosphohydrolase 1 and 2 regulate phospholipid synthesis at the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* V. 22. P. 2796.
- Fan X., Weng Y., Bai Y., Wang Z., Wang S., Zhu J., Zhang F.* 2018. Lipin-1 determines lung cancer cell survival and chemotherapy sensitivity by regulation of endoplasmic reticulum homeostasis and autophagy. *Cancer Med.* V. 7. P. 2541.
- Finck B.N., Gropler M.C., Chen Z., Leone T.C., Croce M.A., Harris T.E., Lawrence J.C. Jr, Kelly D.P.* 2006. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  regulatory pathway. *Cell Metab.* V. 4. P. 199.
- Golden A., Liu J., Cohen-Fix O.* 2009. Inactivation of the *C. elegans* lipin homolog leads to ER disorganization and to defects in the breakdown and reassembly of the nuclear envelope. *J. Cell Sci.* V. 122. P. 1970.
- Gorjánác M., Mattaj I.W.* 2009. Lipin is required for efficient breakdown of the nuclear envelope in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Sci.* V. 122. P. 1963.
- Han G.S., Carman G.M.* 2010. Characterization of the human LPIN1-encoded phosphatidate phosphatase isoforms. *J. Biol. Chem.* V. 285. P. 14628.
- Han G.S., Wu W.I., Carman G.M.* 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* lipin homolog is a Mg<sup>2+</sup>-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J. Biol. Chem.* V. 281. P. 9210.
- Han S., Bahmanyar S., Zhang P., Grishin N., Oegema K., Croke R., Graham M., Reue K., Dixon J.E., Goodman J.M.*

2012. Nuclear envelope phosphatase 1-regulatory subunit 1 (formerly TMEM188) is the metazoan Spo7p ortholog and functions in the lipin activation pathway. *J. Biol. Chem.* V. 287. P. 3123.
- Harris T.E., Finck B.N. 2011. Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* V. 22. P. 226.
- Heier C., Kühnlein R.P. 2018. Triacylglycerol metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* V. 210. P. 1163.
- Hu M., Wang F., Li X., Rogers C.Q., Liang X., Finck B.N., Mitra M.S., Zhang R., Mitchell D.A., You M. 2012. Regulation of hepatic lipin-1 by ethanol: Role of AMP-activated protein kinase/sterol regulatory element-binding protein 1 signaling in mice. *Hepatology.* V. 55. P. 437.
- Khalil M.B., Sundaram M., Zhang H.Y., Links P.H., Raven J.F., Manmontri B., Sariahmetoglu M., Tran K., Reue K., Brindley D.N., Yao Z. 2009. The level and compartmentalization of phosphatidate phosphatase-1 (lipin-1) control the assembly and secretion of hepatic VLDL. *J. Lipid Res.* V. 50. P. 47.
- Khayyo V.I., Hoffmann R.M., Wang H., Bell J.A., Burke J.E., Reue K., Airola M.V. 2020. Crystal structure of a lipin/Pah phosphatidic acid phosphatase. *Nat. Commun.* V. 11. P. 1.
- Langner C.A., Birkenmeier E.H., Ben-Zeev O., Schotz M.C., Sweet H.O., Davisson M.T., Gordon J.I. 1989. The fatty liver dystrophy (fld) mutation. A new mutant mouse with a developmental abnormality in triglyceride metabolism and associated tissue-specific defects in lipoprotein lipase and hepatic lipase activities. *J. Biol. Chem.* V. 264. P. 7994.
- Lin Y.P., Carman G.M. 1989. Purification and characterization of phosphatidate phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* V. 264. P. 8641.
- Loewen C.J.R., Gaspar M.L., Jesch S.A., Delon C., Ktistakis N.T., Henry S.A., Levine T.P. 2004. Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science.* V. 304. P. 1644.
- Makarova M., Gu Y., Chen J.S., Beckley J.R., Gould K.L., Olfierenko S. 2016. Temporal regulation of lipin activity diverged to account for differences in mitotic programs. *Curr. Biol.* V. 26. P. 237.
- Mall M., Wälte T., Gorjánác M., Davidson I.F., Nga Ly-Hartig T.B., Ellenberg J., Mattaj I.W. 2012. Mitotic lamin disassembly is triggered by lipid-mediated signaling. *J. Cell Biol.* V. 198. P. 981.
- Pascual F., Carman G.M. 2013. Phosphatidate phosphatase, a key regulator of lipid homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids.* V. 1831. P. 514.
- Péterfy M., Phan J., Xu P., Reue K. et al. 2001. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat. Genet.* V. 27. P. 121.
- Peterson T.R., Sengupta S.S., Harris T.E., Carmack A.E., Kang S.A., Balderas E., Guertin D.A., Madden K.L., Carpenter A.E., Finck B.N., Sabatini D.M. 2011. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell.* V. 146. P. 408.
- Phan J., Reue K. 2005. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metab.* V. 1. P. 73.
- Ren H., Federico L., Huang H., Sunkara M., Drennan T., Frohman M.A., Smyth S.S., Morris A.J. 2010. A phosphatidic acid binding/nuclear localization motif determines lipin1 function in lipid metabolism and adipogenesis. *Mol. Biol. Cell.* V. 21. P. 3171.
- Reue K., Dwyer J.R. 2009. Lipin proteins and metabolic homeostasis. *J. Lipid Res.* V. 50. P. 109.
- Reue K., Wang H. 2019. Mammalian lipin phosphatidic acid phosphatases in lipid synthesis and beyond: metabolic and inflammatory. *J. Lipid Res.* V. 60. P. 728.
- Santos-Rosa H., Leung J., Grimsey N., Peak-Chew S., Siniosoglou S. 2005. The yeast lipin Smp2 couples phospholipid biosynthesis to nuclear membrane growth. *EMBO J.* V. 24. P. 1931.
- Schweitzer G.G., Collier S.L., Chen Z., McCommis K.S., Pittman S.K., Yoshino J., Matkovich S.J., Hsu F.F., Chrast R., Eaton J.M., Harris T.E., Wehl C.C., Finck B.N. 2019. Loss of lipin-1-mediated phosphatidic acid phosphohydrolase activity in muscle leads to skeletal myopathy in mice. *FASEB J.* V. 33. P. 652.
- Siniosoglou S., Santos-Rosa H., Rappsilber J., Mann M., Hurt E. 1998. A novel complex of membrane proteins required for formation of a spherical nucleus. *EMBO J.* V. 17. P. 6449.
- Siniosoglou S. 2013. Phospholipid metabolism and nuclear function: roles of the lipin family of phosphatidic acid phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids.* V. 1831. P. 575.
- Soto-Cardalda A., Fakas S., Pascual F., Choi H.S., Carman G.M. 2012. Phosphatidate phosphatase plays role in zinc-mediated regulation of phospholipid synthesis in yeast. *J. Biol. Chem.* V. 287. P. 968.
- Ugrankar R., Liu Y., Provaznik J., Schmitt S., Lehmann M. 2011. Lipin is a central regulator of adipose tissue development and function in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* V. 31. P. 1646.
- Watahiki A., Shimizu K., Hoshikawa S., Chiba M., Kitamura H., Egusa H., Fukumoto S., Inuzuka H. 2020. Lipin-2 degradation elicits a proinflammatory gene signature in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 524. P. 477.
- Zhang P., Reue K. 2014. Lipin-1 flexes its muscle in autophagy. *Cell Cycle.* V. 13. P. 3789.

## Lipins: Characteristics and Functional Role in the Organism

S. S. Saidakova<sup>a, b, \*</sup>, K. N. Morozova<sup>a, b</sup>, and E. V. Kiseleva<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Cytology and Genetics, Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>b</sup>Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090 Russia

\*e-mail: [custodian.of.midnight@gmail.com](mailto:custodian.of.midnight@gmail.com)

The family of lipin proteins includes enzymes participating in the phospholipid biosynthesis pathway (Kennedy pathway) which are able to dephosphorylate phosphatidic acid to diacylglycerol. In addition, lipins may be trans-

ported from the cytoplasm to the nucleus and function as coactivators of gene expression. This dual function justifies the high interest in the study of these proteins. The purpose of this review is to give a general idea of the structure, functions, and regulation mechanisms of various lipin orthologs and isoforms in the tissues of eukaryotic organisms and to summarize the latest data obtained by researchers in this field. A separate section is devoted to human diseases caused by excess or deficiency of lipin.

**Keywords:** lipin, lipids, phosphatidate phosphatase, *fld* mice, lipodystrophy, transcriptional cofactor

## МЕМБРАННАЯ БИОЭНЕРГЕТИКА И РАЗДЕЛЕНИЕ ТРУДА В СИСТЕМАХ ЭЛЕКТРИЧЕСКИ СВЯЗАННЫХ КЛЕТОК

© 2021 г. Т. В. Потапова\*

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского  
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119899 Россия

\*E-mail: potapova@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 31.08.2020 г.

После доработки 10.09.2020 г.

Принята к публикации 11.09.2020 г.

С позиций современной мембранной биоэнергетики возможно разделение в пространстве мембранных белков, обеспечивающих запасание и использование энергии, аккумулированной в форме мембранного потенциала (МП). Наличие в многоклеточных системах электрической связи через проницаемые контакты (ПК) создает возможность транспорта энергии через ПК и на этой основе разделения труда между соседними клетками. Происходящие при этом процессы и явления проявляются в изменениях электрических характеристик отдельных клеток и ПК и могут быть количественно проанализированы с помощью описания клеток и клеточных систем как эквивалентных электрических кабелей. В настоящем обзоре приводятся данные многолетних исследований с участием автора передачи энергии через ПК в эволюционно различных многоклеточных системах: трихомах нитчатых цианобактерий, гифах мицелиальных грибов и монослойных культурах клеток животных. Более детально рассмотрена, как удобная экспериментальная модель, гифа *Neurospora crassa*. На основе сопоставления собственных данных с большим объемом данных из литературы рассмотрена гипотеза о возможном участии в самоорганизации внутриклеточных структур на верхушке растущей гифы *N. crassa* локальных электрических полей, которые создаются при разделении между клетками функций генерации МП и использования его энергии. Представления об особенностях электрических процессов и явлений, сопровождающих транспорт энергии через ПК, могут быть полезны при анализе многих важных вопросов, связанных с рассмотрением механизмов реализации генетических “инструкций” в конкретных жизненных процессах.

**Ключевые слова:** биоэнергетика, мембранный потенциал, межклеточные взаимодействия, электрическая связь, локальные электрические поля, разделение труда, *Neurospora crassa*

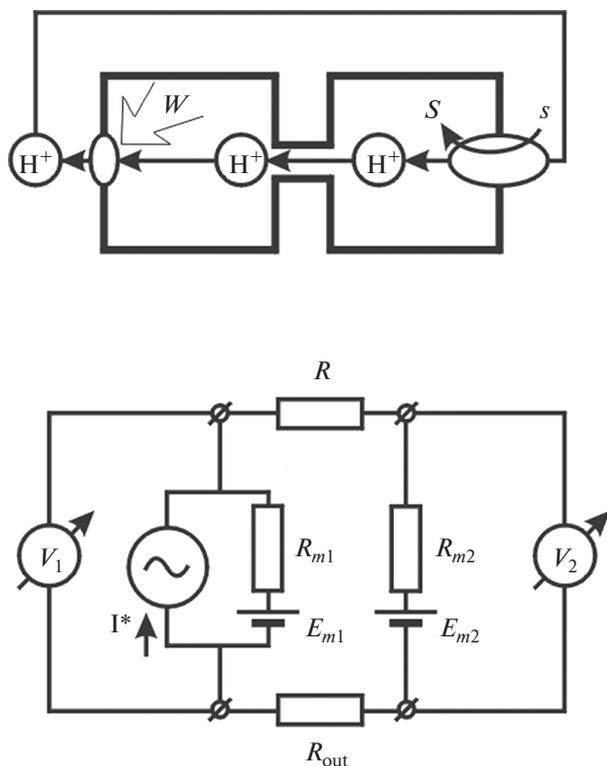
DOI: 10.31857/S0041377121010089

В рамках представлений современной мембранной биоэнергетики (Скулачев и др., 1977, 2010; Skulachev, 1988) разность электрохимических потенциалов ионов  $H^+$  на сопрягающей мембране ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) представляет собой наряду с АТФ конвертируемую и транспортабельную форму энергии в клетке, которая обеспечивает различные типы жизненной активности, такие как химическая, осмотическая и механическая работа и производство тепла. Транспорт энергии в форме  $\Delta\mu_{H^+}$  вдоль сопрягающих мембран объединяет тысячи генераторов  $\Delta\mu_{H^+}$  в единую энергосистему.

Транспорт ионов через плазматическую мембрану у всех живых клеток от прокариотов до эукариотов — необходимая составная часть поддержания ионно-осмотического гомеостаза, передачи инфор-

мации, энергетического обеспечения клеточного метаболизма, снабжения клеток субстратами и удаления продуктов жизнедеятельности (Mitchell, 1962, 1966; Crane, 1977; Harold 1986; Slayman, 1987; Skulachev, 1988). В стационарном состоянии все ионные потоки взаимосогласованы между собой и с энергетическим статусом клетки. Транспорт ионов, необходимых для выполнения клеткой определенных функций, осуществляют разнообразные внутримембранные белки, которые являются либо первичными ионными насосами, как, например, непосредственно потребляющая энергию АТФ протонная АТФаза грибной клетки (Slayman, 1987), либо вторичными транспортерами, например, те, которые у грибов осуществляют в симпорте с протоном перенос сахаров, аминокислот и ионов (Slayman, Slayman, 1974; Sanders et al., 1983; Blatt, Slayman, 1987; Rodríguez-Navarro et al., 1986). Активная работа подобных транспортных белков создает значительные

**Принятые сокращения:** ВР — верхушечный рост; МП — мембранный потенциал; ПК — проницаемые контакты.



**Рис. 1.** Разделение транспортных функций между клетками, связанными ПК. *Вверху* – Схема движения ионов  $H^+$ , которые откачиваются ионным насосом с затратами энергии ( $W$ ) через плазматическую мембрану левой клетки и возвращаются внутрь системы с клетками путем транспорта субстрата ( $S$ ), сопряженного с входом ионов  $H^+$  по электрохимическому градиенту. *Внизу* – Схема эквивалентного электрического кабеля, позволяющая производить количественные оценки. Насосы левой клетки генерируют электрический ток  $I^*$ , расходуя энергию  $W$ .  $R_{m1}$  и  $R_{m2}$  – сопротивление мембран левой и правой клеток соответственно.  $E_{m1}$  и  $E_{m2}$  – диффузионные МП, создаваемые различием концентраций ионов между цитоплазмой и внеклеточной средой.  $R$  – сопротивление ПК между клетками.  $R_{out}$  – сопротивление наружной среды.  $V_1$ ,  $V_2$  – МП левой и правой клеток соответственно.

Задача представленного обзора ввести читателя в детали электрических процессов и явлений, сопровождающих в многоклеточных системах разделение между клетками функций аккумуляции энергии в форме МП и расходования этой энергии на клеточные нужды. На примере гифы мицелиального гриба рассматриваются возможности упорядочивания взаимодействий внутриклеточных структур под влиянием локальных электрических полей, генерируемых и поддерживаемых разделением труда между клетками (рис. 1).

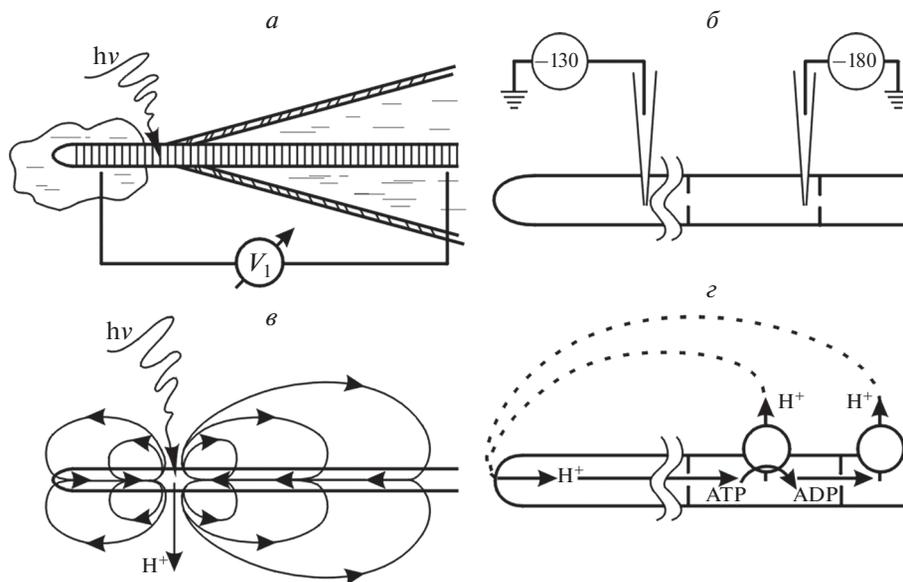
### ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ ЭЛЕКТРОНЕВОЗБУДИМЫМИ КЛЕТКАМИ

Во второй половине прошлого века была открыта, почти случайно, электрическая связь между электроневозбудимыми клетками (Kanno, Loewenstein, 1964). В ходе исследования электрических свойств ядерной мембраны клеток слюнной железы личинки дрозофилы с помощью двух микроэлектродов, через один из которых пропускали тестирующие импульсы электрического тока, оказалось, что при последовательном перемещении электродов из клетки в клетку импульсы регистрируются, когда электроды расположены в соседних клетках. Межклеточные каналы, по которым из клетки в клетку протекает электрический ток и свободно проходят ионы и мелкие молекулы, у разных организмов совсем не похожи друг на друга: у нитчатых цианобактерий это микроплазматесмы, у растений – плазматесмы, у животных – щелевые контакты, у грибов – септальные поры. Однако электрические свойства всех многоклеточных систем, связанных внутри себя такими проницаемыми контактами (ПК), описываются одними и теми же кабельными уравнениями, разработанными когда-то для описания электрических процессов в телеграфных кабелях, проложенных по дну Мирового океана.

ионные потоки через плазматическую мембрану (примерно  $10^6$ – $10^7$  ионов на клетку за 1 с) и часто сопровождается более или менее значительными электрическими токами: от пикоампер до десятков наноампер на клетку (De Loof, 1985; Harold 1986; Slayman, 1987).

Различные транспортные белки, как в пределах одной клетки, так и в соседних клетках, могут быть неоднородно распределены или неоднородно активированы, что может привести к появлению более или менее значительных локальных электрических полей. Примером такого рода могут служить локальные электрические токи, связанные с направленным транспортом в эпителиальных тканях животных (Jaffe, Nuccitelli, 1977; De Loof, 1985; Harold, 1986).

В 40-х гг. прошлого века Ходжкин и Раштон (Hodgkin, Rushton, 1946) экспериментально показали, что такие одиночные волокна, как гигантский аксон кальмара, ведут себя подобно электрическому кабелю. В аксон вводили микроэлектрод и пропускали через него ток, создавая в этой точке изменение МП. С помощью второго микроэлектрода измеряли разность потенциалов на мембране на разных расстояниях от первого электрода. Потенциал спадал по экспоненте, и по графику спада потенциала можно было оценить характерные параметры кабеля. Измеряя напряжение на мембране непосредственно около токового электрода и зная силу пропускаемого тока, можно найти входное сопротивление волокна ( $R_{вх}$ ). Исходя из оценки диаметра волокна, рассчитали сопротивление мембраны аксона, которое



**Рис. 2.** Схема экспериментальной оценки с помощью стеклянных микроэлектродов электрических характеристик, связанных с энергетическими процессами в ПК, в эволюционно разных многоклеточных системах. *а* – Кончик трихома нитчатой цианобактерии *Phormidium uncinatum* с усилием “продавлен” через устье стеклянной микропипетки (чтобы предотвратить его смещение в ответ на засветку) в каплю дистиллированной воды. Внеклеточные электроды регистрировали между наружной каплей среды и дистиллированной водой в микропипетке сопротивление в несколько сотен МОм (Потапова и др., 1986). Узкий луч ( $d \approx 20$  мкм) фотосинтетически активного света ( $h\nu$ ) вызывает гиперполяризацию освещенных клеток, которая распространяется вдоль трихома. *б* – Регистрация внутриклеточными микроэлектродами градиентов МП между клетками на верхушке вегетативной гифы мицелиального гриба *Neurospora crassa*. Указаны величины МП в мВ. *в*, *г* – Схемы распространения электрических токов между участками многоклеточной системы с разной активностью генераторов МП, обусловленной локальной засветкой трихома (*в*) или отсутствием протонных насосов у передних клеток гифы (*г*).

оказалось очень мало по сравнению с изоляцией технических кабелей, и удельное сопротивление аксоплазмы, которое, напротив, оказалось примерно в 25 млн раз выше, чем у меди.

Эта работа (Hodgkin, Rushton, 1946) была удостоена Нобелевской премии, а введение представлений кабельной теории в практику работы электрофизиологов способствовало бурному прогрессу в этой области. В частности, эти представления были успешно использованы при анализе электрических взаимодействий в разнообразных системах живых клеток, связанных ПК: многоклеточных микроорганизмах, развивающихся зародышах, сердечной, мышечной и других тканях (Беркинблит и др., 1981).

Наличие прямого диффузионного обмена между клетками позволяет им, сохраняя индивидуальную неприкосновенность наследственных молекул, решать часть жизненных проблем, объединяя низкомолекулярные ресурсы и распределяя обязанности между соседями (Loewenstein, 1984). При рассмотрении функциональной роли ПК весьма плодотворным может быть использование представлений об энергетических функциях ионных градиентов через плазматическую мембрану. Важная характеристика эквивалентного электрического кабеля – пространственная константа ( $\lambda$ ). Это расстояние вдоль кабе-

ля, на котором затухает в  $e$  раз приложенный в точке электрический потенциал. Величина  $\lambda$  у всех многоклеточных объектов лежит в пределах от нескольких десятков до нескольких сотен мкм, т.е. электрическая связь эффективна для ограниченного числа клеток (Беркинблит и др., 1981). Например, в гифах мицелиального гриба *Neurospora crassa*, длина клетки которых составляет 50–100 мкм, такая функционально связанная группа должна состоять из 4–6 клеток. Однако чтобы понять, какие именно задачи решают группы клеток, обобществляя свои низкомолекулярные ресурсы, необходимо оценить одновременно динамику обмена через межклеточные каналы и функциональные характеристики отдельных клеток, составляющих связанную группу, что технически не очень просто осуществить (рис. 2).

Например, в экспериментах с трихомом нитчатой цианобактерии *Phormidium uncinatum* оказались эффективны внеклеточные электрические отведения. Трихом – это покрытая слизевым чехлом цепочка из сотен клеток диаметром 5 мкм, которая движется под действием света. Локальное воздействие на 10–20 клеток трихома фотосинтетически активным светом вызывало гиперполяризацию плазматической мембраны в месте освещения и распространение электрических токов через ПК, приводя к гиперпо-

ляризации неосвещенных участков трихома (Потапова и др., 1986; Aslanidi, Shalajpenok, 1991).

Электрические параметры соседних клеток на верхушке растущей гифы *N. crassa* оценивали с помощью стандартных внутриклеточных микроэлектродов (Potapova et al., 1988; Belozerskaya, Potapova, 1993). Чтобы вводить тонкие стеклянные иглолочки внутрь подвижного цилиндра диаметром 10–15 мкм, покрытого жестким хитиновым чехлом, приходилось тщательно подбирать твердость стекла, длину и угол наклона тонкой части микроэлектрода, а также прижимать верхушку гифы к поверхности агара стеклянным крючком, закрепленным на микроманипуляторе (Belozerskaya, Potapova, 1993). Теоретический модельный анализ показал, что небольшая группа клеток на верхушке растущей вегетативной гифы *N. crassa* эффективно функционирует как единый ансамбль, способный успешно решать задачу энергетической кооперации (Асланиди и др., 1997; Смолянинов, Потапова, 2003).

#### ВОЗМОЖНОСТИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ КООПЕРАЦИИ В СИСТЕМАХ ЖИВЫХ КЛЕТОК

В 80-х гг. прошлого века была разработана оригинальная математическая модель, связывающая энергетику и ионно-осмотический гомеостаз животной клетки (Aslanidi, Panfilov, 1986). В этой модели МП присутствует как гомеостазируемый параметр, т.е. модель учитывает тот факт, что при ухудшении энергообеспечения клетки в последнюю очередь лишаются энергии АТФ ионные насосы плазматической мембраны, так как у них константа связывания с АТФ ниже, чем у конкурентных внутриклеточных потребителей АТФ. Применение этой модели для анализа ситуации в многоклеточной системе с ПК показало, что если часть электрически связанных клеток окажется неспособной поддерживать свой ионный гомеостаз, то их “проблемы” могут быть решены ближайшими клетками с помощью электрической связи и ионных потоков через ПК. Однако при этом клеткам-генераторам придется тратить на “помощь соседям” собственные ресурсы АТФ (Асланиди и др., 1988, 1997).

Это модельное предсказание было проверено в экспериментах на смешанных культурах животных клеток с разной чувствительностью к блокатору ионных насосов клеточных мембран ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаз) убаину: высоко чувствительных к убаину фибробластов человека и резистентных к нему (от природы) клеток мыши. Эксперименты показали, что клетки мыши и человека в смешанной монослойной культуре устанавливают друг с другом эффективные ПК. Благодаря этим ПК в присутствии 1 мкМ убаина, полностью блокирующего ионные насосы фибробластов

человека, у всей популяции клеток в смешанной культуре длительное время устойчиво поддерживаются в пределах нормы такие существенные показатели ионно-осмотического гомеостаза, как МП и внутриклеточные концентрации ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  (Aslanidi et al., 1991; Асланиди и др., 1991). Межклеточные взаимодействия в такой ситуации носят характер энергетической кооперации, при которой “экспорт” энергии из клеток с активными насосами сопоставим с суммарным клеточным энергопроизводством.

Исходя из значения электрического тока  $I^*$ , генерируемого ионным насосом одиночной животной клетки и равному  $\sim 10^{-11}$  А (Веренинов, Марахова, 1986; Harold, 1986), можно оценить эффективность энергетической кооперации. Например, в экспериментах на смешанных культурах клеток человека и мыши регистрировалась разница между величинами МП ( $\Delta\text{МП}$ ) клеток-доноров и клеток-акцепторов, равная  $\sim 2$  мВ (Асланиди и др., 1988). Если принять, что в среднем сопротивление ПК между двумя клетками,  $R_{\text{ПК}}$ , равно  $\sim 100$  МОм (Chailakhyan et al., 1982; Graf et al., 1987), можно рассчитать величину межклеточного тока  $I^{**}$ , вызывающего регистрируемое в эксперименте падение напряжения на сопротивлении контакта:

$I^{**} = \Delta\text{МП}/R_{\text{ПК}} = 2 \times 10^{-11}$  А, который соответствует току  $I^*$ , генерируемому  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -насосом одиночной клетки.

Важно отметить, что во всем сообществе клеток с активными и неактивными ионными насосами поддерживаются не среднеарифметические значения между параметрами активных и неактивных клеток, а значения, присущие именно активным клеткам. Мы назвали это явление “эффектом лидера”, подчеркнув, что клетки с активными насосами обеспечивают нормальную жизнедеятельность соседей, поддерживая межклеточные ионные потоки за счет своих ресурсов АТФ. Сдвиг параметров ионно-осмотического гомеостаза происходит только после того, как у “лидеров” исчерпываются резервы увеличения мощности насосов (Асланиди и др., 1991).

Участие ПК в “энергетической поддержке” клеток одного типа клетками другого типа описано при ишемии миокарда (Bukauskas, 1982). В качестве естественной системы, реализующей технологию энергетической кооперации, можно рассмотреть растущую верхушку вегетативной гифы мицелиального гриба *N. crassa*.

### ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЕРХУШКИ РАСТУЩЕЙ ГИФЫ *N. crassa*

В классических исследованиях на клетках *N. crassa* с использованием внутриклеточных микроэлектродов (Slayman, 1965) было показано, что ингибиторы дыхания в течение 1 мин снижали МП от  $-200$  до  $-30$  мВ с восстановлением в течение 10 мин после отмывки ингибитора. Было выдвинуто предположение, что  $H^+$ -АТФаза грибной мембраны работает как генератор трансмембранного тока. Это предположение получило развитие в дальнейших электрофизиологических исследованиях (Slayman et al., 1973; Gradman et al., 1978), в частности при оценке величин МП и рН с помощью флуоресцентных красителей в экспериментах с мембранными везикулами, обогащенными  $H^+$ -АТФазами (Perlin et al., 1984, 1986). Основные принципы мембранного транспорта в гифах мицелиального гриба *N. crassa* следуют хемиосмотической схеме Митчелла (Mitchell, 1962, 1966): первичные протонные насосы генерируют трансмембранный градиент ионов  $H^+$ , который используется как источник энергии для накопления веществ трансмембранными вторичными белковыми транспортерами (Slayman et al., 1973; Slayman, Slayman, 1974; Slayman, 1977; Sanders et al., 1983; Rodrigues-Navarro et al., 1986; Blatt et al., 1987; Slayman et al., 1994).

В обзорной работе (Slayman, 1987) детально рассмотрены свойства ионных насосов плазматических мембран *N. crassa* ( $H^+$ -АТФаза) как генераторов очень сильных (по клеточным масштабам) электрических токов. Плотность молекул  $H^+$ -АТФазы в плазматических мембранах клеток *N. crassa* составляет  $(2-3) \times 10^{11}/\text{см}^2$ . Следовательно, для поддержания электрического тока величиной  $10 \text{ мкА}/\text{см}^2$  (соответствующего переносу  $6.2 \times 10^{13}$  ионов на  $1 \text{ см}^2$  за 1 с) каждая молекула фермента (через которую при гидролизе одной молекулы АТФ перекачивается один протон) должна работать со скоростью 200–300 оборотов/с. Этот электрический ток создает и поддерживает высокую трансмембранную разность потенциалов (в среднем  $-180$  мВ), которую и регистрируют в эксперименте с помощью внутриклеточных микроэлектродов (Slayman, 1965; Чайлахян и др., 1984). С использованием стандартных кабельных уравнений оценили величину пространственной константы  $\lambda$  ( $\sim 511$  мкм; Gradman et al., 1978). Кроме того, был сделан вывод, что при стехиометрии  $1H^+ : 1ATF$  насосы должны потреблять 38–52% суммарной продукции АТФ (Gradman et al., 1978).

В электрофизиологических экспериментах (Slayman, Slayman, 1962; Potapova et al., 1988; Takeuchi et al., 1988) было охарактеризовано продольное электрическое поле на переднем конце растущей гифы *N. crassa*. По нашим измерениям с помощью внутри-

клеточных микроэлектродов на расстоянии  $100 \text{ мкм}$  ( $L_1$ ) от переднего конца гиф *N. crassa* величина МП равна приблизительно  $-130 \text{ мВ}$  ( $V_{m1}$ ), а на расстоянии  $400 \text{ мкм}$  ( $L_2$ ) – приблизительно  $-160 \text{ мВ}$  ( $V_{m2}$ ) (Potapova et al., 1988; Потапова, Бойцова, 1997; Potapova, 2012).

Исходя из этих величин, можно оценить напряженность электрического поля ( $E$ ) вдоль переднего конца гифы:

$$E = (V_{m2} - V_{m1}) / (L_2 - L_1) = 30 \text{ мВ} / 300 \text{ мкм} = 100 \text{ В/м}.$$

В этом случае эквивалентную электрическую схему верхушки гифы можно представить в виде соединенных последовательно потребителей энергии, локализованных на участке длиной  $0.2-0.3 \text{ мм}$  (примерно 2–3 самых молодых сегмента), и электрических генераторов, локализованных в плазматической мембране более взрослых сегментов (Асланиди и др., 1997; Смолянинов, Потапова, 2003). При наличии электрической связи между соседними клетками, МП апикальных клеток поддерживаются на высоком уровне за счет работы  $H^+$ -АТФаз мембран более дистальных клеток. В такой ситуации дистальные клетки расходуют энергию собственных пулов АТФ на поддержание через ПК (септальные поры у гифы) межклеточных электрических токов, которые составляют от трети до половины токов, генерируемых обычной взрослой клеткой через собственную плазматическую мембрану. С помощью техники прижизненных флуоресцентных меток в начале XXI в. было показано, что в плазматических мембранах апикальных клеток вегетативных гиф, действительно, отсутствуют  $H^+$ -АТФазы (Riquelme et al., 2005; Fajardo-Somera et al., 2013).

В принципе, на верхушке гифы активно происходит митохондриальное дыхание, которое вырабатывает значительное количество АТФ и которое могло бы поддерживать работу  $H^+$ -АТФаз непосредственно в собственных клетках, создавая таким образом движущую силу для работы расположенных здесь вторичных транспортеров. Однако природа пошла по пути разной транспортной специализации плазматической мембраны молодых апикальных и более взрослых клеток, позволяя апикальным клеткам экономить ресурсы АТФ и направлять их на обеспечение синтеза и работы цитоскелетных элементов. Таким образом, исследование *N. crassa* позволило в прямом электрофизиологическом эксперименте продемонстрировать эффективность рассмотрения мембранного электрогенеза с позиций биоэнергетики для анализа функциональной роли ПК как механизма, обеспечивающего энергетическую кооперацию между соседними клетками. Локальные продольные токи и электрические поля, возникающие благодаря разделению труда между клетками по ге-

нерации и потреблению энергии МП, могут быть серьезным фактором самоорганизации системы электрически связанных клеток.

### СТРУКТУРНАЯ УПОРЯДОЧЕННОСТЬ АПИКАЛЬНОГО СЕГМЕНТА РАСТУЩЕЙ ГРИБНОЙ ГИФЫ

Гифа *N. crassa* представляет собой цепочку многоядерных сегментов длиной 50–100 мкм, септальные поры между которыми свободно пропускают растворенные вещества и даже органеллы и поддерживают электрическую связь вдоль гифы. Растет и развивается гифа путем поляризованного верхушечного роста (ВР) – векторного удлинения верхушек со скоростью 20–30 мкм/мин и периодического образования ветвей, которые также удлиняются на верхушках и ветвятся (Davis, 2000). В ходе ВР из более взрослых отделов гифы к точке удлинения на переднем конце поступают многочисленные везикулы, которые содержат необходимые для роста гифы материалы и с высокой скоростью сливаются с плазматической мембраной переднего конца. Благодаря достижениям современной экспериментальной биологии накоплен большой объем данных о структуре и динамике внутриклеточных систем, принимающих участие в ВР вегетативных гиф *N. crassa*, составлены карты-схемы многих метаболических путей, описано большое количество молекул-участников, в том числе белков-регуляторов. В одном из недавних обзоров на эту тему (Steinberg et al., 2017) цитируется 346 источников, в которых описаны молекулярно-генетические детали процессов на переднем конце гифы: экзоцитоза и эндоцитоза, септирования и организации потоков цитоплазмы, тонкости транспорта по сети аппарата Гольджи. Авторы сравнивают белки и структуры, принимающие участие в процессе ВР, с оркестром, исполняющим понятную музыку по непонятной партитуре при неизвестном дирижере, особо подчеркивая, что до сих пор не ясны механизмы участия ядер в процессе ВР.

Особенное внимание исследователей приковано к структурно-функциональной организации переднего конца растущей гифы *N. crassa*:

1) Непосредственно на расстоянии 1–2 мкм от переднего конца располагается Spitzkörper, или центр распределения везикул (который состоит из везикул, рибосом, актиновых волокон и аморфного материала неизвестной природы) (Davis, 2000).

2) Передний участок длиной ~20–30 мкм – это зона скопления нитевидных митохондрий (Potarova, 2012; Потапова и др., 2013; Potarova, Golyshev, 2016).

3) На переднем участке отсутствуют ядра (зона, свободная от ядер) (Davis, 2000; Freitag et al., 2004).

4) Первая септальная перегородка образуется на расстоянии, не ближе чем ~150 мкм от точки роста гифы (Delgado-Álvarez et al., 2014; Потапова и др., 2016), так что длина апикального сегмента всегда больше, чем средняя длина следующих гифальных сегментов.

5)  $H^+$ -АТФазы – основные генераторы МП у *N. crassa* – отсутствуют в апикальном сегменте гифы и встраиваются в плазматическую мембрану только за первой септальной перегородкой (Riquelme et al., 2005; Fajardo-Somera et al., 2013).

6) Значение МП на переднем участке длиной 150–200 мкм существенно ниже, чем в дистальной части гифы (Slayman, Slayman, 1962; Potarova et al., 1988; Belozerskaya, Potarova, 1993; Потапова, Бойцова, 1997).

7) На переднем участке длиной 100–150 мкм принципиально меняется характер движения микротрубочек (Mouriño-Pérez et al., 2006; Sugden et al., 2007; Held et al., 2010; Riquelme et al., 2011).

Изменение характера движения микротрубочек – очень важная особенность апикального сегмента гифы. Вдоль всей гифы микротрубочки встречаются в виде коротких палочек (длиной 5–10 мкм), которые свободно переносятся током цитоплазмы, проникая через септальные поры. В апикальном сегменте на переднем участке длиной 100–150 мкм микротрубочки образуют длинные тяжи, которые ориентируются строго параллельно оси гифы и перемещаются не потоком цитоплазмы, а с помощью собственной векторной сборки–разборки, требующей значительного расхода энергии в виде АТФ (Mouriño-Pérez et al., 2006; Held et al., 2010; Riquelme et al., 2011). В этой связи понятно, зачем на передних концах растущих гиф собираются нитевидные митохондрии и почему эффективность их скопления зависит от скорости удлинения гифы (Потапова и др., 2013). Коллеги из Великобритании (Sugden et al., 2007) количественно охарактеризовали работу микротрубочек по транспорту везикул к переднему концу растущей гифы *N. crassa*. В рамках их математической модели упорядоченный ансамбль из ~10 микротрубочек способен доставлять в зону роста достаточное количество везикул с материалами, чтобы обеспечить удлинение гифы со скоростью 25–30 мкм/мин. Однако возникает вопрос: чем и как регулируется образование упорядоченного ансамбля микротрубочек и митохондрий на переднем конце растущей гифы?

Возможно, что существенную роль в этом процессе играет локальное электрическое поле на переднем конце гифы. Изолированные микротрубочки в экспериментах *in situ* ориентируются и меняют скорость движения под влиянием электрического поля напряженностью  $2 \times 10^3$  В/м (Böhm et al., 2005;

Dujovne et al., 2008). По нашим оценкам (см. выше) напряженность электрического поля ( $E$ ) вдоль переднего конца гифы составляет 100 В/м. Эта величина на порядок меньше, чем в экспериментах *in situ*. Но может быть, в условиях живой клетки зарегистрированное нами электрическое поле также может влиять на ориентацию, расположение и скорость движения согласованного ансамбля микротрубочек и митохондрий. Во всяком случае, факт отсутствия в апикальном сегменте гифы  $H^+$ -АТФаз — основных генераторов МП у *N. crassa* (Riquelme et al., 2005; Fajardo-Somera et al., 2013) — и поддержание за счет этого локального постоянного электрического поля, безусловно, следует учитывать при анализе механизмов самоорганизации внутриклеточных структур в этой области.

### ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СВЯЗЬ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ТРИХОМАХ НИТЧАТЫХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ С ЭНЕРГЕТИКОЙ

Способность к энергетической кооперации между клетками с помощью межклеточной электрической связи, по-видимому, появилась на заре эволюции миллиарды лет назад как структурно-функциональная база для разделения труда в трихомах нитчатых цианобактерий — первых многоклеточных организмов нашей планеты (Потапова, Кокшарова, 2020). Трихомы цианобактерий — это нити из сотен клеток, связанных межклеточными взаимодействиями. В трихомах некоторых цианобактерий в отсутствие азота развивается специализация клеток для решения разных функциональных задач: 1) фотосинтеза с выделением кислорода и 2) фиксации азота, для которой кислород является ингибитором. Таким образом, трихом превращается в некий организм с обменом продуктами фотосинтеза и фиксации азота между вегетативными клетками и гетероцистами.

Реализовать такое разделение труда нитчатые цианобактерии смогли за счет приобретения в ходе эволюции способности не просто создавать встроенные в мембраны структурно-функциональные белковые комплексы, но и пространственно разделять их вплоть до размещения в разных клетках. Объединение функционально связанных белков в такие комплексы и их размещение на расстоянии друг от друга в однотипной мембране или в разнотипных мембранах одной и той же клетки, а также распределение по разным клеткам — явление динамичное и зависящее как от состояния самих клеток, так и от условий внешней среды. В связи с этим возникает много вопросов о механизмах регуляции этой динамики. Например, вопрос: как конкретные белки находят свое место в разных мембранах? Ответа пока нет.

Цианобактерии — очень популярный лабораторный объект. В настоящее время достаточно полно изучены детали морфологии, физиологии и генетики межклеточных взаимодействий в трихомах (Flores et al., 2019). Для модельной цианобактерии, образующей гетероцисты, *Anabaena sp.* strain PCC 7120, охарактеризованы обязательные компоненты септальных контактов: белки SepJ, FraC и FraD, а также еще ряд белков, важных для формирования нормального количества межклеточных нанопор и их функционирования, включая некоторые амилазы, белки, связывающие пептидогликан, и несколько мембранных транспортеров. Специалисты по цианобактериям отмечают функциональное сходство септальных контактов между клетками в трихомах цианобактерий с щелевыми контактами животных, описанными в литературе (см. обзор: Herve, Derangeon, 2013).

При анализе функциональных свойств трихомов с разделением труда между вегетативными клетками и гетероцистами серьезную проблему представляет описание потоков энергии (Magnuson, 2019). В решении этой проблемы может помочь обращение к принципам мембранной энергетики и представлениям о возможности энергетической кооперации между клетками с помощью электрической связи через ПК (Потапова, Кокшарова, 2020). Мембранные системы вегетативных клеток конвертируют солнечную энергию в биохимическую посредством оксигенного фотосинтеза, создавая значительные по величине МП, с помощью которых происходит синтез АТФ. Фотосинтетические системы имеют близкий ферментный состав у цианобактерий, водорослей и высших растений. Но у водорослей и высших растений фотосинтез происходит в специальных органеллах (тилакоидах), а у цианобактерий — в разных зонах одной и той же непрерывной мембранной системы, объединяющей тилакоидные мембраны и плазматическую мембрану клетки (Mullineaux, 2014).

В тилакоидных и плазматических мембранах гетероцист не происходит оксигенного фотосинтеза, создающего МП, необходимый для работы АТФ-синтаз, но при этом функционирует АТФ-синтаза (Telor, Stewart, 1976; Ernst et al., 1983), активность которой, очевидно, поддерживается благодаря распространению через ПК гиперполяризации плазматической мембраны, генерируемой вегетативными клетками (Chailakhyan et al., 1982; Потапова и др., 1986). Изучение деталей строения АТФ-синтазы цианобактерий приводит к заключению, что для производства 1 молекулы АТФ требуется перенести через мембрану 4–5 ионов  $H^+$  (Muller, Hess 2017; Pogorelov et al., 2012), что ниже по эффективности, чем у митохондриальных АТФ-синтаз млекопитающих, но близко к тилакоидам растений. Можно ориентировочно

оценить величину мощности, передаваемой вдоль трихома через межклеточные каналы. В экспериментах с локальным освещением от 2-х до 10 клеток трихома, фиксированного в устье микропипетки (рис. 2), мы регистрировали скачок разности потенциалов  $\Delta V$  величиной около 20 мВ при сопротивлении микропипетки  $R = 400$  Мом (Потапова и др., 1986; Aslanidi, Shalapjenok, 1991). Исходя из этих данных, можно оценить внеклеточный ток  $I = \Delta V/R = 50$  пА. Поскольку электрический ток в 1 пА переносит  $6 \times 10^6$  электрических зарядов за 1 с, а для синтеза 1 молекулы АТФ необходим перенос 4–5 “горячих” протонов через молекулу внутримембранной АТФ-синтазы (Pogorelov et al., 2012; Muller, Hess, 2017), можно заключить, что освещенные клетки обеспечивают темновым клеткам трихома возможность производить около  $6 \times 10^7$  АТФ/с. Оборот АТФ в бактериальной клетке составляет в среднем  $(1-7) \times 10^7$  АТФ/с (Chapman, Atkinson, 1977). Таким образом, передача энергии вдоль трихома может быть сопоставима с суммарным клеточным энергопроизводством.

### ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Одна из центральных задач современной биологии – понять, как живая клетка создает, поддерживает и воспроизводит свою пространственную структуру, устанавливая взаимодействия с соседними клетками и с окружающей средой. Известный микробиолог и биоэнергетик Харольд (Harold, 2001, 2005) утверждает, что новый продукт работы генома всегда оказывается в клетке с уже существующей структурой и вынужден работать под влиянием уже существующего порядка. В этом плане при анализе проблемы самоорганизации в любой небольшой группе клеток важно принимать во внимание вероятность наличия локальных электрических полей, которые создаются неравномерным распределением между клетками генераторов МП, расходующих энергию внутренних или внешних ресурсов, и потребителей энергии, аккумулированной в форме МП (рис. 1).

Такого рода электрические явления описаны для эволюционно различных организмов и по праву могут быть отнесены к универсальным естественным технологиям биологических систем, согласно представлениям Уголева (Уголев, 1987). У нитчатых цианобактерий, благодаря межклеточной электрической связи, фотосинтезирующие вегетативные клетки могут оказывать энергетическую поддержку фиксирующим азот гетероцистам (Потапова, Кокшарова, 2020). Неслучайно в нитях цианобактерий гетероцисты располагаются через каждые 10–15 вегетативных клеток (Herrero et al., 2016). Это доста-

точно удобно, чтобы эффективно использовать электрические кабельные свойства трихома.

Мицелиальные грибы приобрели в ходе эволюции уникальное свойство:  $H^+$ -АТФазы (основные генераторы МП) отсутствуют в плазматической мембране апикального сегмента (Riquelme et al., 2005; Fajardo-Somera et al., 2013). Удлинение гифы диаметром 10–15 мкм со скоростью 20–30 мкм/мин обеспечивается путем экзоцитоза на переднем конце везикул, содержащих ферменты и предшественники синтезов клеточной стенки, со скоростью ~40000 везикул/с (Davis, 2000). Везикулы поступают к растущему концу из мицелия с расстояний до 1 см с потоком цитоплазмы, но в апикальном сегменте их движение перестает быть потоком, а становится пошаговым движением по микротрубочкам (Mouriño-Pérez et al., 2006; Held et al., 2010; Riquelme et al., 2011). В рамках математической модели (Sugden et al., 2007) обеспечить такое движение может ансамбль из 10 микротрубочек, ориентированных вдоль оси гифы. Работа микротрубочек требует значительных ресурсов АТФ, так же, как и процессы, обеспечивающие последующее слияние везикул с плазматической мембраной. В связи с этим устранение из апикального сегмента такого мощного конкурентного потребителя АТФ, как  $H^+$ -АТФаза, – это эффективное конструктивное решение, тем более что благодаря электрической связи апикального сегмента с остальной гифой отсутствие генераторов МП на переднем участке гифы длиной ~200 мкм создает здесь сильное локальное электрическое поле (см. выше), которое безусловно должно способствовать упорядочиванию расположения и взаимодействий внутриклеточных молекул и частиц. Осталось понять, как это конструктивное решение запрограммировано в геноме.

В последние годы бурно обсуждается возможная роль локальных электрических полей в регуляции работы генома на клеточном уровне (Blackiston et al., 2009; Levin, 2014, 2017; Pai et al., 2015, 2016; Pietak, Levin, 2017; Cervera et al., 2018, 2020; Cao Lin et al., 2018; Fields et al., 2018). С этих позиций было бы полезно проанализировать более детально события, происходящие в апикальном сегменте растущей вегетативной гифы *N. crassa*, где высокая скорость удлинения гифы обеспечивается согласованным взаимодействием внутриклеточных структур в сильном локальном электрическом поле.

Несмотря на огромные массивы экспериментальных данных на молекулярно-генетическом и клеточном уровне о событиях, происходящих в апикальном сегменте, остается практически не освещенной роль ядер в ВР *N. crassa* (Borkovich et al., 2004; Riquelme et al., 2011, 2018; Steinberg et al., 2017).

Технически неразрешимой оказывается задача наблюдать за поведением каждого из 20–30 динамичных и асинхронно делящихся ядер диаметром 2–3 мкм внутри гифального цилиндра диаметром 10–20 мкм, непрерывно удлиняющегося со скоростью 20–30 мкм/мин. Один из подходов к решению этой задачи – наблюдение за динамикой и делением ядер в экспериментах на проростках спор *N. crassa* – зачатках вегетативных гиф, имеющих в первые 10 ч развития меньший диаметр и меньшую скорость удлинения, чем взрослая гифа (Rosa et al., 2010). Мы предлагаем (как удобный экспериментальный подход) использовать изолированные верхушки вегетативных гиф *N. crassa*, которые после отделения от материнского мицелия продолжают удлинение в прежнем направлении, но с меньшей скоростью и меньшим диаметром, чем у связанных с мицелием гиф. При этом сохраняются структурно-функциональные особенности организации апикального сегмента (Потапова и др., 2016, 2018).

В наши дни полностью расшифрованы геномы десятков организмов, описаны в деталях многие процессы на молекулярно-генетическом уровне, но мы все еще далеки от понимания, как записанные в геноме программы роста и развития реализуются на материальных носителях во времени и в пространстве. При дальнейших исследованиях в этой области важно учитывать, что с позиций биоэнергетики (Mitchell, 1962, 1966; Skulachev 1988; Скулачев и др., 2010) в многоклеточных системах возможно разделение труда между соседними клетками по запасанию и использованию энергии, аккумулированной в форме МП, при условии передачи энергии с помощью межклеточной электрической связи через ПК (Асланиди и др., 1988; Potapova, 1991; Potapova, Aslanidi, 1995). Такого типа разделение труда между клетками сопровождается генерацией и поддержанием локальных электрических полей, которые могут оказывать влияние на клеточную активность на молекулярном и генетическом уровне (Blackiston et al., 2009; Levin, 2014; Cervera et al., 2020) и быть количественно охарактеризованы (с помощью электрофизиологических технологий) и проанализированы в рамках представлений кабельной теории (Hodgkin, Rushton, 1946; Беркинблит и др., 1981).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен А.Я. Дуниной-Барковской и С.А. Гольшеву за помощь в подготовке рукописи и рисунков к печати.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственной программы № 0120.0 894191 Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не было экспериментов с участием животных или людей.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Асланиди К.Б., Потапова Т.В., Чайлахян Л.М. 1988. Транспорт энергии через высокопроницаемые контактные мембраны. Биол. мембраны Т. 5. № 6. С. 613. (Aslanidi K.B., Potapova T.V., Chailakhyan L.M. 1988. Transport of energy through the high permeable contact membranes. Biol. Membr. (Russ.). V. 5. № 6. P. 613.)
- Асланиди К.Б., Бойцова Л.Ю., Виноградова Т.Н., Кублик Л.Н., Марихова И.И., Мох В.Н., Потапова Т.В., Трепакова Е.К., Чайлахян Л.М. 1991. Поддержание ионно-осмотич. гомеостаза в многоклеточных системах животных: роль проницаемых контактов. Биол. мембраны. Т. 8. № 8. С. 837. (Aslanidi K.B., Boitzova L.Ju., Vinogradova T.A., Kublik L.N., Mokh V.P., Marachova I.I., Potapova T.V., Trepakova E.S., Chailakhyan L.M. 1992. Maintenance of ion-osmotic homeostasis in multicellular animal systems: The role of permeable junctions. Biol. Membr. (Russ.). V. 5. № 8. P. 1244.)
- Асланиди К.Б., Асланиди О.В., Вачадзе Д.М., Морнев О.М., Потапова Т.В., Чайлахян Л.М., Штеманетян Е.Г. 1997. Анализ электрических явлений, сопровождающих рост гифы *N. crassa*. Теория и эксперимент. Биол. мембраны. Т. 14. № 3. С. 285. (Aslanidi K.B., Aslanidi O.V., Vachadze D.M., Mornev O.A., Potapova T.V., Chailakhyan L.M., Shtemanetian E.G. 1997. Analysis of electrical phenomena accompanying the growth of *Neurospora crassa* hyphae. Membr. Cell Biol. (Russ.). V. 14. № 3. P. 349.)
- Беркинблит М.Б., Божкова В.П., Бойцова Л.Ю., Миттельман Л.А., Потапова Т.В., Чайлахян Л.М., Шаровская Ю.Ю. 1981. Высокопроницаемые контактные мембраны. М.: Наука. 466 с. (Berkinblit M.B., Bozkova V.P., Boitzova L.Ju., Mittelman K.A., Potapova T.V., Chailakhyan L.M., Sharovskaya Yu. Yu. 1981. Highly Permeable Junction Membranes. M.: Nauka. 466 pp.)
- Веренинов А.А., Марихова И.И. 1986. Ионный транспорт у клеток в культуре. Л.: Наука. 292 с. (Vereninov A.A., Marakchova I.I. 1986. Cell Ion Transport in Culture. L.: Nauka. 292 p.)
- Потапова Т.В., Асланиди К.Б., Шалапенюк А.А., Карнаухов В.Н., Чайлахян Л.М. 1986. Фотоэлектрическая активность и спектральные характеристики одиночного трихома цианобактерии *Phormidium uncinatum*. Докл. АН СССР. Т. 290. № 6. С. 912. (Potapova T.V., Aslanidi K.B., Shalapyenok A.A., Karnauhov V.N., Chailakhyan L.M. 1986. Photoelectric activity and spectral characteristics of individual trihome of cyanobacterium *Phormidium uncinatum*. Dokl. Acad. Nauk USSR V. 290. № 6. P. 912.)
- Потапова Т.В., Бойцова Л.Ю. 1997. Структура, функция, управление. – Возможности экспериментального анализа в группах невозбудимых клеток, связанных проницаемыми контактами. Биол. мембраны. Т. 14. № 6. С. 661. (Potapova T.V., Boitzova L.Ju. 1998. Structure,

- function, regulation: experimental analysis in groups of non-exitable cells coupled via permeable junctions. *Membr. Cell Biol. (Russ.)*. V. 11. № 6. P. 817.)
- Потапова Т.В., Бойцова Л.Ю., Гольшев С.А., Попинако А.В. 2013. Организация митохондрий в растущей гифе *Neurospora crassa*. *Цитология*. Т. 55. № 11. С. 826. (Potapova T.V., Boitsova L.Ju., Golyshev S.A., Popinako A.V. 2014. The organization of mitochondria in growing hyphae of *Neurospora crassa*. *Cell Tiss. Biol.* V. 7. P. 166.)
- Потапова Т.В., Бойцова Л.Ю., Гольшев С.А., Дунина-Барковская А.Я. 2016. Верхушечный рост *Neurospora crassa* при дефиците ресурсов: нарушение согласованности удлинения, ветвления и септирования. *Цитология*. Т. 58. № 8. С. 634. (Potapova T.V., Boitsova L.Yu., Golyshev S.A., Dunina-Barkovskaya A.Ya. 2016. Tip growth of *Neurospora crassa* upon resource shortage: disturbances of the coordination of elongation, branching, and septation. *Cell Tiss. Biol.* V. 10. P. 486.)
- Потапова Т.В., Белозерская Т.А., Гольшев С.А., Дунина-Барковская А.Я. 2018. Рост и развитие изолированных верхушек гиф *Neurospora crassa* в среде с сорбитом. *Цитология*. Т. 60. № 1. С. 42. (Potapova T.V., Belozerskaya T.A., Golyshev S.A., Dunina-Barkovskaya A.Ya. 2018. Growth and development of isolated hyphal tips of *Neurospora crassa* in the sorbitol-containing medium. *Cell Tiss. Biol.* V. 12. P. 256.)
- Потапова Т.В., Кошарова О.А. 2020. Нитчатые цианобактерии как прототип многоклеточных организмов. *Физиология растений*. Т. 67. № 1. С. 20. (Potapova T.V., Koksharova O.A. 2020. Filamentous cyanobacteria as a prototype of multicellular organisms. *Russ. J. Plant Physiol.* V. 67. №. 1. P. 20. <https://doi.org/10.1134/S102144372001015X>)
- Скулачев В.П. 1977. Аденозинтрифосфат и трансмембранный потенциал ионов водорода – две конвертируемые и транспортабельные формы энергии в живой клетке. *Успехи соврем. биол.* Т. 84. № 1. С. 165. (Skulachev V.P. 1977. Adenosine triphosphate and the transmembrane hydrogen ion potential – 2 convertible and transportable forms of energy in the living cell. *Usp. Sovrem. Biol. (Russ.)* V. 84. № 1. P. 165.)
- Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. 2010. Мембранная биоэнергетика: учебное пособие. М.: Изд-во Московского университета. 368 с. (Skulachev V.P., Bogachev A.V., Kasparinsky F.O. 2010. Membrane bioenergetics. М: University Press. 368 p.)
- Смолянинов В.В., Потапова Т.В. 2003. Оценка критической длины фрагмента гифы *Neurospora crassa*. *Биол. мембраны*. Т. 20. № 4. С. 304. (Smolianinov V.V., Potapova T.V. 2003. Estimation of the critical length of growing *Neurospora crassa* hyphae. *Biol. membr. (Russ.)*. V. 20. №. 4. P. 304.)
- Уголев А.М. 1987. Естественные технологии биологических систем. Л.: Наука. (Ugolev A.M. 1987. Natural technologies of biological systems. L.: Nauka).
- Чайлахян Л.М., Левина Н.Н., Белозерская Т.А., Потапова Т.В. 1984. Изучение межклеточных взаимодействий у микелиального гриба *N. crassa* в связи с фотоэлектрическими изменениями в мембранах. *Биол. мембраны*. Т. 1. № 1. С. 44. (Chailakhyan L.M., Levina N.N., Belozerskaya T.A., Potapova T.V. 1984. Investigation of intercellular interactions in mycelial fungus *Neurospora crassa* in connection with the photoelectric changes in membranes. *Biol. membr. (Russ.)*. V. 1. № 1. P. 44.)
- Aslanidi K.B., Panfilov A.V. 1986. The Boyle–Conway model including the effect of an electrogenic pump for nonexitable cells. *Mathem. Biosci.* V. 79. P. 45.
- Aslanidi K.B., Shalapjenok A.A. 1991. Energetics of local cell-to-cell interactions in phototrophic organisms. In: *Intercellular communication: Proceedings in nonlinear science*. Manchester Univ. Press. P. 12.
- Aslanidi K.B., Boitsova L.Ju., Chailakhyan L.M., Kublik L.N., Marachova I.I., Potapova T.V., Vinogradova T.N. 1991. Energetic cooperation via ion-permeable junctions in mixed cell cultures. *FEBS Letters* V. 283. P. 295.
- Belozerskaya T.A., Potapova T.V. 1993. Intrahyphal communication in segmented mycelium. *Exper. mycol.* V. 17. P. 157.
- Blackiston D.J., McLaughlin K.A., Levin M. 2009. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell Cycle*. V. 821. P. 3527.
- Blatt M., Slayman C.L. 1987. Role of “active” potassium transport in regulation of cytoplasmic pH by non-animal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 84. P. 2737.
- Böhm K.J., Nikolaos E. Mavromatos N.E., Michette A., Stracke R., Unger E. 2005. Movement and alignment of microtubules in electric fields and electric-dipole-moment estimates. *Electromag. Biol. Med.* V. 24. P. 319.
- Borkovich K.A., Alex L.A., Yarden O., Freitag M., Turner G.E., Read N.D., Seiler S., Bell-Pedersen D., Paietta J., Plesofsky N., Plamann M., Goodrich-Tanrikula M., Schulte U., Mannhaupt G., Nargang et al. 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* V. 68. P. 1.
- Bukauskas F.F. 1982. Electrophysiology of the normal-to-hypoxic transition zone. *Circ. Res.* V. 51. P. 321.
- Cao Lin, Liu Jie, Collinson J.M. Forrester J.V., McCaig C.D. 2018. Endogenous bioelectric currents promote differentiation of the mammalian lens. *J. Cell Physiol.* V. 233. P. 2202.
- Cervera J., Manzanares J.A., Mafe S. 2018. Cell-cell bioelectric interactions and local heterogeneities in genetic networks: a model for stabilization of single-cell states and multicellular oscillations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* V. 20. P. 9343. <https://doi.org/10.1039/C8CP00648B>
- Cervera J., Levin M., Mafe S. 2020. Bioelectric coupling of single-cell states in multicellular systems. *J. Phys. Chem. Lett.* V. 11. P. 3234. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.0c00641>
- Chailakhyan L.M., Glagolev A.N., Glagoleva T.N., Murvanidze G.M., Potapova T.V., Skulachev V.P. 1982. Intercellular power transmission along trichomes of cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 679. P. 60.
- Chapman A.G., Atkinson D.E. 1977. Adenine nucleotide concentrations and turnover rates. Their correlation with biological activity in bacteria and yeast. *Adv. Microb. Physiol.* V. 15. P. 253.
- Crane R.K. 1977. The gradient hypothesis and other models of carrier-mediated active transport. *Rev. Physiol. Pharmacol.* V. 78. P. 99.
- Davis R.H. 2000. *Neurospora: Contributions of a model organism*. Oxford Univ. Press.

- Delgado-Álvarez D.L., Bartnicki-García S., Seiler S., Mouriño-Pérez R.R.* 2014. Septum development in *Neurospora crassa*: The septal actomyosin tangle. *PLOS One*. V. 9. P. e96744.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096744>
- De Loof A.* 1985. The cell as a miniature electrophoresis chamber. *Comp. Biochem. Physiol.* V. 80A. P. 453.
- Dujovne I., van den Heuvel M., Shen Y., de Graaff M., Dekker C.* 2008. Velocity modulation of microtubules in electric fields. *Nano Lett.* V. 8. P. 4217.
- Ernst A., Bohme H., Boger P.* 1983. Phosphorylation and nitrogenase activity in isolated heterocysts of *Anabaena variabilis* (ATCC-29413). *Biochim. Biophys. Acta.* V. 723. P. 83.
- Fajardo-Somera R.A., Bowman B., Riquelme M.* 2013. The plasma membrane proton pump PMA-1 is incorporated into distal parts of the hyphae independently of the Spitzenkörper in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell.* V. 12. P. 1097.
- Fields C., Levin M.* 2017. Multiscale memory and bioelectric error correction in the cytoplasm-cytoskeleton-membrane system. *WIREs Syst. Biol. Med.*, e1410.  
<https://doi.org/10.1002/wsbm.1410>
- Flores E., Nieves-Morion M., Mullineaux C.W.* 2019. Cyanobacterial septal junctions: properties and regulation. *Life*. V. 9. P. 1.  
<https://doi.org/10.3390/life9010001>
- Freitag M., Hickey P.C., Raju N.B., Selker E.U., Read N.D.* 2004. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* V. 41. P. 897.
- Gradman D, Hansen U-P, Long W.S., Slayman C.L., Warncke J.* 1978. Current-voltage relationships for the plasma membrane and its principal electrogenic pump in *Neurospora crassa*. *J. Membr. Biol.* V. 39. P. 333.
- Graf J., Handerson R.M., Krampholz B., Boyer J.L.* 1987. Cell membranes and transepithelial voltages and resistances in isolated rat hepatocyte couplets. *J. Membr. Biol.* V. 95. P. 241.
- Harold F.M.* 1986. The vital force: A study of bioenergetics. N.-Y.: WH Freeman.
- Harold F.M.* 2001. The way of the cell: Molecules, organisms and the order of life. Oxford Univ. Press. 305 p.
- Harold F. M.* 2005. Molecules into cells: Specifying spatial architecture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* V. 69. P. 544.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.694.544-564>
- Held M., Edwards C., Nicolau D.V.* 2010. Temporal and spatial *in vivo* optical analysis of microtubules in *Neurospora crassa*. In: Imaging, manipulation, and analysis of biomolecules, cells, and tissues. VIII. Proc. SPIE. 75680V.
- Herrero A., Stavans J., Flores E.* 2016. The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* V. 40. P. 831.  
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuw029>
- Herve J.C., Derangeon M.* 2013. Gap-junction-mediated cell-to-cell communication. *Cell Tiss. Res.* V. 352. P. 21.
- Hodgkin A.L., Rushton W.A.H.* 1946. The electrical constants of a crustacean nerve fibre. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* V. 133. P. 444.
- Jaffe L. F., Nuccitelli R.* 1974. An ultrasensitive vibrating probe for measuring steady extracellular currents. *J. Cell Biol.* V. 63. P. 614.
- Kanno Y., Loewenstein W. R.* 1964. Low-resistance coupling between gland cells. Some observation on intercellular contact membranes and intercellular space. *Nature*. V. 201. P. 194.
- Levin M.* 2014. Endogenous bioelectrical networks store non-genetic patterning information during development and regeneration. *J. Physiol.* V. 592. P. 2295.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.271940>
- Loewenstein W.R.* 1984. Cell individuality and connectivity, an evolutionary compromise. In: Individuality and determinism. (S.W. Fox ed.). N.Y.: Plenum Publ. Corp. P. 77.
- Magnuson A.* 2019. Heterocyst thylakoid bioenergetics. *Life*. V. 9. P. 13.  
<https://doi.org/10.3390/life9010013>
- McLaughlin K.A., Levin M.* 2018. Bioelectric signaling in regeneration: Mechanisms of ionic controls of growth and form. *Dev Biol.* V. 433. P. 177. <https://doi.org/10.1006/dev.2017.1225>  
Dec 25  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.08.032>
- Mitchell P.* 1962. Metabolism, transport and morphogenesis: which drives which? *J. Gen. Microbiol.* V. 29. P. 25.
- Mitchell P.* 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Cambridge Philosoph. Soc.* V. 41. P. 445.
- Mourino-Perez R.R., Robertson R.W., Bartnicki-Garcia S.* 2006. Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. *Fungal Gen. Biol.* V. 43. P. 389.
- Muller V., Hess V.* 2017. The minimum biological energy quantum. *Front. Microbiol.* V. 8. P. 7.
- Mullineaux C.W.* 2014. Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1837. P. 503.
- Pai V.P., Lemire J.M., Pare J.-F., Lin G., Chen Y., Levin M.* 2015. Endogenous gradients of resting potential instructively pattern embryonic neural tissue via Notch signaling and regulation of proliferation. *J. Neurosci.* V. 35. P. 4366.
- Pai V.P., Martyniuk C.J., Echeverri K., Sundelacruz S., Kaplan D.L., Levin M.* 2016. Genome-wide analysis reveals conserved transcriptional responses downstream of resting potential change in *Xenopus* embryos, axolotl regeneration, and human mesenchymal cell differentiation. (Open Access).  
<https://doi.org/10.1002/reg2.48>
- Perlin D.S., Kasamo K., Brooker R.J., Slayman C.W.* 1984. Electrogenic H<sup>+</sup> translocation by the plasma membrane ATPase of *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* V. 259. P. 7884.
- Perlin D.S., San Francisco M.O.D., Slayman C.W., Rosen B.P.* 1986. Proton-ATP stoichiometry of proton pumps from *Neurospora crassa* and *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 248. P. 53.
- Pietak A., Levin M.* 2017. Bioelectric gene and reaction networks: computational modelling of genetic, biochemical and bioelectrical dynamics in pattern regulation. *J. R. Soc. Interface.* V. 14. P. 20170425.  
<https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0425>
- Pogorelov D., Klyszejko A.L., Krasnoselska G.O., Heller E.M., Leone V., Langerd J.D., Vonck J., Muller D.J., Faraldo-Gomez J.D., Meier T.* 2012. Engineering rotor ring stoichiometries in the ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. USA.* V. 109. P. E1599.
- Potapova T.V.* 1991. Energetic functions of permeable intercellular junctions. In: Intercellular communication. Manchester Univ Press. P. 143.

- Potapova T.V. 2012. Cell-to-cell communication in the tip growth of mycelial fungi. In: Biocommunication in Fungi. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. P. 103.
- Potapova T.V., Aslanidi K.B. 1995. Energy coupling of adjacent cells as an universal function of cell-to-cell permeable junctions. Progress Cell Res. V. 4. P. 53.
- Potapova T.V., Aslanidi K.B., Belozerskaya T.A., Levina N.N. 1988. Transcellular ionic currents studied by intracellular potential recordings in *Neurospora crassa* hyphae. (Transfer of energy from proximal to apical cells). FEBS Lett. V. 241. P. 173.
- Potapova T.V., Golyshev S.A. 2016. Revisiting a special structural order of a growing tip of the *Neurospora crassa* hypha. Fungal Genom Biol. V. 6. P. 135. <https://doi.org/10.4172/2165-8056.1000135>
- Riquelme M., Freitag M., Leon-Hing E.S., Bowman B. 2005. Live imaging of the secretory pathway in hyphae of *Neurospora crassa*. Fungal Genetics Conference. (2005) "XXIII Fungal Genetics Conference". Fungal Genetics Reports. V. 52, Article 11. P. 52. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1130>
- Riquelme M., Yarden O., Bartnicki-Garcia S., Bowman B., Castro-Longoria E., Free S.J., Fleibner A., Freitag M., Lew R., Mourino-Perez R., Plamann M., Rasmussen C., Richthammer C., Roberson R.W., Sanchez-Leon E., et al. 2011. Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha – a model cell for polarized growth. Fungal Biol. V. 115. P. 446. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.008>
- Riquelme M., Aguirre J., Bartnicki-Garcia S., Braus G.H., Feldbrugge M., Fleig U., Hansberg W., Herrera-Estrella A., Kamper J., Kuck U., Mourino-Perez R.R., Takeshita N., Fisher R. 2018. Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. Microbiol. Mol. Biol. Rev. V. 82. e00068. <https://doi.org/10.1128/MMBR00068-17>
- Roca M.G., Kuo H-Ch., Lichius A., Freitag M., Read N.D. 2010. Nuclear dynamics, mitosis and the cytoskeleton during the early stages of colony initiation in *Neurospora crassa*. Eukar. Cell V. 9. P. 1171. <https://doi.org/10.1128/EC.00329-09>
- Rodriguez-Navarro A., Blatt M.R., Slayman C.L. 1986. A potassium-proton symport in *Neurospora crassa*. J. Gen. Physiol. V. 87. P. 649.
- Sanders D., Slayman C.L., Pall M.L. 1983. Stoichiometry of H<sup>+</sup>/amino acid cotransport in *Neurospora crassa* revealed by current-voltage analysis. Biochim. Biophys. Acta. V. 735. P. 67.
- Skulachev V.P. 1988. Membrane Bioenergetics. Berlin: Springer-Verlag. 442 pp.
- Slayman C.L. 1965. Electrical properties of *Neurospora crassa*: effects of external cations on the intracellular potential. J. Gen. Physiol. V. 49. P. 69.
- Slayman C.L. 1977. Energetics and control of transport in *Neurospora*. In: Water relations in membrane transport in plants and animals. N.Y.: Acad. Press. P. 69.
- Slayman C.L. 1987. The plasma membrane ATPase of *Neurospora*: A proton-pumping electroenzyme. J. Bioenerget. Biomemb. V. 19. P. 1.
- Slayman C.L., Slayman C.W. 1962. Measurements of membrane potential in *Neurospora*. Science. V. 136. P. 876.
- Slayman C.L., Slayman C.W. 1974. Depolarization of the plasma membrane of *Neurospora* during active transport of glucose: Evidence for a proton-dependent cotransport system. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. V. 71. P. 1935.
- Slayman C.L., Long W.S., Lu C.Y.-H. 1973. The relation between ATP and an electrogenic pump in the plasma membrane of *Neurospora crassa*. J. Membr. Biol. V. 14. P. 305.
- Slayman C.L., Bertl A., Blatt M.R. 1994. Partial reaction chemistry and charge displacement by the fungal plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase. In: NATO ASI Series. V. H 89. Molecular and cellular mechanisms of H<sup>+</sup>-transport. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. P. 237.
- Steinberg G., Penalva M.A., Riquelme M., Wosten H.A., Harris S.D. 2017. Cell biology of hyphal growth. Microbiol. Spectrum. V. 5, FUNK-0034-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiospec.FUNK-0034-2016>
- Sugden K.E.P., Evans M.R., Poon W.C.K., Read N.D. 2007. Model of hyphal tip growth involving microtubule-based transport. Phys. Rev. E Stat. Nonlin Soft Matter Phys. V. 75. P. 031909-1. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.75.031909>
- Takeuchi Y., Schmid J., Caldwell J.H., Harold F.M. 1988. Transcellular ion currents and extension of *Neurospora crassa* hyphae. J. Membr. Biol. V. 101. P. 33.
- Telore E., Stewart W.D.P. 1976. Photosynthetic electron transport, ATP synthesis and nitrogenase activity in isolated heterocysts of *Anabaena cylindrica*. Biochim. Biophys. Acta V. 423. P. 189.

## Membrane Bioenergetics and Distribution of Functions in Systems of Electrically Coupled Cells

T. V. Potapova\*

Belozersky Scientific Research Institute of Physico-chemical Biology, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: potapova@belozersky.msu.ru

From the standpoint of modern membrane bioenergetics, membrane-associated proteins, which ensure storage and use of energy accumulated in the form of a membrane potential (MP), are spatially separated. The presence in multicellular systems of electrical communication through permeable contacts (PC) makes it possible to transfer energy through the PC and thus contribute to the division of labor between neighboring cells. Processes occurring in these systems are manifested in changes in the electrical characteristics of individual cells and PCs and can be quantitatively analyzed by describing cells and cellular systems as equivalent electrical cables. The review presents the data of multiannual studies of energy transfer through PC in evolutionarily different multicellular systems: trichomes of fil-

amentous cyanobacteria, hyphae of mycelial fungi, and monolayer cultures of animal cells. The hypha of *Neurospora crassa* as a convenient experimental model is considered in more detail. On the basis of the comparison of the data in our own works with other publications, a hypothesis is put forward about a possible participation of local electric fields in self-organization of intracellular structures at the apex of the growing hypha of *N. crassa*, which are created owing to uneven distribution between cells of the functions of MP generation and utilization of its energy. Ideas about the features of electrical processes and phenomena accompanying the energy transfer through PC can be useful in the analysis of many important issues related to the mechanisms for implementation of genetic instructions in specific life processes.

**Keywords:** bioenergetics, division of labor, electric coupling, intercellular interactions, local electrical fields, membrane potential, *Neurospora crassa*

## РОЛЬ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ *Serratia grimesii* ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ БАКТЕРИЙ С КЛЕТКАМИ CaCo-2

© 2021 г. Е. С. Божокина<sup>1, \*</sup>, Ю. М. Берсон<sup>2, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

<sup>2</sup>ООО “Гротекс”, Санкт-Петербург, 195279 Россия

\*E-mail: bozhokina@yahoo.com

\*\*E-mail: juletschka.ber@gmail.com

Поступила в редакцию 16.09.2020 г.

После доработки 27.10.2020 г.

Принята к публикации 28.10.2020 г.

Условно-патогенные бактерии *Serratia grimesii* способны проникать в клетки эукариот, однако механизмы их инвазивной активности неизвестны. Ранее мы показали, что *S. grimesii in vitro* секретируют мембранные везикулы, которые проникают в культивируемые клетки эукариот и усиливают инвазию *S. grimesii* в эти клетки (Bozhokina et al., 2020). Поэтому целью настоящей работы является исследование роли мембранных везикул *S. grimesii* в процессе взаимодействия бактерий с клеткой-хозяином. Результаты проведенных экспериментов показали, что воздействие холодового шока или окислительного стресса, вызванного перекисью водорода, увеличивает секрецию мембранных везикул бактериями *S. grimesii*, а выделенные везикулы усиливают инвазию бактерий в клетки CaCo-2. Кроме того, мембранные везикулы *S. grimesii* индуцируют иммунный ответ клеток CaCo-2, а также обладают по отношению к этим клеткам цитотоксической активностью, определяемой по уровню высвобождения из клеток лактатдегидрогеназы. В присутствии везикул, полученных в условиях стресса, бактерии активнее адгезировали и проникали в клетки CaCo-2. Кроме того, впервые продемонстрировано участие рецептора клеточной поверхности E-кадгерина в инвазии мембранных везикул *S. grimesii* в клетки CaCo-2. Полученные результаты позволяют предположить, что везикуло-опосредованная доставка факторов вирулентности к клеткам эукариот может вносить существенный вклад в патогенез, вызванный инфекцией *S. grimesii*.

**Ключевые слова:** *Serratia grimesii*, мембранные везикулы, гримелизин, бактериальная инвазия

**DOI:** 10.31857/S0041377121010028

Многие грамотрицательные бактерии способны секретировать мембранные везикулы, представляющие собой сферические пузырьки наружной мембраны бактерий размером от 20 до 400 нм, которые содержат биологически активные белки, нуклеиновые кислоты, а также различные бактериальные метаболиты (Brown et al., 2015; Schwechheimer, Kuehn, 2015; Bryant et al., 2017; Toyofuku et al., 2019). Предполагается, что мембранные везикулы бактерий являются ключевыми участниками в межбактериальных взаимодействиях, а также во взаимодействии бактерий с клетками эукариот. Этому способствуют разнообразные роли мембранных везикул, такие как поглощение питательных веществ, перенос генов, образование биопленок, антимикробная защита, доставка токсинов и факторов вирулентности при заражении клетки-хозяина (Kulr, Kuehn, 2010).

**Принятые сокращения:** ИФА – иммуноферментный анализ; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; LDH – лактатдегидрогеназа.

Бактериальная ДНК, выделенная из везикул, обнаруживается в моче (Yoo et al., 2016; Park et al., 2017), а также в таких стерильных отделах организма, как сердечный миокард (Svennerholm et al., 2017). Это предполагает, что бактериальные везикулы могут проникать в органы, значительно удаленные от места первичного бактериального контакта (Stentz et al., 2018). Показано, что везикулы могут взаимодействовать с различными клетками млекопитающих, включая клетки эпителия кишечника (Bielaszewska et al., 2013; Stentz et al., 2014; O’Donoghue et al., 2017), клетки легочного эпителия (Bauman, Kuehn, 2009), эндотелиальные клетки (Kim et al., 2013) и клетки иммунной системы (Hickey et al., 2015; Deo et al., 2018). Тем не менее, молекулярные механизмы проникновения мембранных везикул, а также дальнейшая судьба их содержимого в цитоплазме эукариотической клетки остаются мало изученными (Margolis, Sadovsky, 2019).

Исторически исследования мембранных везикул были сосредоточены на изучении везикул, продуцируемых патогенными грамотрицательными бактериями, и роли этих структур в транспортировке ток-

синов и факторов вирулентности в клетку-хозяина (Kunsmann et al., 2015; Rasti et al., 2018). Недавно появились исследования, показывающие наличие мембранных везикул условно-патогенных и пробиотических бактерий, которые могут благоприятно влиять на клетки хозяина, поддерживая их гомеостаз путем воздействия на сигнальные пути эпителиальных и иммунных клеток. Например, было показано, что мембранные везикулы *Escherichia coli* штамма *Nissle 1917* помогают поддерживать целостность кишечного барьера за счет усиления экспрессии белков оклудина-1 и клаудина-14, усиливающих межклеточные контакты (Alvarez et al., 2016), а также путем увеличения производства противомикробных пептидов и противовоспалительных цитокинов (Fabrega et al., 2017; Alvarez et al., 2019). С другой стороны, показано, что выделенные мембранные везикулы *S. grimesii* содержат актин-специфическую протеазу гримелизин, которую везикулы могут переносить в цитоплазму эукариотической клетки и способствовать заражению этих клеток инвазирующими бактериями (Bozhokina et al., 2020).

Хотя все эти данные указывают на способность мембранных везикул бактерий влиять на жизнедеятельность клеток эукариот, процессы образования везикул и их проникновения в клетки эукариот остаются недостаточно изученными. Ранее мы показали, что условно-патогенные бактерии *S. grimesii* образуют везикулы, которые не только способны проникать в эукариотические клетки, но и усиливают инвазию “материнских” бактерий в эти клетки (Bozhokina et al., 2020). В экспериментах этой работы количество выделенных мембранных везикул увеличивали с помощью холодового шока (4°C), которому были подвергнуты бактерии *S. grimesii* (Bozhokina et al., 2020).

Задачей настоящей работы было изучение влияния мембранных везикул *S. grimesii*, полученных в условиях холодового шока или окислительного стресса, на свойства эукариотических клеток *in vitro* и взаимодействие бактерий с клеткой-хозяином.

Результаты нашей работы показали, что мембранные везикулы *S. grimesii* индуцируют иммунный ответ клеток эукариот, а также обладают цитотоксической активностью по отношению к этим клеткам. Присутствие везикул усиливало адгезию *S. grimesii* к клеткам аденокарциномы кишечного эпителия CaCo-2 и проникновение бактерий в эти клетки. Кроме того, впервые продемонстрировано участие рецептора клеточной поверхности E-кадгерина в инвазии мембранных везикул *S. grimesii* в клетки CaCo-2. Полученные результаты указывают на то, что мембранные везикулы могут вносить существенный вклад в патогенез, вызванный инфекцией *S. grimesii*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клетки, бактерии, среды, условия культивирования.** Клетки аденокарциномы толстой кишки чело-

века линии CaCo-2 были получены из Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (КККП ИНЦ РАН, С.-Петербург). Клетки CaCo-2 культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки снимали 0.25%-ным раствором трипсин-ЭДТА (Gibco, Великобритания) и переносили в 24-луночные планшеты для тканевых культур (Corning Glass Works, Corning, Нидерланды). Для иммунофлуоресцентного анализа монослой клеток CaCo-2 дважды промывали фосфатно-солевым буферным раствором PBS (Биолот, Россия) и культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), не содержащей антибиотиков и сыворотки.

Бактерии *S. grimesii* были получены из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ, Берлин, Германия). Бактерии выращивали в среде LB (Gibco, Великобритания) при 37°C в колбах с аэрацией в течение 24 ч до достижения оптической плотности, равной 0.1 при 600 нм (OD<sub>600</sub>). Для экспериментов с холодным шоком бактерии культивировали при 37°C, а затем (перед выделением мембранных везикул) помещали на водяную баню со льдом на 1 ч. Для экспериментов с окислительным стрессом бактерии культивировали как указано выше, а затем в среду добавляли пероксид водорода до конечной концентрации 250 мкМ (Биолот, Россия) на 1 ч, после чего выделяли мембранные везикулы.

**Выделение мембранных везикул.** Бактерии, выращенные в течение 24 ч в среде LB (Gibco, Великобритания) при 37°C в колбах с аэрацией, центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин и полученный супернатант фильтровали через мембрану с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore, Великобритания). Фильтрат концентрировали, используя центробежный фильтр Ultra-4 с номинальной отсечкой 10 кДа (Millipore, Великобритания). Концентрированный фильтрат подвергали ультрацентрифугированию при 40000 g в течение 1 ч при 4°C с использованием ротора Type 45 Ti (Beckman Instruments, США). Осадки, содержащие мембранные везикулы, суспендировали в PBS (Биолот, Россия). Суспензию мембранных везикул проверяли на стерильность, высевая на чашки с LB-агаром (Gibco, Великобритания). Количество мембранных везикул выравнивали по концентрации белка в растворе мембранных везикул, определенного по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

**Количественная оценка адгезии и инвазии бактерий после обработки клеток мембранными везикулами.** Влияние мембранных везикул на инвазию бактерий *S. grimesii* определяли с помощью метода количественной оценки адгезии и инвазии по описанной методике (Wu et al., 2014) с небольшими модификациями. Клетки CaCo-2 культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США) без сыворотки в присутствии разного количества везикул в течение 1 ч, затем среду отбирали и клетки промывали 3 раза буфе-

ром PBS (Биолот, Россия), контроль отмывки везикул проводили с помощью микроскопа ZOI (Biorad, США). Среду DMEM/F12 заменяли на свежую без сыворотки и клетки заражали бактериями *S. grimesii* из расчета 25 бактерий на 1 клетку. Клетки в присутствии бактерий культивировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 2 ч. Затем клетки промывали 1 мл раствора трипсина с ЭДТА (Биолот, Россия), добавляли среду DMEM/F12 с гентамицином (100 мкг/мл) и культивировали 1 ч, чтобы уничтожить внеклеточные бактерии. После этого клетки лизировали в 4.5%-ном растворе дезоксихолата натрия в течение 10 мин. Лизат объемом 100 мкл быстро титровали холодной средой LB (Gibco, Великобритания) до нужной концентрации и высевали по 100 мкл на чашки с LB-агаром (Gibco, Великобритания) для подсчета количества колониеобразующих единиц (КОЕ). Ту же процедуру использовали для анализа бактериальной адгезии, но исключали обработку клеток средой с гентамицином. Результаты представляют собой среднее значение КОЕ, которое соответствует количеству образовавшихся колоний, из трех независимых экспериментов. Результаты выражали средним значением и среднестатистическим отклонением. Различия считали значимыми при вероятности гипотезы  $p < 0.05$ .

**Иммунофлуоресцентная окраска мембранных везикул и рецептора клеточной поверхности E-кадгерина.** Клетки CaCo-2 инкубировали с мембранными везикулами, предварительно окрашенными красителем DiLO (Thermo Fisher Scientific, Великобритания), согласно инструкции производителя в течение 1 ч. Затем клетки промывали буфером PBS и фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин при комнатной температуре и блокировали 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA; Sigma, ФРГ) в течение 1 ч. Пермеабиллизацию клеточной мембраны проводили 0.1%-ным раствором Тритона X-100 в течение 15 мин при комнатной температуре. Далее образцы инкубировали с антителами к E-кадгерину (Santa Cruz, США) в течение ночи при 4°C. Вторые антитела (AlexaFluor 488; Life Technologies, США) разводили в соотношении 1 : 500 и инкубировали с ними препараты 1 ч в темноте при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, окрашенные только вторыми антителами. Визуализацию проводили с помощью микроскопа Olympus FV3000 (Olympus, Япония), используя программное обеспечение ImageJ.

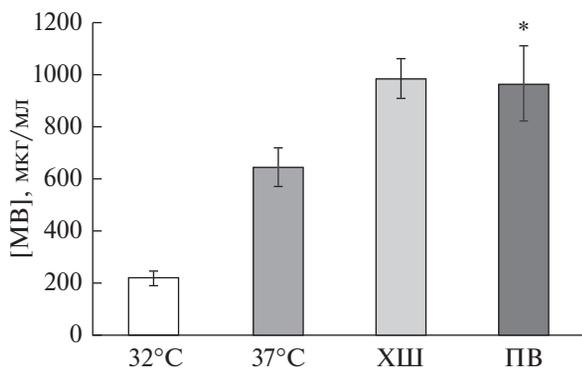
**Определение уровня воспалительных цитокинов в клетках CaCo-2 после их инкубации с мембранными везикулами *S. grimesii*.** Уровень секреции интерлейкинов IL-6 и IL-8 оценивали с использованием набора для сэндвич-ИФА в соответствии с инструкциями производителя (Human IL-6, IL-8 Pre-Coated ELISA Kit; Peprotech, Великобритания). Клетки CaCo-2 инкубировали в течение 24 ч с мембранными везикулами в концентрации 2, 50 или 100 мкг/мл.

Определение уровней цитокинов IL-6 и IL-8 проводили с использованием 96-луночных планшет-ридеров Dynex MRX II (Dynex, США), предварительно покрытых моноклональными антителами, специфичными к IL-6 или IL-8. Поглощение измеряли при длине волны 405 нм, в качестве детектирующих антител использовали биотинилированные поликлональные антитела, специфичные к IL-6 или IL-8, и анализировали с помощью программного обеспечения Revelation (Dynex, США).

**Оценка цитотоксичности мембранных везикул.** Цитотоксичность мембранных везикул *S. grimesii* по отношению к клеткам оценивали с помощью нерадиоактивного анализа цитотоксичности CytoTox 96 (Promega, Великобритания). За 7 сут до инфицирования клетки CaCo-2 засеивали в 24-луночные планшеты, выращивали до образования 70%-ного монослоя и культивировали при 37°C в течение 24 ч среде DMEM/F12 (Gibco, США) без сыворотки с мембранными везикулами *S. grimesii* (в концентрации 2, 50 или 100 мкг/мл). Цитотоксичность мембранных везикул определяли в супернатантах клеток по уровню высвобождения в среду лактатдегидрогеназы (LDH). Необработанные клетки являлись отрицательным контролем цитотоксичности (0%). Полный лизис клеток после обработки 1%-ым Тритоном X-100 представлял собой положительный контроль (цитотоксичность 100%).

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).** Для анализа экспрессии гена *e-cadherin* из клеток выделяли тотальную РНК при помощи набора RiboPure™ RNA Purification Kit (Invitrogen, США) по протоколу, рекомендованному производителем. Все образцы обрабатывали ДНКазой (Fermentas, Thermo Scientific, Литва). Для синтеза кДНК использовали 1 мкг тотальной РНК на пробу, ревертазу RevertAid M-MuLV и случайные олигонуклеотидные последовательности (Fermentas, Thermo Scientific, Литва). Пробы для ПЦР готовили в соответствии с протоколом производителя Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, Thermo Scientific, Литва). Использовали специфические праймеры следующих последовательностей: для *e-cadherin* прямой 5'-CTGAGAACGAGGANAACG-3' и обратный 5'-TTACATCCAGCACATCC-3'; для  $\beta$ -актина прямой 5'-AATCTGGCACCACACSTTCTACA-3' и обратный 5'-GACGTAGCACAGCTTCTCCTTA-3'. Температура отжига праймеров была адаптирована к оптимальным условиям ПЦР для каждой используемой пары. ПЦР-анализ экспрессии генов проводили на амплификаторе CFX96 (BioRad, Сингапур).

**Статистическая обработки результатов.** Использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности гипотезы  $p < 0.05$ .



**Рис. 1.** Зависимость количества мембранных везикул бактерий *Serratia grimesii* от температуры и стрессовых факторов. Измеряли общее содержание белка мембранных везикул, выделенных из *S. grimesii*, культивируемых при 32 или 37°C. Концентрации белка мембранных везикул (МВ) были нормализованы к относительной концентрации бактериальной культуры, которую определяли по оптической плотности при длине волны 600 нм. Холодовой шок (ХШ) моделировали помещением бактерий на лед на 30 мин, окислительный – 250 мкМ пероксида водорода (ПВ) в течение 1 ч. Контроль – количество мембранных везикул от бактерий, выращенных при температурном оптимуме (37°C) с качанием. Эксперименты повторяли дважды; показаны средние значения и стандартные отклонения; различия достоверны по сравнению с контролем (\*) при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Синтез мембранных везикул бактериями *S. grimesii* в условиях стресса

Ранее мы показали, что бактерии *S. grimesii* увеличивают производство мембранных везикул при физиологическом стрессе (Bozhokina et al., 2020). Температура является основным регулятором экспрессии генов у бактерий, и производство мембранных везикул бактериями происходило как при низких, так и при более высоких температурах (Yonezawa et al., 2011). Имея это в виду, мы проверили, влияют ли изменения температуры на количество мембранных везикул *S. grimesii*. Бактерии *S. grimesii* культивировали либо при 32°C, либо при 37°C и оценивали количество везикул по концентрации белка в очищенной фракции везикул (рис. 1). Оказалось, что при 37°C накопление белка значительно выше, чем при 32°C, что предполагает более активное производство везикул при 37°C, т.е. при температуре, которая является температурным оптимумом для *S. grimesii* (рис. 1).

Кроме того, известно, что в условиях стресса происходит активация бактериальных сигнальных путей (Macdonald, Kuehn, 2013), и это также может увеличить образование мембранных везикул. Мы исследовали влияние холодового шока, хорошо зарекомендовавшего себя индуктора стресса у грамотрицательных бактерий (Phadtare, 2004), на синтез мембранных везикул бактериями *S. grimesii*. Холодовой шок вызывали выдерживанием бактерий,

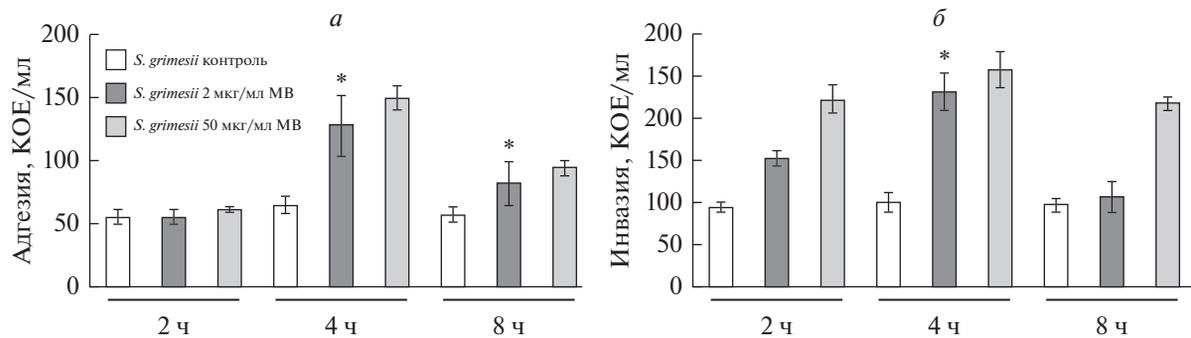
выращенных при 37°C, в течение получаса на льду с качанием. Количественная оценка белков мембранных везикул после холодового шока продемонстрировала значительное увеличение секреции везикул по сравнению с контрольными бактериями, выращенными при 37°C (рис. 1).

Для того чтобы определить, являются ли условия стресса физиологически значимыми для стимулирования производства везикул *S. grimesii*, мы определили количество мембранных везикул после добавления в ростовую среду бактерий пероксида водорода. Эта добавка имитирует резкое увеличение в среде активных форм кислорода, которые могли бы продуцироваться нейтрофилами в процессе инфекции *in vivo* для противодействия бактериальной инфекции в организме хозяина. Действительно, при добавлении в бактериальную среду 250 мкМ пероксида водорода на 1 ч количество везикул также возрастало (рис. 1).

**Влияние мембранных везикул на инвазию *S. grimesii* в клетки CaCo-2.** Так как бактерии *S. grimesii* секретуют везикулы во внеклеточную среду, мы проверили, как инкубация клеток с мембранными везикулами влияет на адгезию и инвазию бактерий. После инкубации клеток CaCo-2 с мембранными везикулами (2 или 50 мкг/мл) в течение 30 мин среду меняли на свежую и добавляли бактерии *S. grimesii* (множественность заражения 25 : 1). Добавление мембранных везикул не оказало существенного влияния на бактериальную адгезию через 2 ч (рис. 2a). Однако на более поздних сроках – через 4 и 8 ч после добавления бактерий, адгезия усиливалась в 2.5 раза (рис. 2a). Однако количество внутриклеточных (инвазивных) бактерий после преинкубации клеток с мембранными везикулами увеличивалось на всех временных точках. Количество внутриклеточных бактерий увеличивалось также в зависимости от концентрации везикул до 2.5 раз (рис. 2b).

Стоит отметить, что предварительная обработка клеток везикулами, полученными в условиях стресса (холодовой шок или добавление пероксида водорода) приводила к более значительной инвазии бактерий в клетки, что может говорить о наличии в таких везикулах большего количества бактериальных факторов вирулентности (рис. 3).

Оказалось, также, что предварительная обработка клеток CaCo-2 мембранными везикулами увеличила экспрессию гена рецептора клеточной поверхности E-кадгерина (рис. 4a), а также колокализацию везикул с E-кадгерином на поверхности клеток (рис. 4b). После окраски красителем DiLO к клеткам CaCo-2 добавляли мембранные везикулы в концентрации 50 мкг/мл на 1 ч. Затем клетки фиксировали и окрашивали антителами к E-кадгерину. На врезке (рис. 4b) видны прикрепившиеся к поверхности клеток везикулы (красный сигнал) и места контакта везикул с E-кадгерином (зеленый сигнал), что указы-



**Рис. 2.** Влияние мембранных везикул (МВ) на адгезию и инвазию бактерий *S. grimesii* в клетки CaCo-2. Клетки инкубировали в среде с МВ в течение 30 мин. Бактериальную адгезию (а) и инвазию (б) оценивали по количеству прикрепившихся и проникших в клетки *S. grimesii*. Количество бактерий оценивали по числу колониеобразующих элементов (КОЕ/мл) после высева на твердые среды. Число прикрепившихся бактерий после инкубирования клеток в среде с МВ увеличивается через 4 и 8 ч адгезии. Контроль – необработанные везикулами клетки CaCo-2. Эксперименты повторяли трижды; показаны средние значения и стандартные отклонения; различия достоверны по сравнению с контрольными (\*) при  $p < 0.05$ .

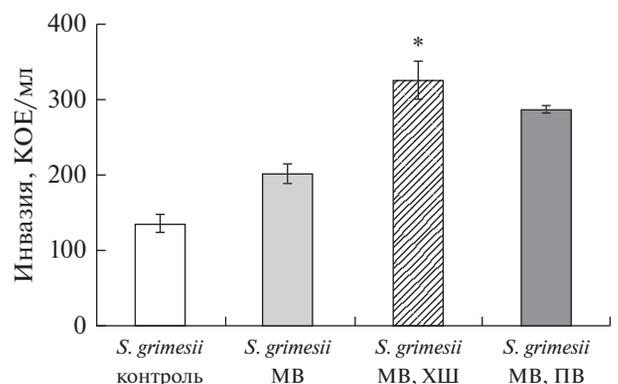
вает на участие этого рецептора в интернализации везикул в клетки-хозяина.

**Цитотоксическое действие мембранных везикул *S. grimesii*, полученных в условиях оптимума роста и при условиях стресса на клетки CaCo-2.** Цитотоксическое действие мембранных везикул на клетки CaCo-2 оценивали количественно по высвобождению фермента LDH из цитозоля клеток, как меры их повреждения. Мембранные везикулы в количестве 25, 75 или 150 мкг/мл добавляли к клеткам CaCo-2 на 24 ч. Цитотоксический эффект мембранных везикул увеличивался пропорционально концентрации добавленных к клеткам везикул (рис. 5).

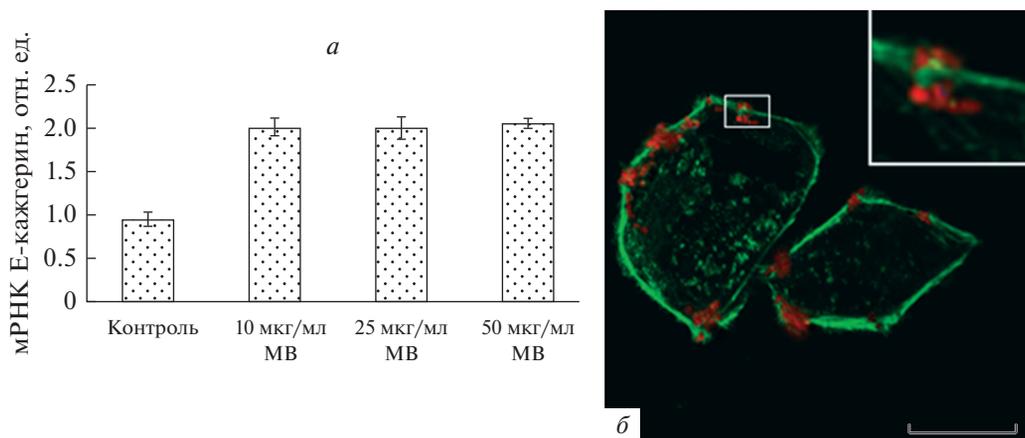
Суспензию мембранных везикул, полученных в условиях стресса, в концентрации 50 и 100 мкг/мл инкубировали с клетками CaCo-2 в течение 24 ч. Цитотоксический эффект мембранных везикул был пропорционален концентрации добавленных к клеткам везикул (рис. 6). Кроме того, мы показали, что цитотоксический эффект был выше в 1.5 раза при обработке везикулами, полученными после воздействия температурного (холодового) шока, а также был выше в 2.5 раза после воздействия окислительного стресса (обработки пероксидом водорода). В качестве отрицательного контроля на цитотоксичность, клетки инкубировали в среде без везикул, для положительного контроля использовали обработку клеток раствором Triton X-100.

**Влияние мембранных везикул *S. grimesii* на синтез провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8 в клетках CaCo-2.** По данным иммуноферментного анализа (ИФА), после инкубации клеток CaCo-2 с мембранными везикулами в концентрации 2, 50 или 100 мкг/мл в течение 24 ч уровень секретируемых IL-6 и IL-8 увеличивался в 4.8 и в 6.4 раза соответственно (рис. 7а, б). В ответ на обработку клеток везикулами (при совместном культивировании клеток с везикулами в максимальной концентрации) наблюдали секрецию цитокинов IL-6 и IL-8 в самых высоких

концентрациях. Секреция цитокинов уменьшалась пропорционально концентрации мембранных везикул, предварительно добавленных к клеткам. Максимальная секреция цитокинов достигалась при концентрации мембранных везикул 100 мкг/мл, а увеличение секреции всего в 1.6 раз достигалась при концентрации везикул 2 мкг/мл. Было также показано, что ответы клеток на обработку везикулами непатогенного штамма *E. coli* ССМ были значительно меньше при аналогичных концентрациях, чем при обработке везикулами бактерий *S. grimesii* (рис. 7 а, б). Это можно объяснить тем, что в везикулах *S. grimesii*, в отличие от везикул штамма *E. coli* ССМ, содержится протеаза гримелизин (Bozhokina et al., 2020), поэтому такая разница в эффектах может быть связана



**Рис. 3.** Инвазия *S. grimesii* в клетки CaCo-2, предварительно обработанные мембранными везикулами (МВ), полученными в условиях стресса. МВ из бактерий выделяли после холодного шока (ХШ) в течение 30 мин на льду, или окислительного стресса добавлением 250 мкМ пероксида водорода (ПВ). Контроль – инвазия CaCo-2, без предварительной обработки бактерий МВ. Эксперименты повторяли трижды; показаны средние значения и стандартные отклонения; различия с контролем достоверны (\*) при  $p < 0.05$ .



**Рис. 4.** Совместная иммунофлуоресцентная окраска мембранных везикул (МВ) бактерий *S. grimesii* и рецептора клеточной поверхности Е-кадгерина клеток СаСо-2. Клетки СаСо-2 инкубировали в среде с 10, 25 и 50 мкг/мл МВ в течение 1 ч, затем оценивали экспрессию рецептора клеточной поверхности Е-кадгерина методом ОТ-ПЦР (а); контроль – клетки СаСо-2 в среде без МВ. б – Показана иммунофлуоресценция рецептора Е-кадгерина (зеленый цвет) при инкубации клеток СаСо-2 в среде с МВ (красный цвет) бактерий *S. grimesii*; на врезке с увеличенным изображением участка видны прикрепившиеся к поверхности клеток везикулы и места контакта везикул с Е-кадгерином. Масштабный отрезок – 25 мкм.

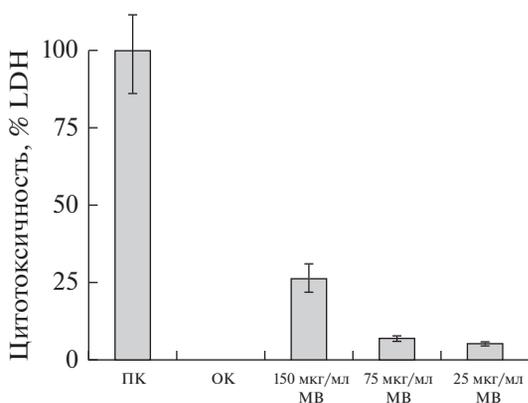
с наличием в мембранных везикулах этого фермента.

## ОБСУЖДЕНИЕ

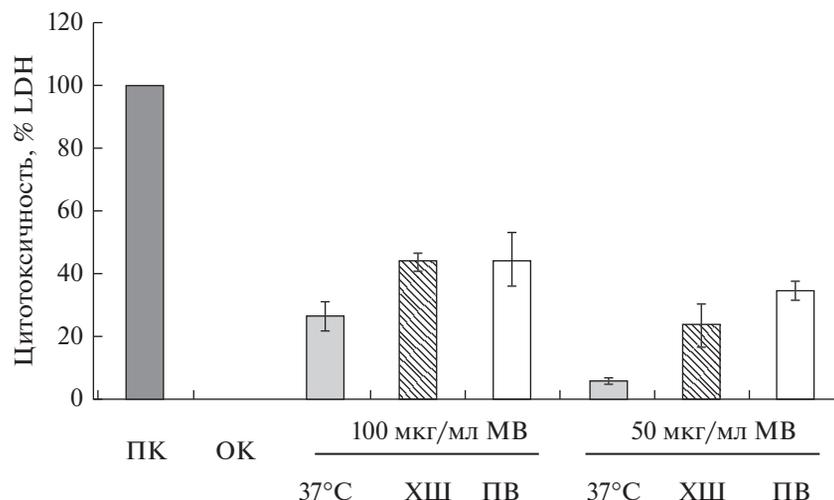
В настоящее время мембранные везикулы бактерий считаются одним из ключевых участников бактериальной вирулентности (Kulp, Kuehn, 2010). Везикулы играют важную роль в таких взаимодействиях клетки-хозяина и патогена, как транспортировка и высвобождение факторов вирулентности многих патогенных и условно-патогенных бактерий (Ellis,

Kuehn, 2010). Ранее мы обнаружили, что условно-патогенные бактерии *S. grimesii* продуцируют мембранные везикулы, содержащие актин-специфическую протеазу гримелизин, которая является одним из факторов вирулентности этих бактерий (Bozhokina et al., 2020). Эти результаты указывает на то, что *S. grimesii* могут использовать мембранные везикулы в качестве системы доставки целевых бактериальных белков в процессе интернализации бактерий. Однако в литературе недостаточно данных о наличии у бактерий штамма *S. grimesii* специфических бактериальных систем секреции, которые способствуют проникновению этих условно-патогенных бактерий в клетки эукариот. В то же время, известно, что образование мембранных везикул является ответом бактерий на неблагоприятные условия окружающей среды (MacDonald, Kuehn, 2013).

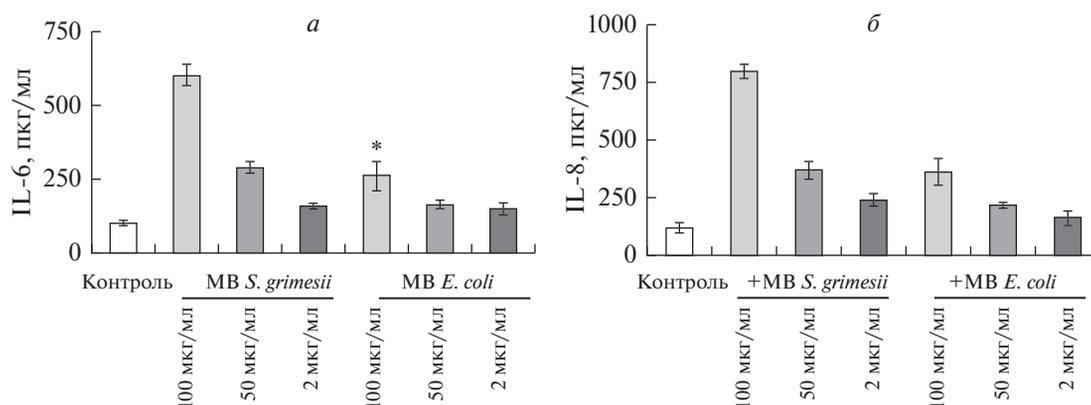
Температуру окружающей среды обычно рассматривают как общий фактор стресса, который встречается во время инфекции. Используя изменение температуры (холодовой шок), мы показали, что количество везикул, выделенных бактериями, подвергшимися инкубации при 4°C, значительно превышало количество везикул, выращенных при 32 или 37°C (Bozhokina et al., 2020). Аналогичное увеличение количества секретируемых везикул происходило в результате окислительного стресса – еще одного вида стресса, с которым патоген может встретиться в процессе развития инфекции. Оказалось, что окислительный стресс, а именно инкубация бактерий *S. grimesii* в присутствии пероксида водорода, приводила к значительному, почти в 3.5 раза, увеличению продукции везикул. Активные формы кислорода, такие как пероксид водорода, вырабатываются клетками врожденного иммунитета и высвобождаются при контакте с инфекционным агентом. Реак-



**Рис. 5.** Цитотоксичность мембранных везикул (МВ) в разной концентрации), выделенных из бактерий *S. grimesii*, на клетки СаСо-2. По горизонтали: ПК – положительный контроль (лизис клеток в 1%-ном растворе Тритона Х-100, 100%-ная цитотоксичность), ОК – отрицательный контроль (культуральная среда без МВ). Цитотоксическое действие на клетки СаСо-2 определяли по росту содержания лактатдегидрогеназы (LDH) в среде клеток по мере их повреждения.



**Рис. 6.** Цитотоксический эффект мембранных везикул (МВ), выделенных из бактерий *S. grimesii*, в условиях стресса. По горизонтали: ПК – положительный контроль (лизис клеток в 1%-ном растворе Тритона X-100, 100%-ная цитотоксичность), ОК – отрицательный контроль (культуральная среда без мембранных везикул); 37°C – оптимальные условия роста бактерий; ХШ – холодовой шок; ПВ – добавление в среду культивирования бактерий пероксида водорода (250 мМ). Цитотоксическое воздействие на клетки CaCo-2 определяли по содержанию в среде клеток фермента LDH.



**Рис. 7.** Индукция IL-6 (а) и IL-8 (б) в клетках CaCo-2 в ответ на обработку мембранными везикулами (МВ) бактерий *S. grimesii* и *Escherichia coli*. Клетки инкубировали в среде с МВ в различной концентрации в течение 24 ч. Содержание IL-6 и IL-8, секреторируемых клетками CaCo-2 в среду после обработки клеток МВ бактерий, определяли методом ИФА; контроль – клетки без предварительной обработки МВ. Различия с контролем достоверны (\*) при  $p < 0.05$ .

тивный кислород является мощным защитным механизмом клетки, а бактерии не обладают единым механизмом уклонения от активных форм кислорода. Возможно, повышенная продукция мембранных везикул является как раз таким защитным механизмом для бактерий *S. grimesii*.

Увеличение количества везикул *S. grimesii* при воздействии стресса согласуется с данными о везикулах других грамотрицательных бактерий (Deatherage et al., 2009). При этом изменение количества мембранных везикул, синтезируемых бактериями *S. grimesii*, предполагает, что может происходить дифференцированная сортировка внутренних белков везикул, как, например, это происходит с мембранными везикулами бактерий *P. gingivalis* (Haurat et al., 2011).

В настоящее время было идентифицировано множество факторов вирулентности бактерий, ассоциированных с мембранными везикулами. Было показано, что мембранные везикулы доставляют в клетки эукариот бактериальные факторы вирулентности таких кишечных патогенов, как энтеропатогенная *Escherichia coli* и *Helicobacter pylori* (Ellis, Kuehn, 2010). Мы показали, что при помощи везикул *S. grimesii* в значительном количестве переносит металлопротеазу гримелизин (Bozhokina et al., 2020). Кроме того, аналогично данным для мембранных везикул патогенных бактерий (Lindmark et al., 2009), мембранные везикулы *S. grimesii* обладают цитотоксическим эффектом по отношению к клеткам CaCo-2.

Цитотоксичность мембранных везикул измеряли по наличию в среде клеток внеклеточного фермента LDH после их совместной 24-часовой инкубации, и уровень цитотоксичности менялся пропорционально концентрации добавленных к клеткам везикул. Такое действие на клетки CaCo-2 может предполагать роль других цитотоксических факторов *S. grimesii* в дополнение к гримелизину, например, других бактериальных протеаз, которые могут повреждать клеточные мембраны. Для проверки этого предположения требуются дальнейшие исследования, чтобы установить, является ли снижение целостности мембраны клетки-хозяина результатом действия мембранных везикул на клеточный цикл, или цитотоксичность достигается фактическим лизисом клеток-хозяина. Тем не менее, можно предположить, что везикулы *S. grimesii* могут модулировать изменения мембран клеток линии CaCo-2 человека, и тем самым влиять на проникновение бактерий.

Известно, что бактериальные мембранные везикулы могут активировать сигнальные пути врожденного и приобретенного иммунного ответа в клетках хозяина (Ellis, Kuehn, 2010). Факторы вирулентности, ассоциированные с мембранными везикулами, могут модулировать иммунный ответ хозяина, стимулируя иммунное (воспалительное) повреждение или уничтожение патогена (Ellis, Kuehn, 2010). Провоспалительный ответ на действие мембранных везикул наблюдали для некоторых видов бактерий, включая *H. pylori* (Ismail et al., 2003) и *P. aeruginosa* (Bauman, Kuehn 2006).

Мы также показали, что в ответ на инфицирование мембранными везикулами клетки CaCo-2 продуцируют провоспалительные цитокины IL-6 и IL-8. Эти результаты являются первым свидетельством того, что мембранные везикулы *S. grimesii* действуют как инициаторы иммунного ответа хозяина. По нашим предварительным данным, предобработка мембранных везикул протеиназой K не снижает способности везикул индуцировать IL-8. Так как протеиназа K разрушает белки, связанные с поверхностью везикул, но не белки, находящиеся в их внутреннем просвете (Bomberger, et al. 2009), эти данные указывают на то, что факторы вирулентности *S. grimesii*, участвующие в индукции интерлейкинов клетки-хозяина, являются внутренними компонентами мембранных везикул.

Ранее мы показали, что клетки эукариот чувствительны к инвазии *S. grimesii* (Bozhokina et al., 2011). Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что эффективность бактериальной инвазии увеличивается в присутствии мембранных везикул, секретируемых бактериями *S. grimesii*. Секреция везикул значительно усиливается в условиях стресса, холодового шока, а также при инкубации бактерий в присутствии перекиси водорода.

Результаты нашей работы впервые показали, что предварительная обработка клеток CaCo-2 мем-

бранными везикулами *S. grimesii* приводит к значительному усилению инвазии бактерий в эти клетки. Цитотоксичность везикул для клеток согласуется с этими данными. Таким образом, полученные результаты продемонстрировали роль мембранных везикул, как средства доставки факторов вирулентности *S. grimesii* и выявили влияние везикул на клетки человека, включая цитотоксичность и индукцию врожденного иммунного ответа, связанную с секрецией интерлейкинов IL-6 и IL-8.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-00558).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не включала эксперименты с участием животных или людей.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.

#### СПИСОК ЛИТЕАТУРЫ

- Alvarez C.S., Badia J., Bosch M., Gimenez R., Baldoma L. 2016. Outer membrane vesicles and soluble factors released by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and commensal ECOR63 enhance barrier function by regulating expression of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Front. Microbiol.* V. 7. P. 1981. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01981>
- Alvarez C.S., Gimenez R., Canas M.A., Vera R., Diaz-Garrido N., Badia J., Baldoma L. 2019. Extracellular vesicles and soluble factors secreted by *Escherichia coli* Nissle 1917 and ECOR63 protect against enteropathogenic *E. coli*-induced intestinal epithelial barrier dysfunction. *BMC Microbiol.* V. 19. P. 166. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1534-3>
- Bauman S.J., Kuehn M.J. 2006. Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes Infect.* V. 8. P. 2400.
- Bauman S.J., Kuehn M.J. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* vesicles associate with and are internalized by human lung epithelial cells. *BMC Microbiol.* V. 9. P. 26. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-26>
- Bozhokina E., Kever L., Khaitlina S. 2020. The *Serratia grimesii* outer membrane vesicles-associated grimeysin triggers bacterial invasion of eukaryotic cells. *Cell Biol. Int.* V. 44. P. 2275. <https://doi.org/10.1002/cbin.11435>
- Bozhokina E.S., Tsaplina O.A., Efremova T.N., Kever L.V., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Adam T., Komissarchik Y.Y., Khaitlina S.Y. 2011. Bacterial invasion of eukaryotic cells can be mediated by actin-hydrolysing metalloproteases grimeysin and protealysin. *Cell Biol Int.* V. 35. P. 111.

- <https://doi.org/10.1042/CBI20100314>
- Bielaszewska M., Ruter C., Kunsmann L., Greune L., Bauwens A., Zhang W., Kuczjus T., Kim K.S., Mellmann A., Schmidt A.M., Karch H.* 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin employs outer membrane vesicles to target mitochondria and cause endothelial and epithelial apoptosis. *PLoS Pathog.* V. 9. P. 12.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003797>
- Bomberger J.M., MacEachran D.P., Coutermarsh B.A., Ye S., O'Tool G.A., Stanton B.A.* 2009. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathog.* V. 5. P. e1000382.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000382>
- Brown L., Wolf J.M., Prados-Rosales R., Casadevall A.* 2015. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* V. 13. P. 620.
- Bryant W.A., Stentz R., Le Gall G., Sternberg M.J.E., Carding S.R., Wilhelm T.* 2017. In silico analysis of the small molecule content of outer membrane vesicles produced by *Bacteroides thetaiotaomicron* indicates an extensive metabolic link between microbe and host. *Front. Microbiol.* V. 8. P. 2440.
- Collins B.S.* 2011. Gram-negative outer membrane vesicles in vaccine development. *Discov. Med.* V. 12. P. 7.
- Deatherage B.L., Cookson B.T.* 2012. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect. Immun.* V. 80. P. 1948.
- Deatherage B.L., Lara J.C., Bersbaken T., Barrett S.L.R., Lara S., Cookson B.T.* 2009. Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* V. 72. P. 1395.
- Deo P., Chow S.H., Hay I.D., Kleifeld O., Costin A., Elgass K.D., Jiang J.H., Ramm G., Gabriel K., Dougan G., Lithgow T., Heinz E., Naderer T.* 2018. Outer membrane vesicles from *Neisseria gonorrhoeae* target PorB to mitochondria and induce apoptosis. *PLoS Pathog.* V. 14. P. e1006945.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006945>
- Ellis T.N., Kuehn M.J.* 2010. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* V. 74. P. 81.
- Fabrega M.J., Rodriguez-Nogales A., Garrido-Mesa J., Algier F., Badia J., Gimenez R., Galvez J., Baldoma L.* 2017. Intestinal anti-inflammatory effects of outer membrane vesicles from *Escherichia coli* Nissle 1917 in DSS-experimental colitis in mice. *Front. Microbiol.* V. 8. P. 1274.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01274>
- Haurat M.F., Aduse-Opoku J., Rangarajan M., Dorobantu L., Gray M.R., Curtis M.A., Feldman M.F.* 2011. Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* V. 286. P. 1269.
- Hickey C.A., Kuhn, K.A., Donermeyer D.L., Porter N.T., Jin C., Cameron E.A., Jung H., Kaiko G.E., Wegorzewska M., Malvin N.P., Glowacki R.W.P., Hansson G.C., Allen P.M., Martens E.C., Stappenbeck T.S.* 2015. Colitogenic *Bacteroides thetaiotaomicron* antigens access host immune cells in a sulfatase-Dependent manner via outer membrane vesicles. *Cell Host Microbe.* V. 17. P. 672.
- Hooper L.V., Stappenbeck T.S., Hong C.V., Gordon J.I.* 2003. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat. Immunol.* V. 4. P. 269.
- Ismail S., Hampton M.B., Keenan J.I.* 2003. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* V. 71. P. 5670.
- Kim J.H., Yoon Y.J., Lee J., Choi E.J., Yi N., Park K.S., Park J., Lotvall J., Kim Y.K., Gho Y.S.* 2013. Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* up-regulate expression of endothelial cell adhesion molecules in vitro and in vivo. *PLoS One.* V. 8. P. e59276.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059276>
- Kulp A., Kuehn M.J.* 2010. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* V. 64. P. 163.
- Kunsmann L., Ruter C., Bauwens A., Greune L., Gluder M., Kemper B., Fruth A., Wai S.N., He X., Llobes R., Schmidt M.A., Dobrint U., Mellmann A., Karch H., Bielaszewska M.* 2015. Virulence from vesicles: novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain. *Sci. Rep.* P. 13252.  
<https://doi.org/10.1038/srep13252>
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.H.* 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biochem. Chem.* V. 193. P. 265.
- Lindmark B., Rompikuntal P.K., Vaitkevicius K., Song T., Mizunoe Y., Uhlin B.E., Guerry P., Wai S.N.* 2009. Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol.* V. 9. P. 220.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-220>
- Macdonald I.A., Kuehn M.J.* 2013. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* V. 195. P. 2971.
- Manning A.J., Kuehn M.J.* 2011. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* V. 11. P. 1.
- Margolis L., Sadovsky Y.* 2019. The biology of extracellular vesicles: The known unknowns. *PLoS Biol.* V. 17. P. e3000363.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000363>
- Necchi V., Candusso M.E., Tava F., Luinetti O., Ventura U., Fiocca R., Ricci V., Solcia E.* 2007. Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* V. 132. P. 1009.
- O'Donoghue E.J., Krachler A.M.* 2016. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cell. Microbiol.* V. 18. P. 1508.
- O'Donoghue E.J., Sirisaengtaksin N., Browning D.F., Bielska E., Hadis M., Alderwick L., Jabbari S., Krachler A.M.* 2017. Lipopolysaccharide structure impacts the entry kinetics of bacterial outer membrane vesicles into host cells. *PLoS Pathog.* V. 13. P. 1006760.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006760>
- Park J.Y., Choi J., Lee Y., Lee J.E., Lee E.H., Kwon H.J., Yang J., Jeong B.R., Kim Y.K., Han P.L.* 2017. Metagenome analysis of bodily microbiota in a mouse model of Alzheimer disease using bacteria-derived membrane vesicles in blood. *Exp. Neurobiol.* V. 26. P. 369.
- Phadtare S.* 2004. Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr. Issues. Mol. Biol.* V. 6. P. 125.
- Rasti E.S., Schappert M.L., Brown A.C.* 2018. Association of *Vibrio cholerae* 569B outer membrane vesicles with host cells occurs in a GM1-independent manner. *Cell. Micro-*

- biol. V. 20. P. e12828.  
<https://doi.org/10.1111/cmi.12828>
- Schwechheimer C., Kuehn M.J. 2015. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. Nat. Rev. Microbiol. V. 13. P. 605.
- Schwechheimer C., Kulp A., Kuehn M.J. 2014. Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content. BMC Microbiol. V.14. P. 1
- Stentz R., Carvalho A.L., Jones E.J., Carding S.R. 2018. Fantastic voyage: The journey of intestinal microbiota-derived microvesicles through the body. Biochem. Soc. Trans. V. 46. P. 1021.
- Stentz R., Osborne S., Horn N., Li A.W., Hautefort I., Bongaerts R., Rouyer M., Bailey P., Shears S.B., Hemmings A.M., Brearley C.A., Carding S.R. 2014. A bacterial homolog of a eukaryotic inositol phosphate signaling enzyme mediates cross-kingdom dialog in the mammalian gut. Cell Rep. V. 6. P. 646.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.021>
- Svennerholm K., Park K.S., Wikstrom J., Lasser C., Crescitelli R., Shelke G.V., Jang S.C., Suzuki S., Banderia E., Olofsson C.S., Lotvall J. 2017. *Escherichia coli* outer membrane vesicles can contribute to sepsis induced cardiac dysfunction. Sci. Rep. V. 7. P. 17434.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-16363-9>
- Toyofuku M., Nomura N., Eberl L. 2019. Types and origins of bacterial membrane vesicles. Nat. Rev. Microbiol. V. 17. P. 13.
- Wu J., Pugh R., Laughlin R.C., Andrews-Polymenis H., McClelland M., Bäuml A.J., Adams L.G. 2014. High-throughput assay to phenotype *Salmonella enterica* Typhimurium association, invasion, and replication in macrophages. J. Vis. Exp. V. 90. P. e51759.
- Yonezawa H., Osaki T., Woo T., Kurata S., Zaman C., Hojo F., Hanawa T., Kato S., Kamiya S. 2011. Analysis of outer membrane vesicle protein involved in biofilm formation of *Helicobacter pylori*. Anaerobe. V. 17. P. 388.
- Yoo J.Y., Rho M., You Y.A., Kwon E.J., Kim M.H., Kym S., Jee Y.K., Kim Y.K. Kim Y.J. 2016. 16S rRNA gene-based metagenomic analysis reveals differences in bacteria-derived extracellular vesicles in the urine of pregnant and non-pregnant women. Exp. Mol. Med. V. 48. P. e208.  
<https://doi.org/10.1038/emmm.2015.110>

## Role of Outer Membrane Vesicles (OMVS) in *Serratia grimesii* Interactions with CaCo-2 Cells

E. S. Bozhokina<sup>a,\*</sup> and Yu. M. Berson<sup>b,\*\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia

<sup>b</sup>LLC "Grotex", St. Petersburg, 195279 Russia

\*e-mail: bozhokina@yahoo.com

\*\*e-mail: juletschka.ber@gmail.com

Opportunistic bacteria *Serratia grimesii* are able to invade eukaryotic cells; however, the molecular mechanisms of their invasive activity remains unclear. Previously, we have shown that *in vitro* *S. grimesii* secrete membrane vesicles that penetrate cultured eukaryotic cells and promote invasion of *S. grimesii* into these cells (Bozhokina et al., 2020). Therefore, the aim of this work was to study the role of *S. grimesii* membrane vesicles in the process of interaction between bacteria and the host cell. The results of our experiments showed that exposure of *S. grimesii* to cold shock or oxidative stress induced by hydrogen peroxide increased the secretion of membrane vesicles, and the isolated vesicles enhanced the invasion of bacteria into CaCo-2 cells. Also, *S. grimesii* membrane vesicles induced the immune response of CaCo-2 cells, and demonstrated cytotoxic activity towards these cells, determined by the level of lactate dehydrogenase release. In the presence of vesicles obtained under the stress conditions, bacteria adhered to and penetrated into CaCo-2 cells more actively. Moreover, we have shown for the first time that the cell surface receptor E-cadherin is involved in the invasion of *S. grimesii* membrane vesicles into CaCo-2 cells. Our results suggest that the vesicle-mediated delivery of virulence factors into eukaryotic cells can significantly contribute to the pathogenesis induced by *S. grimesii* infection.

**Keywords:** *S. grimesii*, membrane vesicles, grimeysin, invasion

## ОСОБЕННОСТИ ПОВРЕЖДЕНИЯ АСТРОЦИТОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОД ВЛИЯНИЕМ L-АМИНОАДИПИНОВОЙ КИСЛОТЫ *IN VITRO* И *IN VIVO*

© 2021 г. Д. Н. Воронков<sup>1</sup>, А. А. Лыжин<sup>1</sup>, Ю. В. Дикалова<sup>1, \*</sup>, А. В. Ставровская<sup>1</sup>, Р. М. Худоев<sup>1</sup>, Л. Г. Хаспеков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научный центр неврологии, Москва, 125367 Россия

\*E-mail: dzettaly@gmail.com

Поступила в редакцию 06.10.2020 г.

После доработки 26.10.2020 г.

Принята к публикации 28.10.2020 г.

Известно, что L-аминоадипиновая кислота (L-AA) оказывает токсическое действие на астроглию. Цель работы — охарактеризовать морфологические изменения астроцитов *in vitro* и *in vivo* под действием L-AA. Оценивали действие L-AA в диапазоне концентраций 0.17–1.4 мМ на астроциты в первичных диссоциированных культурах коры головного мозга и мозжечка крыс, а так же при стереотаксическом введении (20 мкг) в стриатум крыс. Концентрации 0.35–1.4 мМ L-AA вызывали снижение экспрессии кислого глиофибрилярного белка (GFAP), повреждение и гибель астроцитов, пикноз и активацию лизосом (увеличение экспрессии LAMP2). На вторые сутки после введения L-AA в стриатум крыс формировалась обширная, лишенная GFAP-позитивного окрашивания область повреждения. Полученные данные показали перспективность использования L-аминоадипиновой кислоты для моделирования повреждения астроглии при нейродегенеративных заболеваниях.

**Ключевые слова:** астроциты, L-аминоадипиновая кислота, первичная культура коры, первичная культура мозжечка, интрацеребральное введение, стриатум

DOI: 10.31857/S0041377121010120

Астроглия участвует как в ключевых нейрофизиологических процессах (модуляция синаптической передачи, энергетическая поддержка нейронов, нейровоспаление, регенерация и ремоделирование нервной ткани) (Verkhatsky, Nedergaard, 2018), так и в патогенезе ряда заболеваний (эпилепсия, депрессия, ишемический инфаркт мозга и нейродегенеративные патологии, такие как болезни Альцгеймера, Паркинсона и боковой амиотрофический склероз) (Рекну, Рекна, 2016; Хаспеков, Фрумкина, 2017; Verkhatsky, Nedergaard, 2018; McConnell et al., 2019).

Значительный интерес вызывают исследования, связанные с регуляцией функции астроцитов, для чего требуются экспериментальные модели их избирательного повреждения (Jäkel, Dimou, 2017). Одной из таких моделей может служить воздействие глиального токсина L-аминоадипиновой кислоты (L-AA), которая является структурным аналогом глутамата и метаболитом лизина. Изменение концентрации эндогенной L-AA рассматривается как потенциальный биомаркер инсулинрезистентности и диабета второ-

го типа (Wang et al., 2013; Lee, 2019); биполярного расстройства (Watmuff et al., 2016).

L-аминоадипиновая кислота токсична для астроцитов (Olney et al., 1980; Huck et al., 1984; Brown, Kretzschmar, 1998; Billet et al., 2007; Śmiałowska et al., 2013). Ее энантиомером является D-аминоадипиновая кислота. Рацемическая смесь этих аминокислот повреждает в культуре ткани не только астроглию, но и нейроны (Olney et al., 1980). В клетку L-AA переносят Na-зависимые транспортеры глутамата, но механизм ее токсического действия не выяснен. Известно, что L-AA угнетает синтез белка, снижает активность глутаминсинтетазы, экспрессию глиофибрилярного белка и белка S100b и активирует проапоптотические каскады (Khurgel et al., 1996; Nishimura et al., 2000; O'Neil et al., 2019). L-AA повреждает не только астроциты ЦНС, но и другие клетки астроцитарного происхождения, например, Мюллеровские клетки сетчатки (Wang et al., 2016).

При интрацеребральном введении L-AA в амигдалу и префронтальную кору крыс наблюдали массивную дегенерацию астроцитов и депрессивно-подобное поведение животных (Banasz, Duman, 2008; Śmiałowska et al., 2013). Показано, что L-AA, повреждая астроциты, нарушает глутаматергическую передачу и провоцирует окислительный стресс (da Sil-

**Принятые сокращения:** GFAP — кислый глиофибрилярный белок; L-AA — L-аминоадипиновая кислота.

va et al., 2017). Некоторые исследования указывают на неоднозначный характер действия L-AA. Например, в одной из работ показано отсутствие глиотоксического эффекта L-AA при введении в гиппокамп и стриатум (Saffran, Crutcher, 1987), а в другой работе отмечено массивное повреждение нейронов и генерализованные судороги при введении высоких доз токсина в гиппокамп крыс (Chang et al., 1997).

Избирательное токсическое повреждение астроцитов как экспериментальная парадигма (Jakel, Dimou, 2017), в отличие от аналогичных подходов, направленных на повреждение нейронов, не получило широкого распространения. Большинство современных работ, в которых используются глиотоксические свойства L-AA, связано с удалением астроцитов с целью снижения провоспалительного эффекта активированной астроглии. Так, введение L-AA подавляло нейровоспаление в черной субстанции мозга, вызываемое введением бактериальных липополисахаридов (O'Neil et al., 2019). На купризоновой модели рассеянного склероза L-AA усиливала ремелинизацию (Madadi et al., 2019), а на модели повышенного внутриглазного давления у крыс — ослабляла ассоциированное с реактивным глиозом повреждение сетчатки (Wang et al., 2016). Было показано, что L-AA снижала глиальную активацию при трансплантации клеток сетчатки и влияла на дифференцировку глиальных клеток в ретинальные нейроны (Takeda et al., 2008; West et al., 2008). Снижение астроцитарной реакции обнаружили на модели геморрагического инфаркта, при ингибировании тромбин-индуцированной активации астроглии (Chiu et al., 2017). Вместе с тем, подавление астроцитов вызывает и негативный эффект, поскольку дегенерация астроцитов, под действием флуорцитрата, снижала возможности восстановления и компенсации на моделях паркинсонизма и ишемического инфаркта мозга (Nayakawa et al., 2010; Kuter et al., 2019), а на модели болезни Альцгеймера генетическое подавление астроцитов отягощало патологические изменения (Katsouri et al., 2020).

Цель настоящего исследования — охарактеризовать изменения астроцитов *in vitro* и *in vivo* под действием L-аминоадипиновой кислоты и уточнить используемые оптимальные дозы и сроки действия токсина для повреждения астроглии в эксперименте.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Первичные диссоциированные глиальные культуры клеток мозжечка и коры больших полушарий.** Для получения культур клеток использовали потомство крыс Вистар, полученных из питомника “Столбовая” (Национальный центр биомедицинских технологий ФМБА России). Животных подвергали этаназии с помощью диэтилового эфира. У трех постнатальных 8-дневных крысят извлекали мозжечок, а у трех 10-дневных крыс — кору больших полушарий. Выбранный период соответствует окончанию волны

постнатальной пролиферации астроцитов, наблюдающейся на первой неделе постнатального развития (Ge et al., 2012; Cerrato et al., 2018).

После удаления мозговых оболочек и промывки в фосфатном солевом буфере (PBS) мозжечок и кору иссекали скальпелем на мелкие фрагменты и помещали на 15 мин в термостат (37°C) в 0.25%-ный раствор трипсина. Фрагменты ткани промывали в среде для культивирования, содержащей минимальную среду Игла, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 10 мМ буфера HEPES, 2 мМ глутамакса, 600 мг глюкозы и 25 мМ KCl. Среда для коры не содержала KCl. Фрагменты пятикратно пропускали через пастеровскую пипетку, после чего надосадочную жидкость переносили в центрифужную пробирку, процедуру повторяли до диссоциации ткани. Полученную суспензию центрифугировали 3 мин при 1000 об./мин, осадок ресуспендировали в среде для культивирования. Количество клеток мозжечка в суспензии, подсчитанное на счетчике Invitrogen Countess (Invitrogen, США) составляло 4–5 млн/мл. Клетки в суспензии коры не подсчитывали из-за массивного детрита. Суспензию по 150–200 мкл наносили на покровные стекла (24 × 24 мм), покрытые полиэтиленгликолем (0.5 мг/мл) и помещенные в чашки Петри диаметром 40 мм. Культивировали клетки в CO<sub>2</sub> инкубаторе (NuAire, США) при 35.5°C, во влажной атмосфере с содержанием углекислоты 5%. Через 2 ч в чашки добавляли среду до 1.5 мл без KCl. Через 5 дней среду полностью заменяли новой, без KCl. При этом в последующие сутки нейроны мозжечка погибали, а культура коры очищалась от детрита и в обоих случаях наблюдалось развитие глии. На 12 день *in vitro* (DIV) в эксперименте с культурой коры или на 6 день *in vitro* (DIV) в эксперименте с культурой мозжечка вносили не более 10 мкл раствора L-AA на PBS так, чтобы конечная концентрация L-AA составила 0.17, 0.7, 0.35 или 1.4 мМ. Через сутки после внесения в культуру раствора L-AA, ее фиксировали 15 минут холодным 2% раствором формалина на PBS, после чего многократно промывали PBS и использовали для иммунофлуоресцентного мечения.

**Стереотаксическое введение L-AA в стриатум.** L-AA растворяли в 1М HCl в концентрации 120 мкг/мкл, и доводили до pH 7.3 с помощью 1М NaOH, после чего разбавляли 0.01М PBS (pH 7.2–7.4) до итоговой концентрации L-AA 20 мкг/мкл (Khurgel, 1996). Стереотаксическое введение L-AA проводили 12 крысам Вистар (получены из питомника “Столбовая”), самцам. Для премедикации применяли атропин в дозе 0.04 мг/кг подкожно. Для анестезии животным вводили Zoletil-100 в дозе 3 мг/100 г и ксиланит в дозе 3 мг/кг внутримышечно. С помощью двойного стереотаксического манипулятора (Stoelting, США) в правый стриатум животного (координаты по атласу Paxinos AP = 1.5; L = 2.5; V = 4.8), используя микрошприц (Hamilton, США), вводили 5 мкл раствора L-AA, а в левый стриатум вводили PBS в том же объеме. Равное количество ( $n = 4$ ) животных выводили из

эксперимента на вторые (48 ч), третьи (72 ч) и 12 сут после операции. Крыс наркотизировали хлоралгидратом, декапитировали гильотиной, извлекали мозг и фиксировали 24 ч погружением в 4%-ный формалин. Далее образцы пропитывали 30%-ным раствором сахарозы, заливали средой О.С.Т. и готовили фронтальные замороженные срезы толщиной 10 мкм, на уровне стриатума.

**Иммунофлуоресцентное мечение.** Астроциты выявляли с помощью поликлональных кроличьих антител к глиофибрилярному белку GFAP (1 : 500), нейроны – с помощью моноклональных кроличьих антител к белку NeuN (1 : 400), а лизосомный белок LAMP2 – с помощью моноклональных мышинных антител (1 : 150). Срезы нагревали 15 мин в пароварке, помещая их в цитратный буфер pH = 6.0, для демаскировки антигена. Стекла с культурами не нагревали, но выдерживали 1 ч в PBS, содержащем 0.1% Triton X-100 для пермеабилзации мембран, а затем инкубировали с первичными антителами во влажной камере 12 ч при комнатной температуре, промывали PBS. Далее для визуализации связывания срезы инкубировали 2 ч с вторичными антителами. Использовали соответствующие антитела (1 : 200) против иммуноглобулинов мыши или кролика, конъюгированные с флуорохромами CF555 или CF488 соответственно. Препараты заключали в среду Fluoroshield, содержащую 0.0002% DAPI, и исследовали под микроскопами Nikon Eclipse Ni-u (Nikon, Япония) и Nikon SMZ25 (Nikon, Япония).

**Морфометрия и анализ данных.** Полученные изображения анализировали с помощью программы Nikon NIS Elements (Nikon, Япония). GFAP-позитивные астроциты в культуре подсчитывали вручную, на фотоизображениях, полученных при увеличении объектива 10×, изучали не менее 15 полей зрения с одного стекла. Интенсивность окрашивания оценивали на изображениях, полученных при одинаковых настройках микроскопа и камеры. Для выделенной области определяли среднюю яркость в условных единицах для 8-битного изображения (256 градаций). Для оценки иммуномечения LAMP2 выделяли профиль клетки (не менее 100 клеток) с помощью графического планшета Wacom (Wacom, Япония). Для оценки экспрессии GFAP при стереотаксическом введении выделяли область шириной 1 мм вокруг трека иглы (не менее чем на 5 срезах стриатума от одного животного). Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism (GraphPad Soft, США). Полученные результаты от каждого животного усредняли. Для сравнения групп использовали дисперсионный анализ ANOVA, с апостериорным тестом Тьюки.

**Использованные реактивы:** фосфатный солевой буфер, минимальная среда Игла, глутамакс (Gibco, США); фосфатный солевой буфер (MP Biomedicals, США); раствор трипсина, буфер HEPES, глюкоза, полиэтиленимин, хлоралгидрат, Triton X-100, цит-

ратный буфер, конъюгированные с CF488 антитела козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с CF555 антитела козы против иммуноглобулинов мыши, среда для заключения Fluoroshield с DAPI (Sigma, США); эмбриональная бычья сыворотка (HyClone, США); KCl, HCl, NaOH, сахароза (Химмед, Россия); L-аминоадипиновая кислота (Acros Organics, Бельгия); формалин (Гистолойн, Россия); атропин (ГНЦЛС, Украина); Zoletil-100 (Virbac, Франция); ксиланит (ОО НИТА-Фарм, Россия); О.С.Т. comraund (Electron Microscopy Science, США); кроличьи антитела к глиофибрилярному белку GFAP (Abcam, ab7260, США); моноклональные антитела кролика к NeuN (Abcam, ab177487); моноклональные мышинные антитела к LAMP2 (Thermo Fisher, PA1-655, США).

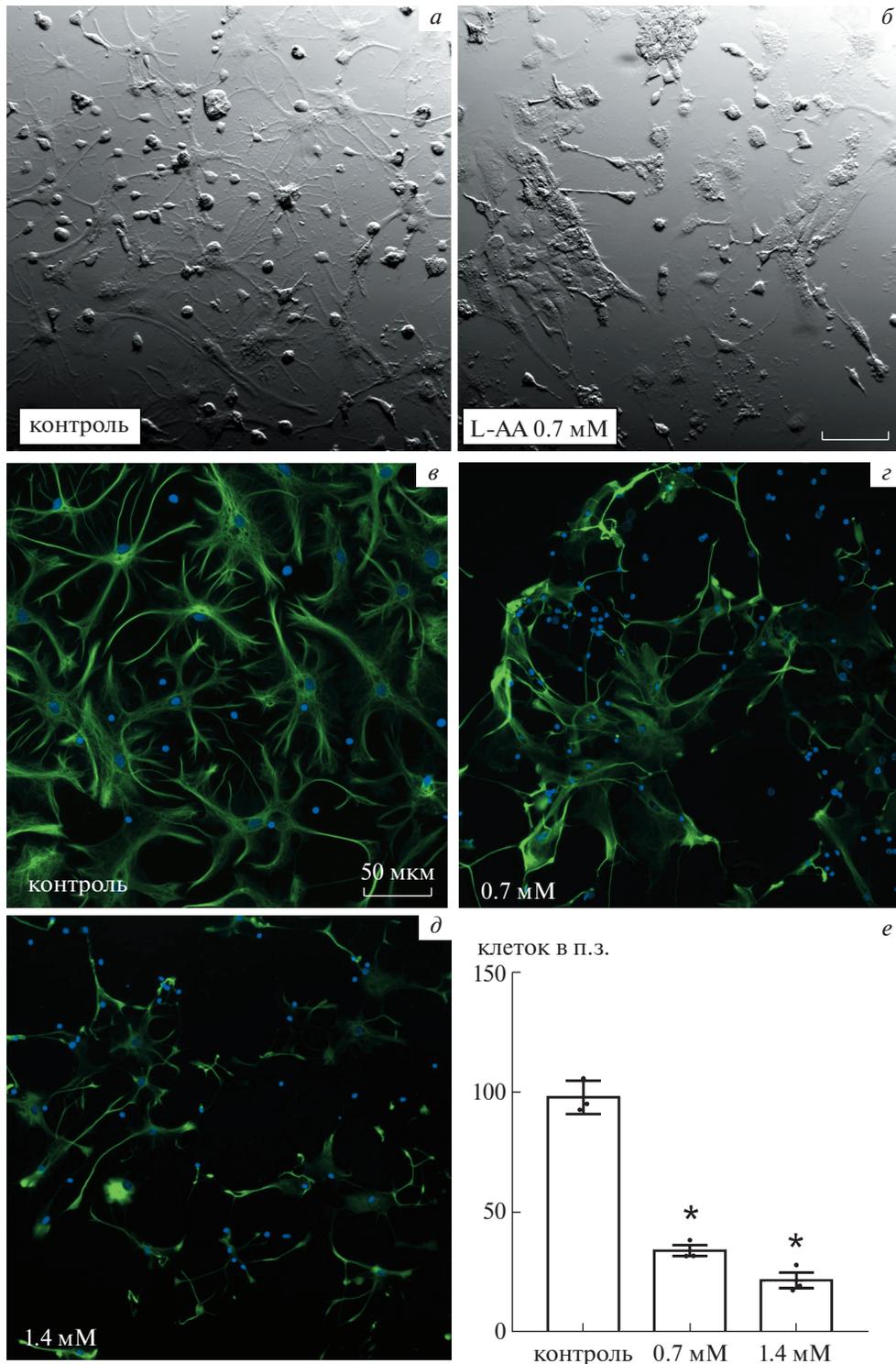
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При внесении L-AA в культуру клеток коры морфология GFAP-позитивных астроцитов резко изменялась, что выражалось в пикнозе ядер и разнообразных патологических изменениях формы клеток: размеры тел клеток и количество их отростков уменьшалось, а тела астроцитов деформировались (рис. 1а–д).

Количество GFAP-позитивных астроцитов в культуре клеток неокортекса статистически значимо снижалось (ANOVA,  $F = 159$ ,  $p < 0.01$ ) при использовании L-AA в концентрациях 0.7 и 1.4 мМ (рис. 1е). При более высокой концентрации токсина морфологические изменения были выражены сильнее (рис. 1в–д).

В эксперименте, выполненном на первичной культуре мозжечка, выявили сходные изменения. Под действием L-AA значимо снижалось как количество астроцитов (ANOVA,  $F = 38.5$ ,  $p < 0.01$ ), так и размеры (эквивалентный диаметр) их ядер (ANOVA,  $F = 158$ ,  $p < 0.01$ ). Эффект зависел от концентрации L-AA (табл. 1). Статистически значимое снижение числа астроцитов по сравнению с контролем обнаружили при всех концентрациях L-AA, тогда как средний эквивалентный диаметр их ядер при концентрации 0.17 мМ не менялся относительно контроля, а при концентрации 0.35 мМ – снижался лишь на 14%, что указывает на малую долю пикнотических ядер, по сравнению с концентрацией L-AA 1.4 мМ.

Так как токсическое влияние L-AA на астроциты, но не на нейроны, было ранее показано нами (Ставровская и др., 2019) и другими авторами (Huck et al., 1984, Khurgel et al., 1996, Brown, Kretschmar, 1998), в настоящем исследовании мы не оценивали повреждение нейронов. Морфологические изменения астроглии мозжечка были сходны с изменениями астроцитов в культуре неокортекса, кроме того, были отмечены изменения в окрашивании на GFAP тел астроцитов и их отростков: часто дистальные отделы



**Рис. 1.** Повреждение астроцитов в культуре неокортекса под действием L-AA. *a, v* – Контроль, *б, z* – 0.7 мМ L-AA, *д* – 1.4 мМ L-AA. Масштабный отрезок – 50 мкм. *a, б* – Косое освещение (Nikon OCC contrast), *v–д* – выявление GFAP, ядра докрашены DAPI, *z* – число GFAP-позитивных астроцитов (клеток в поле зрения при увеличении объектива 10 $\times$ ), результаты представлены в виде среднее  $\pm$  средноквадратичное отклонение.

отростков астроцитов окрашивались на GFAP слабо, а структура сети промежуточных филаментов была нарушена. Отмечали сморщивание клеток, из-

менения формы отростков астроцитов (рис. 2*z–e*), что согласуется с данными других авторов (Huck et al., 1984).

**Таблица 1.** Изменения GFAP-позитивной астроглии в первичной культуре мозжечка под действием L-AA

Экспериментальные группы	Эквивалентный диаметр ядер астроцитов, мкм	Число астроцитов (клеток на 0.25 мм <sup>2</sup> )	Интенсивность окрашивания на LAMP2, усл. ед. яркости
Контроль	13.7 ± 1.9	35.0 ± 13.9	19.3 ± 4.3
L-AA (0.17 мМ)	13.2 ± 2.4	20.8 ± 7.2 <sup>a</sup>	18.4 ± 3.8
L-AA (0.35 мМ)	11.8 ± 2.6 <sup>a, б</sup>	16.7 ± 7.5 <sup>a</sup>	20.9 ± 4.9 <sup>б</sup>
L-AA (1.4 мМ)	7.7 ± 1.7 <sup>a, б, в</sup>	12.8 ± 7.2 <sup>a, б</sup>	25.0 ± 6.7 <sup>a, б, в</sup>

Значения приведены в виде: среднее ± среднеквадратичное отклонение; <sup>a</sup> – достоверные отличия от контрольной группы ( $p < 0.05$ ), <sup>б</sup> – достоверные отличия от группы L-AA (0.17 мМ) ( $p < 0.05$ ), <sup>в</sup> – достоверные отличия от группы L-AA (0.35 мМ) ( $p < 0.05$ ); ANOVA, апостериорный тест Тьюки.

Хотя ранее сообщалось (Brown, Kretschmar, 1998), что L-AA повреждает преимущественно астроциты 1-го типа в глиальных культурах коры, наши наблюдения не подтвердили различий в действии L-AA на астроциты разных типов, поскольку обнаруживали гибель астроцитов, имеющих разную морфологию. Кроме того, выявленный в нашей работе эффект L-AA был более выраженным при меньших концентрациях L-AA, чем в указанной работе (Brown, Kretschmar, 1998).

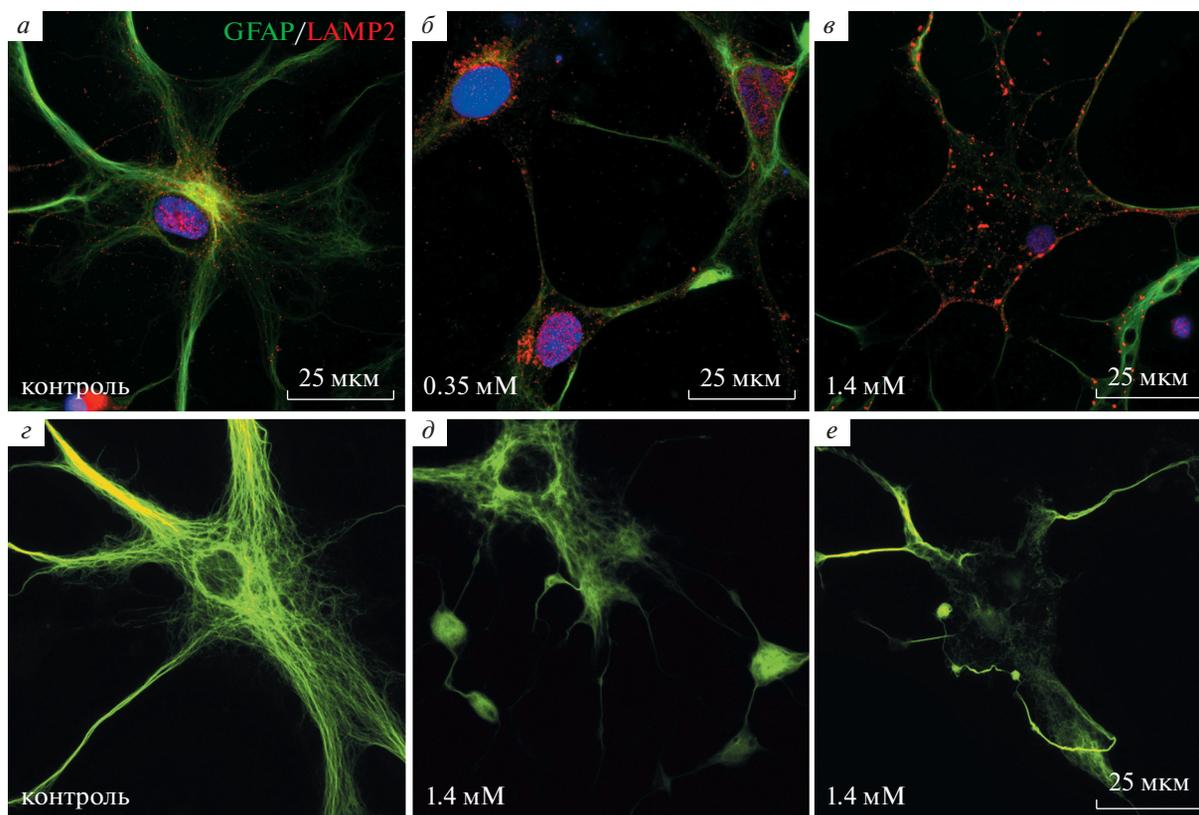
По действию L-AA средняя интенсивность окрашивания на лизосомный белок LAMP2 в телах астроцитов увеличивалась (ANOVA  $F = 27.63$ ,  $p < 0.01$ ), что может указывать на повышение экспрессии LAMP2. Усиление окрашивания в виде пунктата в цитоплазме астроцитов обнаруживалось как у клеток с пикнозом, так и в астроцитах с неизменными ядрами, при концентрации L-AA 0.35 мМ (табл. 1, рис. 2а–в).

Выявленное нами усиление иммуноокрашивания с помощью антител к маркеру лизосом LAMP2 позволяет предположить активацию лизосом. Это может объясняться как участием сохранных активированных астроцитов в фагоцитозе клеточного детрита (Morales et al., 2017; Morizawa et al., 2017) при токсическом действии L-AA, так и активацией аутофагально-лизосомного пути, который может иметь как протекторное значение, так и вносить вклад в повреждение астроцитов. Активация аутофагии в астроцитах показана в экспериментах на моделях фокальной ишемии и болезни Александера (Tang et al., 2008; Qin et al., 2010) и таких нейродегенеративных заболеваний как болезнь Паркинсона и Альцгеймера (Wang, Xu, 2020). Астроцитарный фагоцитоз в свою очередь так же может иметь значение в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, поскольку устранение клеточного детрита может снижать вовлечение микроглии и сопутствующие негативные последствия (Iglesias et al., 2017).

В целом, наиболее выраженные эффекты воздействия L-AA на астроциты мозжечка обнаруживали при концентрациях 0.35 и 1.4 мМ. При использовании L-AA в концентрации 1.4 мМ число выявляемых астроцитов в культуре неокортекса, по сравнению с контролем, снижалось на 88%, а в культуре мозжечка – на 64%, и хотя эти результаты напрямую мало сопоставимы, они позволяют предположить, что астроциты коры более чувствительны к токсическому действию L-AA. Следует подчеркнуть, что L-AA повреждала астроциты неокортекса и мозжечка, несмотря на морфологические и нейрохимические различия между ними (Buffo, Rossi, 2013), и токсическое действие L-AA на культивируемые астроциты не зависело от наличия или отсутствия в клеточной культуре нервных клеток.

Эксперимент с интрацеребральным введением также подтвердил глиотоксическое действие L-AA на астроциты головного мозга (рис. 3). Через 48 ч после введения L-AA в стриатум наблюдали выраженное повреждение астроглии и формирование GFAP-негативной зоны в области введения (рис. 3а, е). Таким образом, имеющиеся в литературе данные (Saffran, Crutcher, 1987) об отсутствии токсического действия L-AA на астроциты стриатума при интрацеребральном введении не находят подтверждения в нашей работе. Важно отметить, что интрацеребральное введение L-AA вызывает одновременно как гибель астроглии, так и ее активацию по периферии пораженной зоны.

При однократном интрацеребральном введении погибшие астроциты быстро замещались новыми клетками, источником которых могло быть как деление астроглии *in situ*, в периферической зоне поражения, так и миграция астроцитарных предшественников из субвентрикулярной зоны (Buffo et al., 2008; Faiz et al., 2015). Через 72 ч после интрацеребрального введения область ослабленного окрашивания с помощью антител к GFAP в стриатуме уменьшалась, а через 12 сут она замещалась реактивными астроци-



**Рис. 2.** Изменения астроцитов в культуре мозжечка под действием L-АА. *a–в* – Иммунофлуоресцентное выявление GFAP (зеленый цвет) и LAMP2 (красный цвет). Ядра докрашены DAPI. *г–е* – изменения формы астроцитов и структуры промежуточных филаментов. *a, г* – Контроль, *б* – 0.35 мМ L-АА, *в, д, е* – 1.4 мМ L-АА. Ув. об. 100×. Масштабный отрезок 25 мкм.

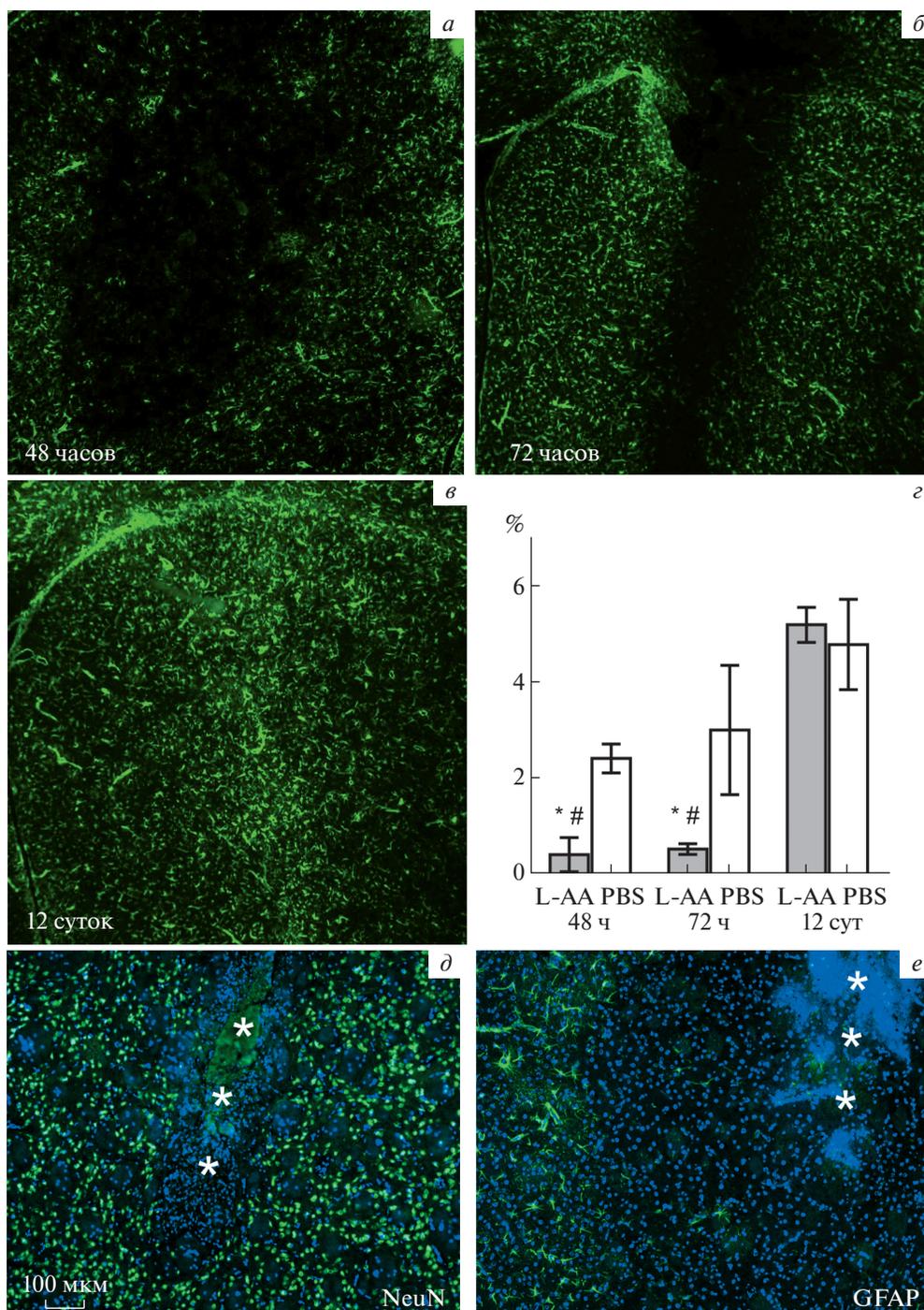
тами, формирующими рубец вокруг трека иглы (рис. 3*a–в*). Зона некротических изменений была ограничена областью механического повреждения ткани иглой. Окрашивание с помощью антител к NeuN показало сохранность нейронов через 72 ч после введения токсина в непосредственной близости от трека иглы (рис. 3*д*), тогда как зона повреждения астроглии (рис. 3*е*) была существенно больше. Площадь, занимаемая GFAP-положительной астроглией в области стриатума, прилегающей к треку иглы статистически значимо уменьшалась (ANOVA,  $F = 32.47$ ,  $p < 0.01$ ) через 48 и 72 ч после введения L-АА, как по сравнению с контрольной областью (введение PBS в те же сроки), так и в сопоставлении с группой животных через 12 сут после введения L-АА.

Сочетание повреждения астроцитов и их активации – это важные характеристики интрацеребрального введения L-АА в нервную ткань мозга животного, поскольку они отражают процессы, происходящие при нейродегенеративных заболеваниях (Рекну, Рекна, 2016), и эти процессы не воспроизводятся на генетических моделях, связанных с удалением астроцитов (Jakel, Dimou, 2017; Liu et al., 2019).

Таким образом, астроциты новой коры, мозжечка и стриатума крыс чувствительны к токсическому действию L-АА. Эксперименты на первичных куль-

турах клеток коры и мозжечка показали, что в диапазоне концентраций 0.35–1.4 мМ L-АА снижает экспрессию GFAP, приводит к повреждению и гибели астроцитов, вызывает пикноз и активацию лизосом. Через 2 сут после однократного введения в стриатум крыс 20 мкг L-АА на месте введения формируется обширная, лишенная GFAP-положительной астроглии, область повреждения, которая к 12 сут после введения токсина замещается вновь образованными астроцитами, формирующими глиальный рубец.

Хотя введение L-АА непосредственно не приводило к гибели нейронов, что согласуется с данными об избирательном захвате L-АА астроцитами (Pow, 2001), повреждение астроцитов и, как результат, активация эксайтотоксических реакций и нарушение энергетического обмена могут отсрочено влиять на нейроны, что требует отдельного исследования. Наблюдающаяся активация астроглии и формирование рубца на поздних сроках после введения L-АА также приводят к перестройке глио-нейрональных взаимодействий и могут провоцировать функциональные нарушения нейронов. Однако, реактивный астроглиоз может оказывать как положительные, так и отрицательные эффекты на нейроны, в зависимости от условий (Sofroniew, 2009; Anderson et al., 2016).



**Рис. 3.** Гибель и замещение астроцитов при введении L-AA в стриатум. *а* – 48 ч после введения, *б* – 72 ч после введения, *в* – 12 сут после введения. Иммунофлуоресцентное выявление GFAP. Ув. об. 4×. *з* – Площадь, занимаемая GFAP-позитивными элементами, в процентах от поля зрения. *Серые столбики* – введение L-AA, *белые столбики* – контралатеральное полушарие, введение PBS. Данные представлены в виде среднее ± среднеквадратичное отклонение. \* – достоверные отличия от противоположного полушария ( $p < 0.05$ ), # – достоверные отличия от ипсилатерального полушария через 12 сут после введения L-AA ( $p < 0.05$ ). ANOVA, апостериорный тест Тьюки. *д, е* – Область введения токсина через 72 ч после начала эксперимента при большем увеличении. Масштабный отрезок 100 мкм. Трек иглы отмечен *звездочками*. *д* – Иммунофлуоресцентное выявление NeuN, *е* – иммунофлуоресцентное выявление GFAP.

Проведенная работа показала, что L-аминоадипиновая кислота может быть использована для повреждения астроцитов в диссоциированной культуре клеток мозжечка и неокортекса, и при интрацеребральном введении. Модель с введением L-аминоадипиновой кислоты может применяться для исследования повреждения астроцитов, их активации и восстановления популяции в разных условиях, для исследования роли астроцитарной дисфункции при нейродегенеративных заболеваниях, а так же возможностей регуляции провоспалительной реакции астроглии.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет бюджетного финансирования Федерального государственного бюджетного научного учреждения Научный центр неврологии в рамках государственного задания.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Манипуляции с животными проводили в соответствии с регламентирующими документами (Принципы надлежащей лабораторной практики 2009, ГОСТ Р 53434-200 и рекомендациями ЕС “Euthanasia of experimental animals”, 1997, ISBN 92-827-9694-9). Номер решения локального этического комитета № 2-5/19 от 20.02.2019 г.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Концепция и дизайн исследования – Воронков Д.Н., Дикалова Ю.В.; анализ и интерпретация данных – Худоерков Р.М., Воронков Д.Н., Дикалова Ю.В.; проведение эксперимента и обработка материала – Лыжин А.А., Воронков Д.Н., Дикалова Ю.В., Ставровская А.В.; статистическая обработка – Воронков Д.Н., Дикалова Ю.В.; написание работы – Воронков Д.Н., Худоерков Р.М., Дикалова Ю.В., Хаспеков Л.Г.; финальное редактирование текста – Худоерков Р.М., Хаспеков Л.Г., Дикалова Ю.В.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ставровская А.В., Воронков Д.Н., Ольшанский А.С., Гуцина А.С., Ямищикова Н.Г. 2019. Экспериментальный паркинсонизм при моделировании повреждения астроцитов стриатума. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. Т. 13. № 3. С. 28. (*Stavrovskaya A.V., Voronkov D.N., Ol'shansky A.S., Gushchina A.S., Yamshchikova N.G.* 2019. Experimental parkinsonism in modeling striatal astrocyte damage. *Annals of clinical and experimental neurology*. V. 13. № 3. P. 28.)
- Хаспеков Л.Г., Фрумкина Л.Е. 2017. Молекулярные механизмы, опосредующие участие глиальных клеток в пластических перестройках головного мозга при эпилепсии. *Биохимия*. Т. 18. № 3. С. 528 (*Khaspekov L.G., Frumkina L.E.* 2017. Molecular mechanisms mediating involvement of glial cells in plastic brain reorganization in epilepsy. *Biochemistry*. V. 18. № 3. P. 528.)
- Anderson M.A., Burda J.E., Ren Y., Ao Y., O'Shea T.M., Kawaguchi R., Coppola G., Khakh B.S., Deming T.J., Sofroniew M.V. 2016. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*. V. 532. P. 195.
- Banasr M., Duman R.S. 2008. Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biol. Psychiatry*. V. 64. P. 863.
- Billet F., Costentin J., Dourmap N. 2007. Influence of glial cells in the dopamine releasing effect resulting from the stimulation of striatal  $\delta$ -opioid receptors. *Neuroscience*. V. 150. P. 131.
- Brown D.R., Kretschmar H.A. 1998. The glio-toxic mechanism of alpha-aminoadipic acid on cultured astrocytes. *J. Neurocytol.* V. 27. P. 109.
- Buffo A., Rite I., Tripathi P., Lepier A., Colak D., Horn A-P., Mori T., Götz M. 2008. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *PNAS*. V. 105. P. 3581.
- Buffo A., Rossi F. 2013. Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Prog. Neurobiol.* V. 109. P. 42.
- Cerrato V., Parmigiani E., Figueres-Oñate M., Betizeau M., Aprato J., Nanavaty I., Berchiolla P., Luzzati F., de'Sperati C., López-Mascaraque L., Buffo A. 2018. Multiple origins and modularity in the spatiotemporal emergence of cerebellar astrocyte heterogeneity. *PLOS Biol.* V. 16. P. e2005513. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005513>
- Chang Y.F., Cauley R.K., Chang J.D., Rao V.V. 1997. L-alpha-aminoadipate inhibits kynurenate synthesis in rat brain hippocampus and tissue culture. *Neurochem. Res.* V. 22. P. 825.
- Chiu C.-D., Yao N.-W., Guo J.-H., Shen C.-C., Lee H.-T., Chiu Y.-P., Ji H.-R., Chen X., Chen C.-C., Chang C. 2017. Inhibition of astrocytic activity alleviates sequela in acute stages of intracerebral hemorrhage. *Oncotarget*. V. 8. P. 94850.
- da Silva J.C., Amaral A.U., Cecatto C., Wajner A., dos Santos Godoy K., Ribeiro R.T., de Mello Gonçalves A., Zanatta A., da Rosa M.S., Loureiro S.O., Vargas C.R., Leipnitz G., de Souza D.O.G., Wajner M. 2017.  $\alpha$ -Ketoadipic acid and  $\alpha$ -aminoadipic acid cause disturbance of glutamatergic neurotransmission and induction of oxidative stress in vitro in brain of adolescent rats. *Neurotox. Res.* V. 32. P. 276.
- Faiz M., Sachewsky N., Gascón S., Bang K.W.A., Morshead C.M., Nagy A. 2015. Adult neural stem cells from the subventricular zone give rise to reactive astrocytes in the cortex after stroke. *Cell. Stem Cell*. V. 17. P. 624.
- Ge W.-P., Miyawaki A., Gage F.H., Jan Y.N., Jan L.Y. 2012. Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature*. V. 484. P. 376.
- Hayakawa K., Nakano T., Irie K., Higuchi S., Fujioka M., Orito K., Iwasaki K., Jin G., Lo E. H., Mishima K., Fujiwara M. 2010. Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* V. 30. P. 871.
- Huck S., Grass F., Hortnagl H. 1984. The glutamate analogue alpha-aminoadipic acid is taken up by astrocytes before exerting its gliotoxic effect *in vitro*. *J. Neurosci.* V. 4. P. 2650.

- Iglesias J., Morales L., Barreto G.E. 2017. Metabolic and inflammatory adaptation of reactive astrocytes: role of PPARs. *Mol. Neurobiol.* V. 54. P. 2518.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-9833-2>
- Jäkel S., Dimou L. 2017. Glial cells and their function in the adult brain: a journey through the history of their ablation. *Front. Cell. Neurosci.* V. 11.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00024>
- Katsouri L., Birch A.M., Renziehausen A.W.J., Zach C., Aman Y., Steeds H., Bonsu A., Palmer E.O.C., Mirzaei N., Ries M., Sastre M. 2020. Ablation of reactive astrocytes exacerbates disease pathology in a model of Alzheimer's disease. *Glia.* V. 68. P. 1017.
- Khurgel M., Koo A.C., Ivy G.O. 1996. Selective ablation of astrocytes by intracerebral injections of  $\alpha$ -aminoadipate. *Glia.* V. 16. P. 351.
- Kuter K., Olech Ł., Głowacka U., Paleczna M. 2019. Astrocyte support is important for the compensatory potential of the nigrostriatal system neurons during early neurodegeneration. *J. Neurochem.* V. 148. P. 63.
- Lee H.J., Jang H.B., Kim W.H., Park K.J., Kim K.Y., Park S.I., Lee H.J. 2019. 2-Aminoadipic acid (2-AAA) as a potential biomarker for insulin resistance in childhood obesity. *Sci. Rep.* V. 9. P. 13610.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-49578-z>
- Liu F., Dai S., Feng D., Peng X., Qin Z., Kearns A.C., Huang W., Chen Y., Ergün S., Wang H., Rappaport J., Bryda E.C., Chandrasekhar A., Aktas B., Hu H., et al. 2019. Versatile cell ablation tools and their applications to study loss of cell functions. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 76. P. 4725.
- Madadi S., Pasbakhsh P., Tahmasebi F., Mortezaee K., Khanehzad M., Boroujeni F.B., Noorzehi G., Kashani I.R. 2019. Astrocyte ablation induced by L- $\alpha$ -aminoadipate (L-AAA) potentiates remyelination in a cuprizone demyelinating mouse model. *Metab. Brain Dis.* V. 34. P. 593.
- McConnell H.L., Li Z., Woltjer R.L., Mishra A. 2019. Astrocyte dysfunction and neurovascular impairment in neurological disorders: Correlation or causation? *Neurochem. Int.* V. 128. P. 70.
- Morales I., Sanchez A., Rodriguez-Sabate C., Rodriguez M. 2017. Striatal astrocytes engulf dopaminergic debris in Parkinson's disease: A study in an animal model. *PLoS One.* V. 12 P. e0185989.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185989>
- Morizawa Y.M., Hirayama Y., Ohno N., Shibata S., Shigetomi E., Sui Y., Nabekura J., Sato K., Okajima F., Takebayashi H., Okano H., Koizumi S. 2017. Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nat. Commun.* V. 8. P. 28.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00037-1>
- Nishimura R.N., Santos D., Fu S.T., Dwyer B.E. 2000. Induction of cell death by L- $\alpha$ -aminoadipic acid exposure in cultured rat astrocytes: relationship to protein synthesis. *Neurotoxicology.* V. 21. P. 313.
- O'Neill E., Chiara Goisis R., Haverty R., Harkin A. 2019. L- $\alpha$ -aminoadipic acid restricts dopaminergic neurodegeneration and motor deficits in an inflammatory model of Parkinson's disease in male rats. *J. Neurosci. Res.* V. 97. P. 804.
- Olney J.W., de Gubareff T., Collins J.F. 1980. Stereospecificity of the gliotoxic and anti-neurotoxic actions of  $\alpha$ -aminoadipate. *Neurosci. Lett.* V. 19. P. 277.
- Pekny M., Pekna M. 2016. Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1862. P. 483.
- Pow D.V. 2001. Visualising the activity of the cystine-glutamate antiporter in glial cells using antibodies to aminoadipic acid, a selectively transported substrate. *Glia.* V. 34. P. 27.
- Qin A.P., Liu C.F., Qin Y.Y., Hong L.Z., Xu M., Yang L., Liu J., Qin Z.H., Zhang H.L. 2010. Autophagy was activated in injured astrocytes and mildly decreased cell survival following glucose and oxygen deprivation and focal cerebral ischemia. *Autophagy.* V. 6. P. 738.
- Saffran B.N., Crutcher K.A. 1987. Putative gliotoxin,  $\alpha$ -aminoadipic acid, fails to kill hippocampal astrocytes in vivo. *Neurosci. Lett.* V. 81. P. 215.
- Śmiałowska M., Szewczyk B., Woźniak M., Wawrzak-Wleciał A., Domin H. 2013. Glial degeneration as a model of depression. *Pharmacol. Reports.* V. 65. P. 1572.
- Sofroniew M.V. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* V. 32. P. 638.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>
- Takeda M., Takamiya A., Jiao J.W., Cho K.S., Trevino S.G., Matsuda T., Chen D.F. 2008.  $\alpha$ -aminoadipate induces progenitor cell properties of müller glia in adult mice. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* V. 49. P. 1142.  
<https://doi.org/10.1167/iovs.07-0434>
- Tang G., Yue Z., Talloczy Z., Goldman J.E. 2008. Adaptive autophagy in Alexander disease-affected astrocytes. *Autophagy.* V. 4. P. 701.
- Verkhatsky A., Nedergaard M. Physiology of astroglia. 2018. *Physiol. Rev.* V. 98. P. 239.
- Wang J.-L., Xu C.-J. 2020. Astrocytes autophagy in aging and neurodegenerative disorders. *Biomed. Pharmacother.* V. 122. P. 109691.  
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S105362>
- Wang T.J., Ngo D., Psychogios N., Dejam A., Larson M.G., Vasan R.S., Ghorbani A., O'Sullivan J., Cheng S., Rhee E.P., Sinha S., McCabe E., Fox C.S., O'Donnell C.J., Ho J.E. et al., 2013. 2-Aminoadipic acid is a biomarker for diabetes risk. *J. Clin. Invest.* V. 123. P. 4309.
- Wang X., Su J., Ding J. et al. 2016.  $\alpha$ -Aminoadipic acid protects against retinal disruption through attenuating Muller cell gliosis in a rat model of acute ocular hypertension. *Drug Des. Devel. Ther.* V. 10. P. 3449.
- Watmuff B., Berkovitch S.S., Huang J.H., Iaconelli J., Toffel S., Karmacharya R. 2016. Disease signatures for schizophrenia and bipolar disorder using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol. Cell Neurosci.* V. 73. P. 96.
- West E.L., Pearson R.A., Tschernutter M., Sowden J.C., MacLaren R.E., Ali R.R. 2008. Pharmacological disruption of the outer limiting membrane leads to increased retinal integration of transplanted photoreceptor precursors. *Exp. Eye Res.* V. 86. P. 601.

## Features of Brain Astrocyte Damage under the Influence of L-aminoadipic Acid *in vitro* and *in vivo*

D. N. Voronkov<sup>a</sup>, A. A. Lyzhin<sup>a</sup>, Yu. V. Dikalova<sup>a,\*</sup>, A. V. Stavrovskaya<sup>a</sup>,  
R. M. Khudoerkov<sup>a</sup>, and L. G. Khaspekov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Research Center of Neurology, Moscow, 10506 Russia

\*e-mail: dzettaly@gmail.com

L-aminoadipic acid (L-AA) is known to have toxic effects on astroglia. The aim of this work is to characterize the morphological changes in astrocytes *in vitro* and *in vivo* under the action of L-AA. The effect of L-AA in the concentration range 0.17–1.4 mM on the astroglia of primary dissociated cultures of the rat cortex and cerebellum, as well as upon stereotaxic administration (20 µg) into the striatum of rats, was evaluated. Concentrations of 0.35–1.4 mM L-AA caused a decrease in GFAP expression, damage and death of astrocytes, pycnosis, cytoskeleton disturbances, and activation of lysosomes (increased LAMP2 expression). When 20 µg L-AA was injected into the striatum of rats, on the second day after administration, an extensive lesion area devoid of GFAP-positive astroglia was formed. This work has shown the promise of using L-aminoadipic acid for modeling astrocytic damage accompanying neurodegenerative diseases.

**Keywords:** astrocytes, L-aminoadipic acid, primary culture of the cortex, primary culture of the cerebellum, intracerebral administration, striatum

## ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА СТАБИЛЬНОСТЬ КАРИОТИПА ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЛЕГКОГО КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА *IN VITRO*

© 2021 г. Т. М. Гринчук<sup>1</sup>, \*, М. А. Шилина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

\*E-mail: grintat@bk.ru

Поступила в редакцию 02.09.2020 г.

После доработки 02.10.2020 г.

Принята к публикации 02.10.2020 г.

Вопрос о влиянии криозаморозки на стабильность генома клеток разного генотипического статуса остается открытым. В настоящей работе представлены результаты изучения влияния криозаморозки разной длительности на стабильность кариотипа фибробластов китайского хомячка линии CHL V-79 RJK, характеризующихся повышенной кариотипической стабильностью в стандартных условиях культивирования. Установлено, что реакция генома клеток CHL V-79 RJK на криозаморозку в зависимости от ее продолжительности далеко не однозначна. После длительного (10 лет) пребывания в жидком азоте при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ , в отличие от краткосрочной криозаморозки (3, 6 мес.) клетки демонстрируют тенденцию к разнотипной дестабилизации структуры кариотипа, а именно: к анеуплоидизации, увеличению пула хромосом, вовлекаемых в перестройки, к нарушению степени конденсации отдельных хромосом, к повышенному слипанию негомологичных хромосом (эктопическая конъюгация). Полученные данные говорят в пользу того, что многолетнее пребывание клеток в условиях глубокой заморозки может нарушить механизм клеточного деления и повлечь за собой дестабилизацию клеточного генома.

**Ключевые слова:** кариотип, хромосомы, криозаморозка, нестабильность генома

DOI: 10.31857/S0041377121010053

Разработка методов криоконсервации берет свое начало с первой половины XX в. Ее родоначальником считается английский ученый Эрнест Джон, который открыл криопротекторные свойства глицерина. Со временем метод криоконсервации был взят на вооружение и стал широко использоваться в разных областях биологии и медицины.

К настоящему времени накоплены данные о том, что скорость и температура криозаморозки, типы криопротекторов, используемые в процессе криоконсервации, реактивы, скорость и температура разморозки могут повлиять на физиологический и генетический статус клеток. Так, криоконсервация/декриоконсервация эмбриональных клеток человека вызывала их апоптоз и дифференцировку с последующей потерей их плюрипотентности и низкую выживаемость после разморозки (Pera et al., 2000; Reubinoff et al., 2000; Ji et al., 2004; Heng et al., 2005).

Подборке условий криохранения посвящено множество работ. На данный момент большинство протоколов криозаморозки клеток оптимизированы и большинство исследователей в своей работе используют стандартные протоколы. Однако проблеме влияния самой процедуры криоконсервации и дли-

тельного хранения на клеточный геном по сей день уделено мало внимания.

Современные методы криоконсервации делятся на две группы (He, 2011): медленное замораживание и сверхбыстрое замораживание (витрификация). Наиболее распространенная медленная криоконсервация позволяет замораживать клетки при низком содержании криопротекторов. Скорость медленного замораживания (при добавлении 1.5 М криопротекторов) для большинства клеток составляет  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  (Zhang et al., 2011), что обеспечивает большее выживание клеток. Повреждения клеток, вызываемые воздействием криопротекторов, вне- и внутриклеточным образованием льда, а также осмотической дегидратацией клеток под действием давления, неизбежны даже после оптимизации условий процессов замораживания–оттаивания. В этой связи возникновение разнотипных стрессовых ситуаций при криоконсервировании клеток *in vitro* вызывает беспокойство о физиологической и генетической стабильности после криоконсервации. Использование в исследовательских, биоинженерных, медицинских и коммерческих целях различных по происхождению клеточных линий требует их генетической стабильности. В основе стабильности генома

лежит точность прохождения в процессе клеточного цикла определенной последовательности событий, направленных на воспроизведение генетического материала в дочерних клетках. Нарушения на уровне репликации, репарации, сегрегации хромосом, удвоения центриолей, формирования веретена деления ведут к генетическим дефектам потомства (Di-aferia et al., 2008; Tan et al., 2019).

Возникающие изменения могут носить как спонтанный характер, так, и индуцированный, вызванный теми или иными факторами. Спонтанные изменения в своем большинстве относятся к числу неклональных (случайных) и встречаются с низкой частотой. Повторяющиеся в пределах популяции специфические изменения идентифицируются как селективные (Rangel et al., 2017).

Известно, что основные типы кариотипической нестабильности связаны с полиплоидизацией кариотипа и изменением структуры хромосом. Изменение геномной архитектуры, сопряженной с изменением профиля генной экспрессии, может стать причиной генетических заболеваний, озлокачествления клеток и ускоренного клеточного старения (Wang et al., 2005; Tang et al., 2012).

Имеющиеся на данный момент сведения о влиянии криозаморозки на клеточный геном являются далеко не полными и разноречивыми (deLima Prata et al., 2012). С одной стороны, широко распространено мнение о том, что криоконсервация, в частности краткосрочная (от нескольких дней до нескольких недель), не влияет и даже поддерживает фенотипическую и генотипическую стабильность клеток (deLima Prata et al., 2012; Polchow et al., 2012; Imaizumi et al., 2014). С другой стороны, существуют работы, указывающие на то, что после криозаморозки фенотип клеток может измениться (Duarte et al., 2012). При этом могут претерпеть модификационные изменения важнейшие клеточные элементы – мембраны, лизосомы, митохондрии, генетический аппарат (Полянская и др., 1990). На клеточных линиях грызунов (как трансформированных, так и не трансформированных) показано, что после декриоконсервации возможен обратимый усиленный внеплановый синтез ДНК, существенно превосходящий исходный уровень (Семенова, 1988).

В связи с тем, что вопрос о влиянии криозаморозки на стабильность генома клеток разного генотипического статуса остается не ясным, в настоящей статье представлены результаты изучения влияния криозаморозки на стабильность кариотипа. Объектом настоящего исследования были выбраны трансформированные фибробласты легкого китайского хомячка (линия CHL V-79 RJK), характеризующиеся повышенной кариотипической стабильностью.

Целью настоящей работы было проследить динамику кариотипических изменений клеток линии CHL V-79 RJK в связи с неоднократным применени-

ем в процессе культивирования процедуры криозаморозки и криохранения разной продолжительности.

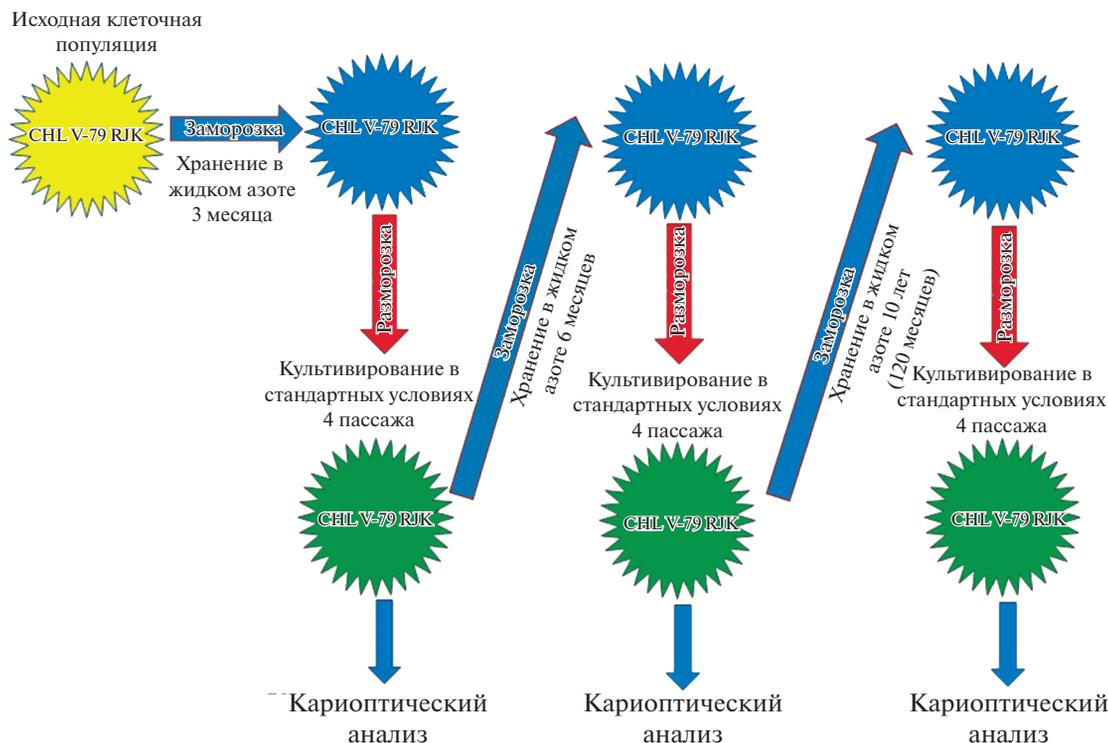
## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клеточный материал.** В настоящей работе были использованы клетки фибробластов легкого китайского хомячка постоянной трансформированной линии CHL V-79 RJK. Клеточная культура CHL V-79 RJK была предоставлена для работы доктором Ф. Раддлом (Йельский Университет, США).

**Культивировали клетки** в стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) с использованием культуральной среды DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 1% пенициллина–стрептомицина (Gibco, США). Клетки пересевали с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и EDTA (Gibco, США) в соотношении 1 : 4–1 : 6. Для культивирования использовали флаконы T25 и T75 (Fisher Scientific, США).

**Криоконсервация.** Клетки, открепленные с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и EDTA, помещали в пробирку, к ним добавляли культуральную среду и центрифугировали со скоростью 1500 об./мин в течение 5 мин. Супернатант удаляли, осадок разбивали и ресуспензировали в растворе 90%-ной бычьей эмбриональной сыворотки, содержащей 10% DMSO (Sigma, США). Ресуспензированные клетки переносили в криовials (Nunc, США) и замораживали со скоростью 1°C/мин, с последующим хранением в жидком азоте (–196°C). При разморозке ампулу с клетками быстро нагревали в водяной бане при 37°C. Клетки переносили в центрифужную пробирку, добавляли теплую ростовую среду и центрифугировали при 1750 об./мин в течение 5 мин. Отмытые от DMSO клетки помещали в культуральные флаконы.

**Кариотипирование.** В клеточную культуру для накопления клеток в стадии метафазы добавляли колхицин (Meck, США) в конечной концентрации 3.6 мкг/мл на 1 ч. Затем среду с колхицином удаляли, клетки ферментативно, с помощью 0.05%-ного трипсина, открепляли от пластика, собирали в центрифужные пробирки, суспензию центрифугировали (1000 об./мин), супернатант удаляли, осадок ресуспензировали, проводили обработку клеток 0.56%-ным раствором KCl (Реахим, Россия) в течение 15–20 мин. После удаления гипотонического раствора клетки фиксировали на холоде смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3 : 1) (3 смены фиксатора, общее время фиксации 1.5 ч). Фиксированный материал раскапывали на охлажденные влажные предметные стекла. Препараты в течение 1 нед. высушивали при комнатной температуре, после чего метафазные пластинки окрашивали на G-диски красителем Гимза (BDH, Англия) в PBS после их предварительной трипсинизации (0.25%-ный трипсин (Биолот)). Метафазные пластинки анализировали под световым микроскопом Ampleval



**Рис. 1.** Схема проведения эксперимента. Слева — исходная популяция клеток до заморозки. Часть популяция клеток на 4-ом пассаже после разморозки кариптировали, а часть замораживали для дальнейшего хранения в жидком азоте.

(Zeiss, Германия) при увеличениях объектива 20× и 100×. Хромосомы идентифицировали в соответствии со стандартной номенклатурой (Ray, Mohandas, 1975).

**Схема эксперимента** представлена на рис. 1. Исходную клеточную популяцию подвергли криозаморозке с хранением в жидком азоте в течении 3 мес., после чего клетки были разморожены и их культивировали в течении 4 пассажей в стандартных условиях. На четвертом пассаже часть клеток была подвергнута кариптоическому анализу, а часть — криозаморозке. В новой заморозке было увеличено время пребывания клеток в жидком азоте в 2 раза, до 6 мес. Через 6 мес. клетки разморозили и культивировали, как и в первый раз, 4 пассажа. На четвертом пассаже часть клеток была подвергнута кариптоическому анализу, а часть — криозаморозке. Длительность 3-го периода хранения клеток в азоте была значительно больше, чем в первые две заморозки, клетки хранили в течении 10 лет (120 мес.). После этого клетки разморозили и прокультивировали до 4-ого пассажа. На четвертом пассаже после разморозки клетки были подвергнуты кариптоическому анализу.

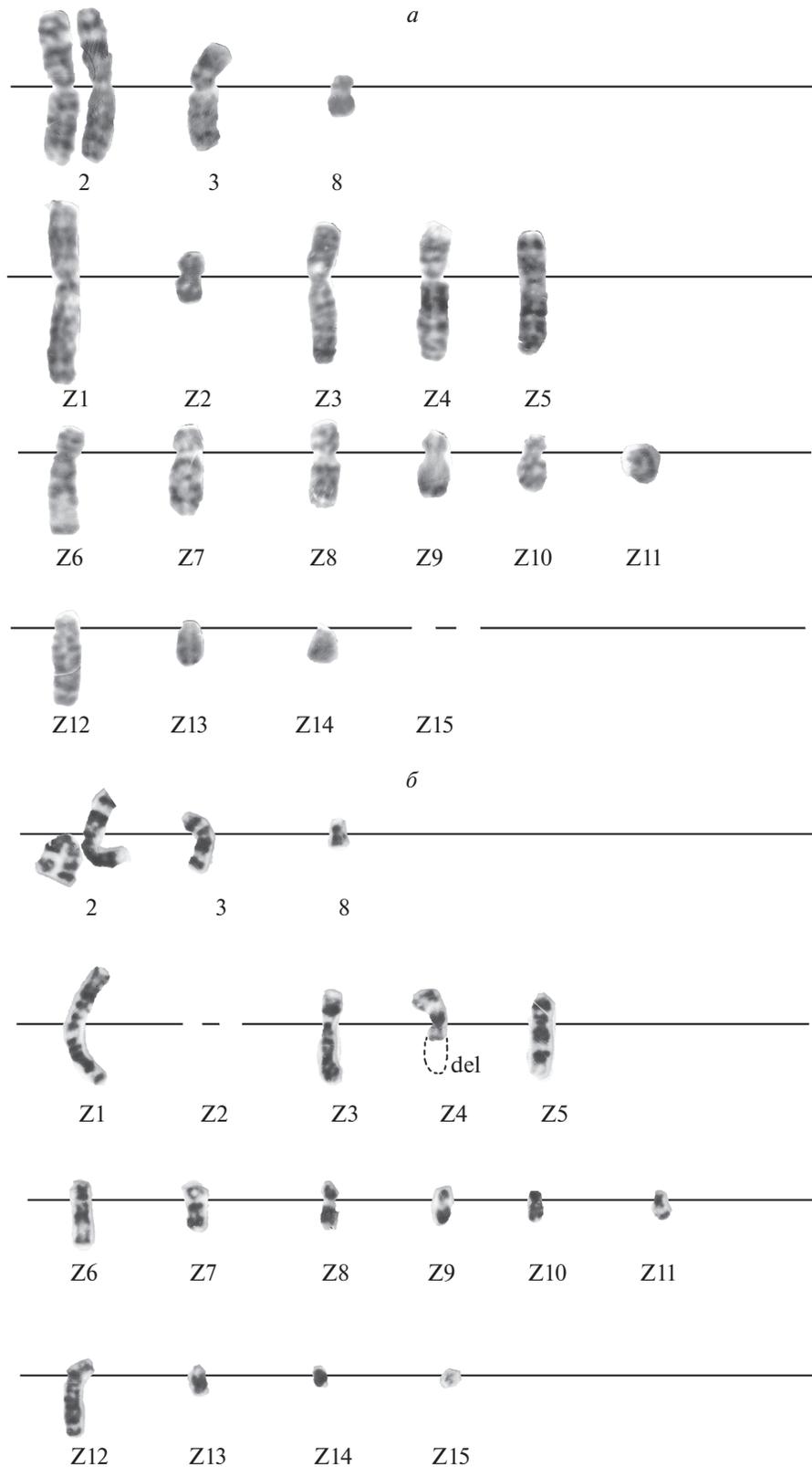
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Кариотип клеток CHL V-79 RJK является анеуплоидным и представлен 4 неперестроенными хромосомами, типичными для клеток китайского хомячка

в норме (две копии хромосомы 2, хромосомы 3 и 8 — по одной копии) и 15 уникальными перестроенными хромосомами (Z1–Z15), являющихся маркерами линии (рис. 2a). Модальный класс числа хромосом в клетках выражен и представлен 17–19 хромосомами. Стабильность структуры хромосомы Z2, равно как и ее присутствие в кариптоическом наборе не постоянно. Самые короткие хромосомы Z14 и Z15 в единичных случаях отсутствуют, либо представлены двумя копиями. В проанализированной популяции только одна клетка имела кариптоическое нарушение, связанное с наличием делеции в длинном плече хромосомы Z3 (рис. 2б, табл. 1). Анеуплоидные клеточные варианты отсутствовали.

Работа по изучению влияния криозаморозки разной продолжительности на стабильность кариптипа клеток CHLV-79 RJK состояла из 2-х этапов: 1) анализа структуры кариптипа данных клеток после заморозки/разморозки с краткосрочным (3 и 6 мес.) хранением их в жидком азоте; 2) изучения влияния на клеточный геном многолетнего (10 лет) хранения клеток в жидком азоте при температуре –196°С.

Кариотипический анализ клеток после первой краткосрочной заморозки (3 мес. в жидком азоте) выявил в структуре кариптипа единичные структурные нарушения хромосом, а именно хромосом Z3, Z7 и Z8. В одной из клеток наблюдалось отсутствие хромосомы (Z10) (рис. 3, табл. 1). Каждая из выяв-



**Рис. 2.** Кариотип клеток китайского хомячка линии CHL V-79 RJK до первой процедуры криозаморозки/разморозки. *а* – Стандартный кариотип.  $N = 18$ . Хромосомы 2, 3, 8 не перестроены; Z1–Z15 – маркеры линии. Хромосома Z15 – отсутствует. *б* – Кариотип с перестройкой.  $N = 18$ . Z4 delq – делеция длинного (q) плеча хромосомы Z4, отсутствие хромосомы Z2.

Таблица 1. Картиотипические особенности клеток линии CHL V-79 RJK после криохранения различной продолжительности

Картиотипические отклонения в клетках CHL V-79 RJK (контроль)																	
Ядро №, пп	Хромосомы																
	Z1	2	Z3	Z4	Z12	Z6	Z5	3	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z13	8	Z14	Z15
1	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>delq</i>	<i>n</i>													
2	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
3	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	—	<i>n</i>	<i>n</i>
4	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
5	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>2n</i>
6	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
7	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
8	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
9	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	—	<i>n</i>	<i>n</i>
10	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
11	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
12	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
13	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
14	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	—	<i>n</i>	<i>n</i>
15	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
16	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>

Картиотипические отклонения в клетках CHL V-79 RJK через 3 мес. хранения в жидком азоте

Картиотипические отклонения в клетках CHL V-79 RJK через 3 мес. хранения в жидком азоте																	
Ядро №, пп	Хромосомы																
	Z1	2	Z3	Z4	Z12	Z6	Z5	3	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z13	8	Z14	Z15
1	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
2	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	—	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
3	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
4	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
5	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	—	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
6	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
7	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>2n</i>
8	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>delqter</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>2n</i>
9	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
10	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
11	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	—	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
12	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
13	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>p+q</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
14	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
15	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
16	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>pdel</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>

Картиотипические отклонения в клетках CHL V-79 RJK через 6 мес. хранения в жидком азоте

Картиотипические отклонения в клетках CHL V-79 RJK через 6 мес. хранения в жидком азоте																	
Ядро №, пп	Хромосомы																
	Z1	2	Z3	Z4	Z12	Z6	Z5	3	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z13	8	Z14	Z15
1	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
2	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
3	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
4	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	—	<i>n</i>	<i>n</i>
5	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
6	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
7	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
8	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
9	<i>2n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
10	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n + (delqter)</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
11	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>2n</i>
12	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>delqter</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>						
13	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
14	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
15	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
16	<i>n</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
17	<i>delp</i>	<i>2n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	—	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>

Таблица 1. Окончание

Ядро №, пп	Хромосомы																
	Z1	2	Z3	Z4	Z12	Z6	Z5	3	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z13	8	Z14	Z15
1	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
2	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	—	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
3	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
4	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
5	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
6	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>p</i> + <i>q</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
7	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	—	<i>n</i>	<i>n</i>
8	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	—	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
9	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
10	<i>n</i>	2 <i>n</i>	del <i>p</i> ter	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
11	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	2 <i>n</i>
12	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i> + ( <i>p</i> + <i>q</i> )	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	—	<i>n</i>						
13	<i>n</i>	2 <i>n</i>	br <i>q</i> ter	<i>n</i> + del <i>q</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
14	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
15	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	—	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
16	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
17	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
18	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
19	2 <i>n</i>	4 <i>n</i>	2 <i>n</i> + del <i>q</i> ter	<i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i> + trZ3ter	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
20	<i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
21	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
22	2 <i>n</i>	3 <i>n</i> + del <i>q</i>	br <i>q</i> ter	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
23	<i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
24	<i>n</i>	2 <i>n</i>	br <i>q</i> ter	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
25	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	3 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>
26	<i>n</i> + del <i>q</i> ter	3 <i>n</i> + trZ1 <i>q</i> ter	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i> + del <i>p</i> ter	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	<i>n</i>	—	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>	2 <i>n</i>

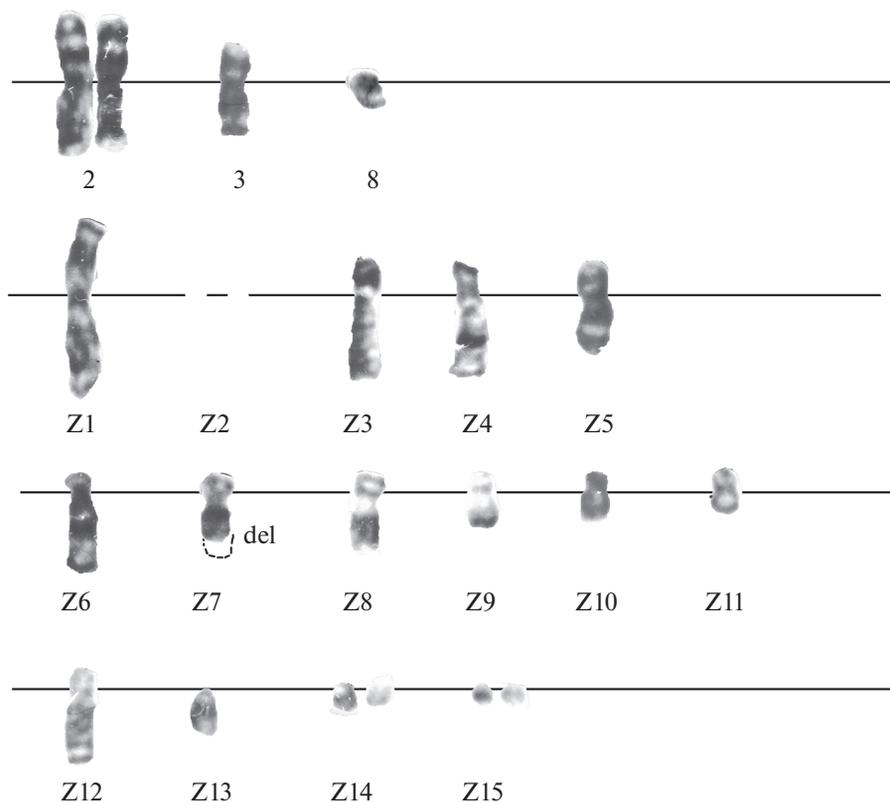
Обозначения: *n* — нормальная хромосома; 2*n* — две копии нормальной хромосомы; (—) — отсутствие хромосомы; del*p* — делеция *p*-плеча; del*q* — делеция *q*-плеча; *p* + *q* — прицентромерная поломка с сохранением материала; *n* + (*p* + *q*) — 1 нормальная копия и 1 копия с прицентромерной поломкой; del*q*ter — терминальная поломка в *q*-плече; del*p*ter — терминальная поломка в *p*-плече; *n* + del*q*ter — 1 нормальная копия плюс 1 копия с терминальной делецией *q*-плеча; tr — межхромосомная транслокация; br*q*ter — терминальная поломка в *q*-плече с сохранением материала.

ленных перестроек в проанализированной популяции встретилась однократно.

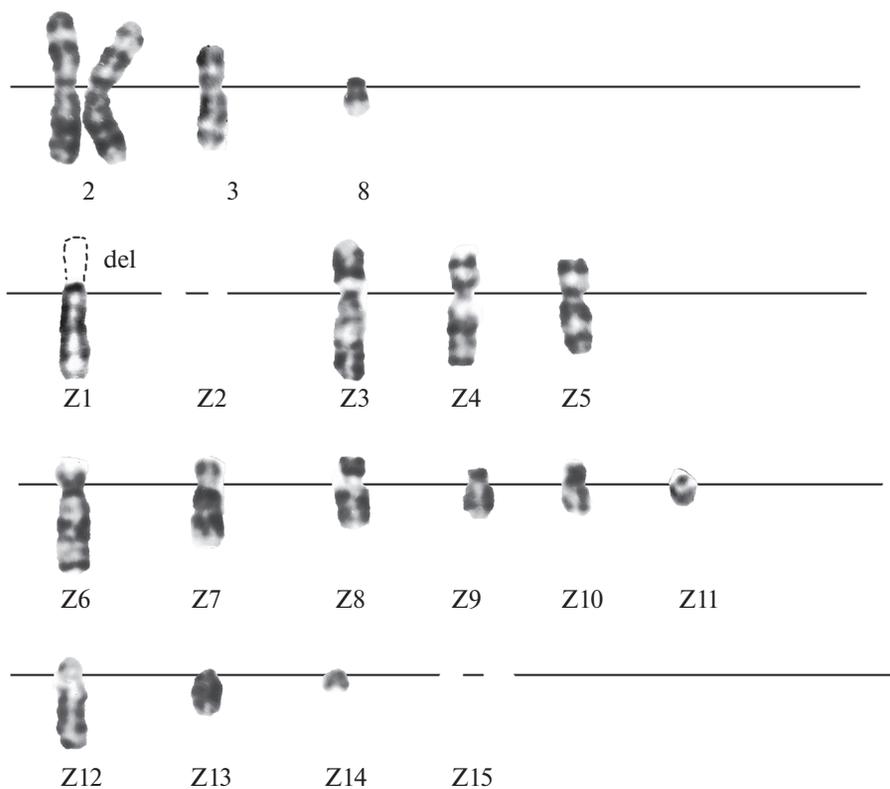
Кариотипический анализ клеток после второй заморозки (6 мес. в жидком азоте) также не выявил закономерных изменений в структуре кариотипа. В перестройки оказались вовлечены четыре хромосомы, а именно: хромосомы Z1, Z3, Z4 и Z8 (рис. 4, табл. 1). Выявленные изменения также были связаны с хромосомными поломками.

Вторая часть работы была связана с изучением кариотипической стабильности клеток после их длительного хранения в жидком азоте (120 мес. в жидком азоте). После длительного пребывания в жидком азоте спектр кариотипических изменений

расширился. Некоторые из них носили неслучайный характер. В поломки было вовлечено 5 хромосом набора — 2, Z1, Z3, Z4 и Z8. Z5 (рис. 5а). Поломки разной локализации в хромосоме Z3 присутствовали в 23% проанализированных клеток. Кроме структурных изменений, наблюдали изменения в числе хромосомных копий. Наряду со стандартным набором хромосом, в кариотипе присутствовали клетки с удвоенным числом копий отдельных хромосом набора и анеуплоидные клетки (табл. 1). Анеуплоидные клетки характеризовались повышенной структурной нестабильностью (поломки хромосом, межхромосомные транслокации, эктопическая конъюгация между негомолгичными хромо-



**Рис. 3.** Картиотип клеток CHL V-79 RJK после первой процедуры криозаморозки/разморозки с краткосрочным (3 мес.) хранением в жидком азоте. Терминальная делеция *q*-плеча хромосомы Z7 и отсутствие хромосомы Z2. N = 20.



**Рис. 4.** Картиотип клеток CHL V-79 RJK после второй процедуры криозаморозки/разморозки с краткосрочным (6 мес.) хранением в жидком азоте. Делеция короткого (*p*) плеча хромосомы Z1, отсутствие хромосом Z2, Z15. N = 17.

сомами, разная степень конденсации гомологов) (рис. 5б). В пределах кариотипического набора в перестройки могли быть вовлечены несколько хромосом набора.

Обобщая полученные данные, можно говорить о том, что многолетнетняя криоконсервация, в отличие от краткосрочной, привела к разнотипной дестабилизации структуры кариотипа.

## ОБСУЖДЕНИЕ

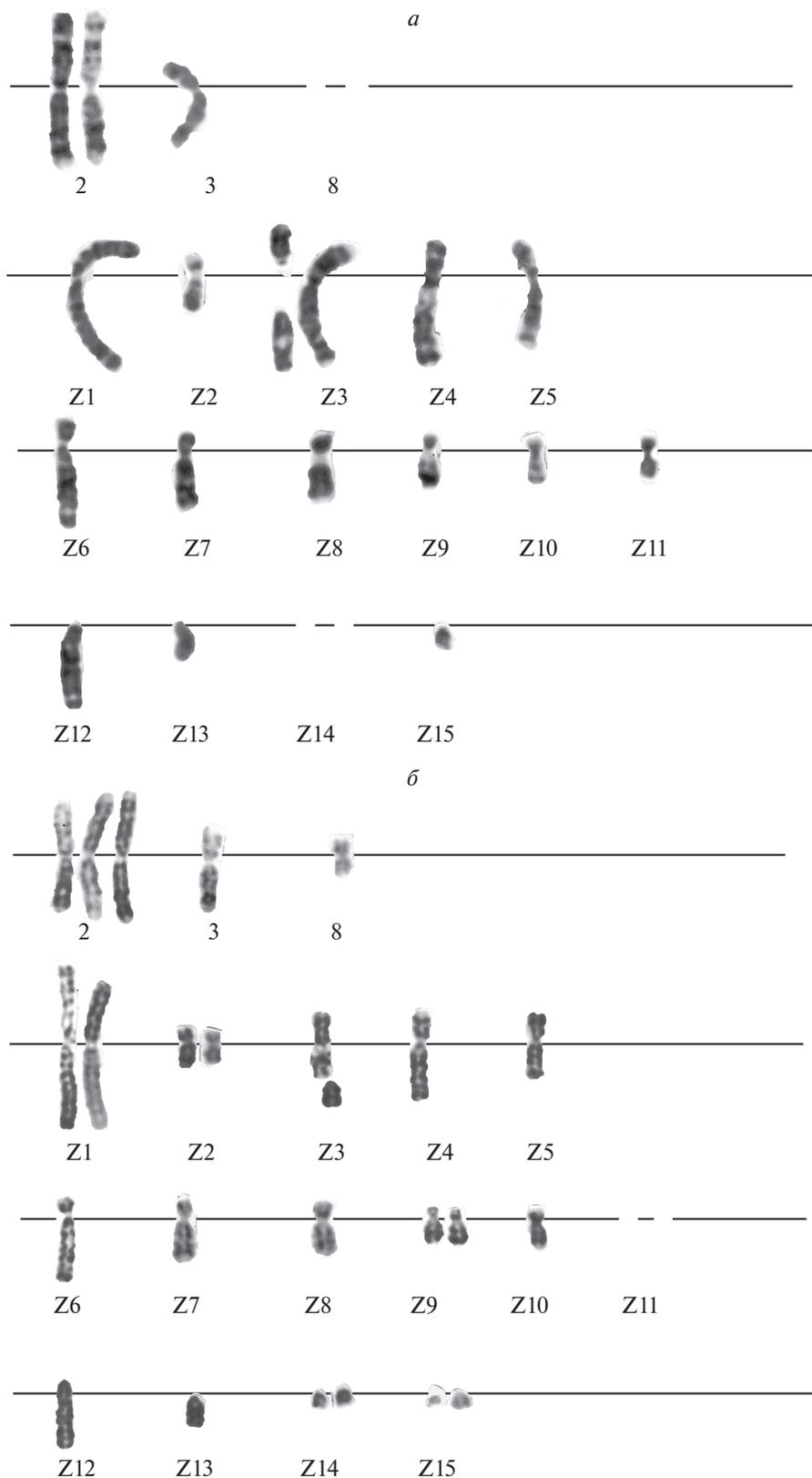
Результаты настоящей работы, направленной на изучение влияния криоконсервации на клеточный геном показали, что использованные в качестве модельной системы трансформированные клетки CHL V-79 RJК при относительно непродолжительном хранении в жидком азоте (3 и 6 мес.) сохраняли стабильный кариотип. Выявляемые изменения носили случайный характер. Длительное (10 лет) пребывание клеток в условиях криозаморозки привело к их анеуполиплоидизации, увеличению пула хромосом, вовлекаемых в перестройки, к усилению частоты встречаемости поломок в одной из хромосом набора (хромосома Z3), появлению таких изменений, как нарушение конденсации хромосом и хромосомные слипания (эктопическая конъюгация). Неоднократное выявление в определенной хромосоме набора (Z3) поломки разной локализации, позволило оценить повышенную ломкость данной хромосомы как неслучайную, вызванную длительным пребыванием клеток в условиях сверхнизкой температуры. В популяциях, претерпевших кратковременные криозаморозки, данная перестройка в силу своей уникальности рассматривалась как случайная. Полученные данные подтвердили постулат Хенга с соавторами о важности случайных хромосомных перестроек в трансформации генома, так как при определенных условиях они могут стать закономерными (Heng et al., 2013). На примере раковых клеток Хенг с соавторами показали, что клетки, встав на путь кариотипической нестабильности, проходят две стадии. Первая стадия – неклональная, связана с накоплением в популяции случайных кариотипических изменений, которые могут быть в любой момент нивелированы. Вторая стадия – клональная, когда определенные aberrации приобретают преимущество и клетки характеризуются модифицированным кариотипом. В нашем случае мы столкнулись с изменениями, вызванными повышенной генетической нестабильностью определенной хромосомы кариотипического набора. Важно, что возникшая нестабильность была сопряжена с длительным экзогенным воздействием фактора пониженной температуры. Возможно, в дальнейшем aberrантность хромосомы Z3 может приобрести селективное преимущество уже клоногенного характера. Полученные в настоящей работе данные, являются примером того, что в результате многолетнего пребывания клеток CHL V-79 RJК в условиях глубокой заморозки они перешли из одно-

го генетического статуса в другой – культура из относительно генетически стабильной превратилась в нестабильную. Известно, что возникшая кариотипическая нестабильность может повлечь за собой последующую нестабильность, проявляющуюся у потомков. Прогнозируя дальнейшую судьбу проанализированных в настоящей работе клеток, можно предположить, что случайные изменения в других хромосомах набора (2, Z1, Z4, Z7 и Z8) со временем могут также перейти в разряд неслучайных, если не будут нивелированы отбором.

Другим важным элементом дестабилизации клеточного генома клеток CHL V-79 RJК, выявленным нами после многолетней криозаморозки является возникновение нарушений, связанных с увеличением числа копий (либо с утратой хромосомы из кариотипического набора) отдельных хромосом набора и/или появлением анеуполиплоидных вариантов. Считается, что это связано с нарушением механизма клеточного деления, вызванным разрушением микротрубочек веретена деления. На настоящий момент сбой в программе клеточного деления рассматривается как один из механизмов дестабилизации клеточного генома, направленный на переход клеток из нормального состояния в злокачественное (Zhu et al., 2012; Passerini et al., 2016). Мак-Гранохан с соавторами (McGranahan et al., 2012) на клетках человека показали, что присутствие в кариотипе даже одной дополнительной хромосомной копии вызывает нестабильность генома, нарушая репликацию ДНК. Динамика непрерывных последовательных изменений в структуре генома, нарастающих во времени как “снежный ком” может приводить к существенной реорганизации клеточного генома, обозначаемой как кариотипический хаос. К числу признаков “кариотипического хаоса”, наряду с хромосомными/хроматидными разрывами относят разную степень конденсации хромосом и межхромосомные слипания (Rangel et al., 2017). Именно эти нарушения мы наблюдали в клетках CHL V-79 RJК, претерпевших многолетнюю криозаморозку. Полученные данные говорят об усилении степени трансформации проанализированных в настоящей работе клеток.

Обобщая полученные данные в совокупности с литературными, можно говорить о том, что реакция клеточного генома на глубокую заморозку в зависимости от ее продолжительности во времени далеко не однозначна. Временной интервал пребывания клеток в жидком азоте является определяющим в сохранении генетического статуса клеток. Скорее всего, для каждой клеточной линии он индивидуален. Полученные в настоящей работе данные позволяют говорить о том, что многолетнее пребывание клеток в условиях глубокой заморозки может повлечь за собой дестабилизацию клеточного генома.

Таким образом, результаты настоящей работы позволяют сделать вывод, что использование в клинических, биоинженерных и прочих прикладных



**Рис. 5.** Картиотип клеток NHL V-79 RJK после длительной (10 лет) криозаморозки. *а* – Две копии хромосомы Z3 (в одной из копий – прицентромерная поломка с сохранением *p* и *q*), отсутствие хромосом 8 и Z14. N = 18. *б* – Дополнительные копии хромосом 2, Z1, Z2, Z9, Z14, Z15; поломка в терминальной части *q*-плеча с сохранением хромосомного материала в Z3, терминальная делеция в одной из копий Z2; разная конденсация гомологов хромосом 2 и Z1; отсутствие хромосомы Z11. N = 24.

целях клеточного материала, претерпевшего длительную криозаморозку требует тщательной предварительной отработки всех процедур, связанных с данным методом, а также системного физиологического, цитогенетического и молекулярного контроля клеток до и после заморозки, что позволит минимизировать возможные генетические риски в связи с их практическим использованием.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность коллеге И.В. Арцыбашевой (ИНЦ РАН), активному участнику этой многолетней работы, безвременно ушедшей из жизни.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00108).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Семенова Е.Г. 1988. Внеплановый синтез ДНК в культивируемых клетках после криоконсервации. Криобиология. № 1. С. 17. (Semanova E.G. 1988. Unscheduled DNA synthesis in cultured cells after cryoconservation. Cryobiology. № 1. P. 17.)
- Полянская Г.Г., Семенова Е.Г., Шубин Н.А. 1990. Влияние криоконсервации на цитогенетические характеристики клеточной сублинии фибробластов кожи индийского мунджука. Цитология. Т. 32. № 3. С. 256. (Polyanskaya G.G., Semenova E.G., Shubin N.A. 1990. Cytological variations in the Indian muntjac skin fibroblast cell line as a result of cryoconservation. Tsytologiya. V. 32. No 3. P. 256.)
- de Lima Prata K., de Santis G.C., Orellana M.D., Palma P.V., Brassesco M.S., Covas D.T. 2012. Cryopreservation of umbilical cord mesenchymal cells in xenofree conditions. Cytotherapy. V. 14. P. 694.
- Diaferia G.R., Dessi S.S., Deblasio P., Biunno I. 2008. Is stem cell chromosomes stability affected by cryopreservation conditions? Cytotechnology. V. 58. P. 11.
- Duarte D.M., Cornélio D.A., Corado C., Medeiros V.K., de Araujo L.A., Cavalvanti G.B.J., de Medeiros S.R. 2012. Chromosomal characterization of cryopreserved mesenchymal stem cells from the human subendothelium umbilical cord vein. Regen. Med. V. 7. P. 147.
- He X. 2011. Thermostability of biological systems: fundamentals, challenges, and quantification. Open Biomed. Eng. J. V. 5. P. 47.
- Heng B.C., Kuleshova L.L., Bested S.M., Liu H., Cao T. 2005. The cryopreservation of human embryonic stem cells. Biotechnol. Appl. Biochem. V. 41. P. 97.
- Heng H.H., Liu G., Stevens J.B., Abdallah B.Y., Horne S.D., Ye K.J., Bremer S.W., Chowdhury S.K., Ye C.J. 2013. Karyotype heterogeneity and unclassified chromosomal abnormalities. Cytogenet. Genome Res. V. 139. P. 144.
- Imaizumi K., Nishishita N., Muramatsu M., Yamamoto T., Takenaka C., Kawamata S., Kobayashi K., Nishikawa S., Akuta T. 2014. A simple and highly effective method for slow-freezing human pluripotent stem cells using dimethyl sulfoxide, hydroxyethyl starch and ethylene glycol. PLoS One. V. 9.e88696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088696>
- Ji L., de Pablo J.J., Palecek S.P. 2004. Cryopreservation of adherent human embryonic stem cells. Biotechnol. Bioeng. V. 88. P. 299.
- McGranahan N., Burrell R.A., Endesfelder D., Novelli M.R., Swanton C. 2012. Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges. EMBO Rep. V. 13. P. 528.
- Passerini V., Ozeri-Galai E., de Pagter M.S., Donnelly N., Schmalbrock S., Kloosterman W.P., Kerem B., Storchová Z. 2016. The presence of extra chromosomes leads to genomic instability. Nat. Commun. V. 7. 10754. <https://doi.org/10.1038/ncomms10754>
- Pera M.F., Reubinoff B., Trounson A. 2000. Human embryonic stem cells. J. Cell Sci. V. 113. P. 5.
- Polchow B., Kebbel K., Schmiedeknecht G., Reichardt A., Henrich W., Hetzer R., Lueders C. 2012. Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks. J. Transl. Med. V. 10. P. 98.
- Rangel N., Forero-Castro M., Rondón-Lagos M. 2017. New insights in the cytogenetic practice: Karyotypic chaos, non-clonal chromosomal alterations and chromosomal instability in human cancer and therapy. Genes (Basel). V. 8. P. 155.
- Ray M., Mohandas T. 1975. Proposed banding nomenclature for the Chinese hamster chromosomes (*Cricetulus griseus*). Cytogenet. Cell Genet. V. 16. P. 83.
- Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C.Y., Trounson A., Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. Nat. Biotechnol. V. 18. P. 399.
- Tan Z., Chan Y.J.A., Chua Y.J.K., Rutledge S.D., Pavelka N., Cimini D., Rancati G. 2019. Environmental stresses induce karyotypic instability in colorectal cancer cells. Mol. Biol. Cell. V. 30. P. 42.
- Tang D.Q., Wang Q., Burkhardt B.R., Litherland S.A., Atkinson M.A., Yang L.J. 2012. *In vitro* generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation. Am. J. Stem Cells. V. 1. P. 114.
- Wang B., Zhang Z., Yin Z., Feng C., Wang Q. 2012. Novel and potential application of cryopreservation to plant genetic transformation. Biotechn. Adv. V. 30. P. 604.
- Zhang X.H., Catalano P.N., Gurkan U.A., Khimji I., Demirci U. 2011. Emerging technologies in medical applications of minimum volume vitrification. Nanomedicine. V. 6. P. 1115. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.71>
- Zhu J., Pavelka N., Bradford W.D., Rancati G., Li R. 2012. Karyotypic determinants of chromosome instability in aneuploid budding yeast. PLoS Genet. V. 8. T. 5. P.e1002719. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002719>

## The Influence of Cryopreservation on the Karyotype Stability of Transformed Chinese Hamster Lung Fibroblasts *in vitro*

T. M. Grinchuk<sup>a, \*</sup> and M. A. Shilina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: grintat@bk.ru*

The influence of cryoconservation on the genomic stability of cells with different genotypic status is poorly understood. Here, we present the results of studying the effect of cryoconservation of different duration periods on the karyotype stability of Chinese hamster fibroblasts CHL V-79 RJK, which is characterized by high karyotypic stability when cultured under standard conditions. It was found that the genomic reaction of CHL V-79 RJK cells depends on the duration of cryoconservation. After prolonged storage (within 10 years) in liquid nitrogen at  $-196^{\circ}\text{C}$ , in contrast to short-term cryoconservation (within 3–6 months), the cells tend to destabilize the karyotype structure, namely to aneuploidization, an increase in the pool of chromosomes involved in rearrangements, disordered condensation of individual chromosomes and excessive conglutination of non-homologous chromosomes (ectopic conjugation). These findings suggest that long-term exposure of cells to deep freezing conditions can disrupt the mechanism of cell division, resulting in the destabilization of the cell genome.

**Keywords:** karyotype, chromosomes, cryopreservation, genome instability

УДК 612:576.6

## ПРИМЕНЕНИЕ ЛАЗЕРНОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ

© 2021 г. А. В. Дерюгина<sup>1</sup>, М. Н. Иващенко<sup>2, \*</sup>, А. А. Белов<sup>2</sup>, П. С. Игнатьев<sup>3</sup>, В. Б. Метелин<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950 Россия

<sup>2</sup>Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия, Нижний Новгород, 603107 Россия

<sup>3</sup>Производственное объединение “Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова”, Екатеринбург, 620100 Россия

<sup>4</sup>Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, 129110 Россия

\*E-mail: kafedra2577@mail.ru

Поступила в редакцию 24.07.2020 г.

После доработки 11.10.2020 г.

Принята к публикации 12.10.2020 г.

Проведена оценка потенциальных возможностей лазерной интерференционной микроскопии при неинвазивном исследовании динамики показателей морфофункционального состояния эритроцитов периферической крови, подвергнутых в условиях *in vitro* воздействию адреналина ( $10^{-9}$  г/мл), кортизола ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл), бета-адреноблокатора пропранолола ( $10^{-9}$  г/мл) и глутарового альдегида (0.1%). Параллельно в эритроцитах определяли концентрацию малонового диальдегида, аденозинтрифосфорной кислоты и 2,3-дифосфоглицерата. Полученные результаты продемонстрировали зависимость оптико-геометрических характеристик эритроцитов от особенностей их структурно-функциональной организации. Усиление метаболической активности клеток на фоне снижения окислительного потенциала при воздействии на эритроциты кортизола и пропранолола сопровождалось уменьшением фазовой высоты эритроцитов на 18 и 29% ( $p < 0.05$ ) и уменьшением фазового диаметра на 3 и 5% соответственно ( $p < 0.05$ ). Снижение метаболической активности на фоне усиления окислительного стресса при воздействии на красные клетки крови адреналина и глутарового альдегида вызывало увеличение либо фазовой высоты, либо фазового диаметра клеток. Полученные результаты демонстрируют, что лазерная интерференционная микроскопия позволяет в режиме реального времени проводить метаболическую оценку состояния живых эритроцитов, что повышает информативность и объективизирует данные о морфологических особенностях и функциональных возможностях клеток.

**Ключевые слова:** лазерная интерференционная микроскопия, эритроциты, фазовый диаметр, фазовая высота, функциональная активность

**DOI:** 10.31857/S004137712101003X

Лазерная интерференционная микроскопия считается высокоинформативным методом неинвазивного исследования состояния биологических объектов. Высокое пространственное разрешение, количественный характер получаемой информации и отсутствие необходимости применения дорогостоящих красителей позволяют использовать этот метод в качестве универсального инструмента для исследования структурно-функциональных особенностей живой клетки (Popescu, Park, 2015; Vasilenko et al., 2015).

Показано, что при измерениях с помощью лазерного интерференционного микроскопа оптически однородных, хорошо отражающих свет объектов,

достигается разрешение порядка 0.1 нм по вертикали и 15–100 нм – в плоскости объекта, что значительно превышает классический предел световых микроскопов (Tychinsky, Tikhonov, 2010). Кроме того, важное преимущество интерференционной микроскопии заключается в том, что регистрируемая величина оптической разности хода лучей в интерферометре позволяет получать количественную информацию об объемном распределении показателя преломления объекта, отражающего не только его морфологические особенности, но и функциональное состояние (Jiang, Yin, 2016; Cherkezzyan et al., 2017).

Однако отсутствие эффективного и универсального подхода к интерпретации результатов измерения физических параметров света, рассеянного объектом, приводит к недопустимому сужению круга

**Принятые сокращения:** 2,3-ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат; МДА – малоновый диальдегид; АТФ – аденозинтрифосфорная кислота; ТХУ – трихлоруксусная кислота.

исследуемых объектов и числа анализируемых параметров (Болотова и др., 2017; Василенко и др., 2018).

Изучение динамики морфологической структуры и функционального состояния эритроцитов всегда вызывало повышенный интерес, обусловленный участием этих клеток в разнообразных процессах поддержания гомеостаза всего организма. Поэтому получение новых данных об изменении поверхностной архитектоники, размеров, конфигурации и конформационной перестройки внутриклеточного гемоглобина может иметь фундаментальное и практическое значение для диагностики состояния нормы и патологии в медицине и биологии (Воробьева и др., 2018; Farag, Alagawany, 2018; Дерюгина и др., 2019).

В связи с этим цель нашего исследования – выявления возможностей лазерной интерференционной микроскопии для получения новой количественной информации о метаболических процессах в эритроцитах, подвергнутых в условиях *in vitro* направленному воздействию различных модифицирующих агентов.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследовали 30 образцов венозной крови практически здоровых доноров-добровольцев – лиц обо-го пола в возрасте от 21 до 49 лет. Кровь отбирали из кубитальной вены в вакуумные пробирки, содержащие гепарин (20–50 Ед. на 1 мл крови).

Микроскопию эритроцитов проводили на лазерном интерференционном микроскопе МИМ-340 (Россия, Екатеринбург), использовали лазер с длиной волны 650 нм и объектив с увеличением 30×. Для захвата изображений применяли видеокамеру VS-415U (НПК Videoscan, Россия) с разрешением 782 × 582 пикселей.

Основной аппаратно-программного комплекса МИМ-340 служит классическая схема интерферометра Линника, которая подразумевает разделение одного плоскопараллельного пучка когерентного источника света на два идентичных. Первый проходит через объект исследования, второй является опорным и движется по другому оптическому пути. После объединения двух лучей формируется интерференционная картина, которая фиксируется на матрице видеокамеры. Фаза световых волн, прошедших через исследуемую клетку, меняется от интегральных характеристик клеточного вещества, таких как химический состав, концентрация и конформационное состояние молекул. Это отражается в распределении фазовой толщины, закодированной в цифровом виде в топограмме, которая является проекцией суммарного вклада клеточного вещества в сдвиг фазы световой волны, проходящей через каждый участок препарата, соответствующий одному пикселю. В топограммах клеток анализировали значения фазовой толщины  $\Delta h$  и диаметра эритроцита  $D$ , как представлено на рис. 1.

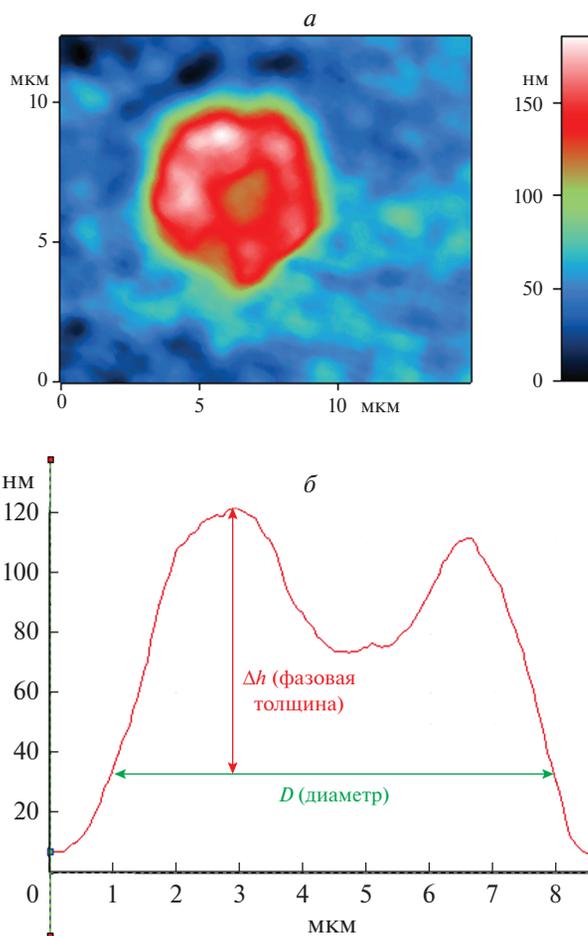


Рис. 1. Фазовое изображение (топограмма) (а) и профиль фазовой толщины (б) нормального эритроцита (дискоцита).

Для объективной оценки метода получали изображение 10 участков с монослойным расположением клеток и рассчитывали морфометрические показатели, используя не менее 100 эритроцитов каждого образца.

В условиях *in vitro* эритроциты инкубировали с соединениями, меняющими их метаболический потенциал: с адреналином ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл, серия 1) и кортизолом ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл, серия 2) – основными стресс-реализующими гормонами; глутаровым альдегидом (0.1%-ный раствор, серия 3) – фиксатором белковых структур мембран эритроцитов и пропранололом ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл, серия 4) – неселективным адреноблокатором  $\beta$ -адренорецепторов. Время воздействия препаратов составило 30 мин, за исключением адреналина (15 мин). В каждой серии было по 12 проб.

Функциональные показатели красных клеток крови определяли по содержанию малонового диальдегида (МДА), аденозинтрифосфорной кислоты

**Таблица 1.** Действие разных агентов *in vitro* на оптико-геометрические показатели эритроцитов

Агент	Фазовый диаметр эритроцитов, мкм ( $M \pm m$ )	Фазовая высота эритроцитов, нм ( $M \pm m$ )
– (Контроль)	4.75 ± 0.03	256.8 ± 4.66
Адреналин	4.68 ± 0.03 <sup>a</sup>	265.0 ± 4.62 <sup>a</sup>
Глутаровый альдегид	5.12 ± 0.06 <sup>a</sup>	207.9 ± 2.87 <sup>a</sup>
Пропранолол	4.51 ± 0.05 <sup>a</sup>	182.8 ± 2.76 <sup>a</sup>
Кортизол	4.63 ± 0.03 <sup>a</sup>	211.3 ± 6.09 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Отличия от контрольных значений достоверны при  $p < 0.05$  ( $t$ -критерий Стьюдента).

(АТФ) и 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) в эритроцитах.

Концентрацию МДА определяли с помощью реакции с тиобарбитуровой кислотой по образованию окрашенного триметинового комплекса с максимумом поглощения при 532 нм (Крылов и др., 2015). Для расчета концентрации использовали коэффициент молярной экстинкции:  $E = 1.56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Содержание главных фосфоорганических соединений 2,3-ДФГ и АТФ эритроцитов исследовали неэнзиматическим методом, определяя неорганический фосфор (Фн) в гидролизатах эритроцитов фотоэлектроколориметрически. Отмытые эритроциты (1 мл) гемолизировали холодной дистиллированной водой (2 мл) в течение 20 мин, белки осаждали 12% трихлоруксусной кислотой (ТХУ) (2 объема), а осадок отделяли центрифугированием при 3000 об./мин в течение 15 мин с последующим фильтрованием надосадочной жидкости через бумажный фильтр. ТХУ фильтрат гемолизированных эритроцитов использовали для определения АТФ и 2,3-ДФГ. При определении АТФ к 1 мл ТХУ фильтрата добавили 1 мл 2 н HCl и проводили гидролиз в кипящей водяной бане 7 мин с последующим охлаждением и нейтрализацией равным объемом 2 н NaOH. Определяли Фн, в состав которого входил Фн, отщепившийся от АТФ после гидролиза, и Фн до гидролиза. Для определения 2,3-ДФГ из ТХУ фильтрата гемолизированных эритроцитов удаляли нуклеотиды (АТФ, АДФ, АМФ) путем адсорбции на активированном угле с последующим центрифугированием. В супернатанте (0.5 мл) определяли Фн-1 (пробирка 1). Часть ТХУ фильтрата (0.5 мл) подвергали озолению, добавляя 0.5 мл 5% раствора нитрата магния, кипятили и после охлаждения содержимое пробирки растворяли в 0.5 мл 0.36 М  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ . В 0.5 мл супернатанта измеряли Фн-2 (пробирка 2). Определяли Фн в каждой пробирке, регистрируя плотность окраски на фотометре фотоэлектрическом КФК-3 (длина волны 660 нм). Концентрацию Фн определяли по калибровочной кривой, используя стандартный раствор  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ . Расчет концентрации 2,3-ДФГ проводили по фор-

муле  $(\text{Фн}-1 \times 100 - \text{Фн} \times 10)/2$ . (Виноградова и др., 1980; Бояринов и др., 2016).

Данные, полученные в ходе исследования, были статистически обработаны с расчетом средней величины и ошибки средней. Достоверность различий оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента при уровне значимости  $p < 0.05$ . Статистический анализ полученных результатов выполняли с использованием программы Microsoft Excel и пакета прикладных программ Statistika версия 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках настоящего исследования проведены измерения интегрального показателя преломления эритроцитов, подвергнутых направленному воздействию модифицирующих агентов.

Анализ оптико-геометрических параметров показал, что фазовая высота эритроцитов, инкубированных с кортизолом ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл), пропранололом ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) и глутаровым альдегидом (0.1%) снижалась относительно контроля на 18, 29 и 19% соответственно ( $p < 0.05$ ). В то же время после инкубации с адреналином ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) наблюдали рост фазовой высоты эритроцитов на 3% ( $p < 0.05$ ).

Фазовый диаметр эритроцитов относительно значений контрольной группы увеличивался после инкубации клеток с глутаровым альдегидом (0.1%) на 8% ( $p < 0.05$ ), а после действия кортизола ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл), адреналина ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) или пропранолола ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл), напротив, снижался на 3, 2 и 5% соответственно ( $p < 0.05$ ) (табл. 1).

При оценке показателей метаболизма эритроцитов установлено, что после воздействия модифицирующих агентов концентрация маркерного субстрата кислородного обеспечения – 2,3-ДФГ – во всех случаях значительно снижалась.

Влияние используемых соединений на энергетический потенциал красных клеток крови было подтверждено изменением содержания АТФ под их воздействием. Выявлено статистически значимое повышение содержания АТФ в эритроцитах после их инкубации с кортизолом ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл) на 9%, пропранололом ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) на 5% и статистически значимое снижение – под воздействием адреналина ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) на 35% и глутарового альдегида (0.1%) на 8%.

Концентрация МДА в эритроцитах, характеризующего интенсивность перекисного окисления липидов, значимо снижалась на 45% при действии кортизола ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл), на 47% при действии пропранолола ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) и увеличивалась при действии адреналина ( $1 \times 10^{-9}$  г/мл) и глутарового альдегида (0.1%) на 27 и 17% соответственно (табл. 2).

Можно предположить, что усиление метаболической активности клеток на фоне снижения окислительного потенциала при воздействии на эритроци-

**Таблица 2.** Концентрация 2,3-ДФГ, АТФ и МДА в эритроцитах с модификацией структуры

Агент	2,3-ДФГ, мкмоль/л	АТФ, мкмоль/л	МДА, нмоль/мл
– (Контроль)	3.28 ± 0.55	1.82 ± 0.33	0.90 ± 0.06
Кортизол	2.11 ± 0.35 <sup>a</sup>	1.99 ± 0.27 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.10 <sup>a</sup>
Адреналин	2.38 ± 0.26 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.08 <sup>a</sup>
Пропранолол	2.30 ± 0.34 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.44 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.10 <sup>a</sup>
Глутаровый альдегид	2.49 ± 0.53 <sup>a</sup>	1.67 ± 0.40 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.08 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Отличия от контрольных значений достоверны при  $p < 0.05$  ( $t$ -критерий Стьюдента).

ты стрессового гормона кортизола и неселективного адrenoблокатора β-адренорецепторов пропранолола обеспечивает мембраностабилизирующий эффект, фосфорилирование интегральных и периферических белков эритроцитарной мембраны, вызывающих изменение морфологии эритроцитов, которое, вероятно, направлено на повышение эффективности прохождения эритроцитами микрокапилляров и улучшение реологии крови (Takakuwa, 2000; Nunomura et al., 2006).

Снижение метаболической активности на фоне усиления окислительного стресса при воздействии на красные клетки крови стресс-гормона адреналина и глутарового альдегида вызывает увеличение либо фазовой высоты, либо фазового диаметра, что ухудшает пластичность эритроцитов и их прохождение через микрокапилляры.

По нашему мнению, увеличение фазовой высоты эритроцитов при действии адреналина может быть следствием окислительного стресса, развивающегося на фоне метаболического истощения клеток. Снижение содержания АТФ в эритроцитах ведет к ряду нарушений, в частности, к блокированию работы ионных насосов, изменению ионного баланса и снижению способности клеток к деформации (Zarkovic et al., 2013).

Увеличение фазового диаметра эритроцитов после действия глутарового альдегида может объясняться его влиянием на подмембранный цитоскелет клеток. При этом увеличение уровня МДА в эритроцитах способствует образованию сшивок между фосфолипидами и белками мембраны, что приводит к изменению ионной проницаемости мембран, снижению активности гликолиза (Bura, Cimen, 2008) и как следствие к изменению оптико-геометрических показателей эритроцитов.

Из полученных результатов следует вывод о зависимости фазово-интерференционных изображений эритроцитов от функционального состояния клеток. Применение лазерной интерференционной микроскопии позволяет исследовать метаболическое состояние эритроцитов, что дает возможность анализировать физиологический статус клеток и раскры-

вает широкие возможности использования этого метода в медицине. Метод может оказаться эффективным при определении состояния нормы или патологии, а также для оценки адекватности лечебной коррекции выявленных нарушений. Получение с помощью лазерной интерференционной микроскопии качественно новой информации, недоступной при традиционных подходах, будет способствовать пониманию некоторых вопросов, касающихся структуры и функции эритроцитов, закономерностей поведения клетки в условиях нормального функционирования, их возможных нарушений при различных патологических состояниях, а также при направленном воздействии физическими, химическими или биологическими факторами.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты выполнены в соответствии с требованиями этического комитета Института биологии и биомедицины Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Все доноры были предупреждены о характере и целях использования крови, получено необходимое согласие.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-316-90066).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты выполнены в соответствии с требованиями этического комитета Института биологии и биомедицины Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Все доноры были предупреждены о характере и целях использования крови, получено необходимое согласие.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Болотова А.А., Звержховский В.Д., Вышенская Т.В., Кретушев А.В., Евдокимов А.А. 2017. Информативность фазовых изображений биологических клеток. В кн.: Информатика и технологии. Инновационные технологии в промышленности и информатике (“МНТК ФТИ-2017”). М.: МИРЭА. № 23. С. 616. (Bolotova A.A., Zverzhkhovskij V.D., Vyshenskaya T.V., Kretushev A.V., Evdokimov A.A. 2017. Information content of phase images of biological cells. In: Computer science and technology. Innovative technologies in industry and informatics (“ISTC

- FTI-2017"). Collection of proceedings. M.: MIREA. № 23. P. 616.)
- Бояринов Г.А., Дерюгина А.В., Яковлева Е.И., Зайцев Р.Р., Шуилова А.В., Бугрова М.Л., Бояринова Л.В., Филиппенко Е.С., Соловьева О.Д. 2016. Фармакологическая коррекция микроциркуляции крыс, перенесших черепно-мозговую травму. Цитология. Т. 58. № 8. С. 610. (Boyarinov G.A., Deryugina A.V., Yakovleva E.I., Zajcev R.R., SHumilova A.V., Bugrova M.L., Boyarinova L.V., Filippenko E.S., Solov'eva O.D. 2016. Pharmacological correction of microcirculation in rats with traumatic brain injury. Tsitologiya. V. 58. № 8. P. 610.)
- Василенко И.А., Метелин В.Б., Игнатьев П.С., Кардашова З.З., Лифенко Р.А. 2018. Диалог с клеткой: диагностическая real-time технология на основе лазерной интерферометрии. Альманах клинической медицины. Т. 46. № 8. С. 748. (Vasilenko I.A., Metelin V.B., Ignat'ev P.S., Kardashova Z.Z., Lifenko R.A. 2018. Dialogue with the cell: real-time diagnostic technology based on laser interferometry. Almanac Clin. Med. V. 46. № 8. P. 748.)
- Виноградова И.Л., Багрянцева С.Ю., Дервиз Г.В. 1980. Метод одновременного определения 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах. Лабораторное дело. № 7. С. 424. (Vinoogradova I.L., Bagryanceva S.YU., Derviz G.V. 1980. Method for simultaneous determination of 2,3-DPH and ATP in red blood cells. Laboratornoe Delo. № 7. P. 424.)
- Воробьева Н.В., Котова О.В., Уколова Г.Б., Засецин В.И., Хабибулина Т.В., Бекетов И.Н. 2018. Физиологическая реакция микрореологических свойств эритроцитов у лиц второго зрелого возраста с низкой физической активностью на начало регулярных физических нагрузок. Вестник биомед. социол. Т. 3. № 2. С. 100. (Vorob'eva N.V., Kotova O.V., Ukolova G.B., Zasepin V.I., Habibulina T.V., Beketov I.N. 2018. Physiological response of microrheological properties of red blood cells in second-age adults with low physical activity at the beginning of regular physical activity. Bulletin Biomed. Sociol. V. 3. № 2. P. 100.)
- Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатьев П.С., Лодяной М.С., Самоделкин А.Г. 2019. Изменение фазового портрета и электрофоретической подвижности эритроцитов при различных видах заболеваний. Современные технологии в медицине. Т. 11. № 2. С. 63. (Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignat'ev P.S., Lodyanoy M.S., Samodelkin A.G. 2019. Alterations in the phase portrait and electrophoretic mobility of erythrocytes in various diseases. Sovremennye Tehnologii v Medicine. V. 11. № 2. P. 63.)
- Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Плескова С.Н., Калинин В.А. 2015. Апоптозный характер гемолиза эритроцитов, индуцированный малыми дозами ионизирующей радиации. Биофизика. Т. 60. № 1. С. 102. (Krylov V.N., Deryugina A.V., Pleskova S.N., Kalinin V.A. 2015. The apoptotic nature of the hemolysis of erythrocytes induced by low doses of ionizing radiation. Biophysics. V. 60. № 1. P. 102.)
- Burak Cimen M.Y. 2008. Free radical metabolism in human erythrocytes. Clinica Chimica Acta. V. 390. P. 1.
- Farag M.R., Alagawany M. 2018. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. Chem. Biol. Interact. V. 279. P. 73.
- Jiang W., Yin Z. 2016. Seeing the invisible in differential interference contrast microscopy images. Med. Image Anal. V. 34. P. 65.
- Nunomura W., Takakuwa Y. 2006. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca<sup>2+</sup> and calmodulin. Front. Biosci. V. 11. P. 1522.
- Popescu G., Park Y. 2015. Quantitative phase imaging in biomedicine. J. Biomed. Opt. V. 20. P. 111201.
- Takakuwa Y. 2000. Protein 4.1. a multifunctional protein of the erythrocyte membrane skeleton: Structure and functions in erythrocytes and nonerythroid cells. Int. J. Hematol. V. 72. P. 298.
- Tychinsky V.P., Tikhonov A.N. 2010. Interference microscopy in cell biophysics. 1. Principles and methodological aspects of coherent phase microscopy. Cell Biochem. Biophys. V. 58. P. 107.
- Vasilenko I., Metelin V., Nasyrov M., Kuznetsov A., Sukhenko E., Belyakov V. 2015. Quantitative phase imaging of cellular and subcellular structures for non-invasive screening diagnostics of socially significant diseases. J. Biomed. Optics. V. 3. P. 231.
- Zarkovic N., Cipak A., Jaganjac M., Borovic S. 2013. Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. J. Proteomics. V. 92. P. 239.

## Assessing the Functional State of Red Blood Cells by Using the Laser Interference Microscopy

A. V. Deryugina<sup>1</sup>, M. N. Ivashchenko<sup>2,\*</sup>, A. A. Belov<sup>2</sup>, P. S. Ignatiev<sup>3</sup>, and V. B. Metelin<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Lobachevsky National Research State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

<sup>2</sup>Nizhny Novgorod State Agricultural Academy, Nizhny Novgorod, 603107 Russia

<sup>3</sup>Production Association "Yalamov Ural Optical and Mechanical Plant", Yekaterinburg, 620100 Russia

<sup>4</sup>Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, 129110 Russia

\*e-mail: kafedra2577@mail.ru

Estimation of possibilities of laser interference microscopy at noninvasive investigation of morphofunctional state dynamics of peripheral blood red blood cells exposed in vitro to adrenaline ( $10^{-9}$  g/ml), cortisol ( $5 \times 10^{-7}$  g/ml), propranolol beta-adrenoblocker ( $10^{-9}$  g/ml) and glutar aldehyde (0.1%) was performed. Concentrations of malonate dialdehyde, adenosine triphosphoric acid and 2,3-diphosphoglycerate were determined in red blood cells. Our results demonstrated that there is a dependence of erythrocytes' optical-geometric characteristics on peculiarities of their structural and functional organization. The intensification of cell's metabolic activity at decreasing in oxidative potential at the presence of cortisol and propranolol was accompanied by the decrease in erythrocyte phase height

by 18% and 29% ( $p < 0.05$ ) and decrease in phase diameter by 3 and 5%, respectively ( $p < 0.05$ ). Decrease in metabolic activity in red blood cells as a result of increased oxidative stress at the glutarous aldehyde action caused an increase in either phase height or phase diameter of the cells. The results show that laser interference microscopy allows estimation of metabolic activity in real time in living red blood cells. The latter leads to increase in data information regarding morphological features and functional capabilities of the cells.

**Keywords:** laser interference microscopy, red blood cells, phase diameter, phase height, functional activity

УДК 577.29

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ И ПРОГРАММНЫХ МЕТОДОВ 2D И 3D АНАЛИЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ АСТРОЦИТОВ

© 2021 г. О. И. Носова<sup>1</sup> \*, Д. А. Суфиева<sup>1</sup>, Д. Э. Коржевский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

\*E-mail: nosova@neuro.nnov.ru

Поступила в редакцию 10.09.2020 г.

После доработки 24.09.2020 г.

Принята к публикации 25.09.2020 г.

Цель работы состояла в изучении возможностей двухмерного и трехмерного количественного анализа структурно-функционального состояния астроцитов на примере изображений, полученных при двойной иммуноцитохимической реакции на астроцитарные маркеры GFAP и GLT-1, с применением свободно распространяемого программного обеспечения. Материалом для исследования служил мозг половозрелых самцов крыс линии Вистар ( $n = 5$ ). В работе продемонстрировано, что современные методы двухмерного и трехмерного анализа с помощью общедоступного программного обеспечения расширяют возможности получения качественной и количественной информации о структурно-функциональном состоянии таких сложноорганизованных объектов, как астроциты центральной нервной системы, а также обеспечивает уровень стандартизации данных, необходимый для сопоставления результатов исследований, полученных разными научными группами.

**Ключевые слова:** астроциты, ImageJ, иммуногистохимия, конфокальная лазерная микроскопия, количественный анализ, морфометрия

**DOI:** 10.31857/S0041377121010077

Функционирование головного мозга зависит от взаимодействия двух основных типов клеток: нейронов и клеток глии (Verkhatsky et al., 2014). Нарушение этого взаимодействия происходит при нейродегенеративных заболеваниях, таких как эпилепсия, болезнь Альцгеймера и других, следствием которых является снижение когнитивных функций, потеря памяти, психические расстройства (Hancock et al., 2014; Rodríguez-Arellano et al., 2016; Verkhatsky et al., 2016). В настоящее время в мировой литературной базе накапливается все больше данных о ключевой роли астроцитов в патогенезе этих заболеваний (Baber, Haghghat, 2010; Bernardinelli et al., 2014; Рекну, Рекна, 2014; Sukhorukova et al., 2015). Понимание механизмов вовлечения астроцитов в формирование и развитие массовой гибели нейронов может стать ключом к эффективной терапии нейродегенеративных заболеваний. В контексте этого становится актуальным применение современных подходов, позволяющих получать дополнительную информацию о структурно-функциональном состоянии астроцитов – важнейших клеток нейроглии.

В последние десятилетия наблюдается стремительное развитие методов флуоресцентной и конфокальной микроскопии (Ведяйкин и др., 2019; Jonkman et al., 2020). Методы, созданные на основе флуоресцентной микроскопии, стали незаменимыми в клеточных и молекулярно-биологических исследованиях. Эти подходы позволяют получать изображения с более высоким разрешением, чем традиционная световая микроскопия, что также открывает новые возможности для применения современных методов количественного анализа изображений. Кроме того, появляется все больше инструментов, позволяющих осуществлять объективную оценку изображений, основанную на количественных подходах не только в двухмерном пространстве (Costes et al., 2004; Bolte, Cordelieres, 2006; Lagache et al., 2015), но и в трехмерном (Zinchuk, Grossenbacher-Zinchuk, 2009; Adler, Parmryd, 2010; Zinchuk et al., 2013; Rizk et al., 2014; Heck et al., 2015; Kraus et al., 2017). Чтобы визуализировать, обрабатывать и анализировать эти типы данных, необходимо использовать соответствующее программное обеспечение. Существуют коммерческие пакеты, такие как Amira (Thermo Fisher Scientific, USA), Imaris (Bitplane, Switzerland), Velocity (PerkinElmer, UK) и др. Эти программы представляют собой дорогостоящее программное обеспе-

**Принятые сокращения:** GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок; GLT-1 – астроцитарные транспортеры глутамата.

чение, что является ограничивающим фактором для использования во многих цитологических лабораториях. Свободно распространяемым аналогом этих программ является пакет для анализа изображений ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>). Хотя первоначально ImageJ был разработан для целей двухмерного анализа морфологических данных, благодаря дополнительным плагинам он может использоваться в качестве мощного программного обеспечения и для трехмерного анализа изображений. Большая популярность ImageJ у исследователей и открытость используемых в этом программном обеспечении алгоритмов создает благоприятную возможность для широкого использования этой программы в качестве основного средства анализа изображений, получаемых с помощью конфокальной микроскопии в процессе исследования сложноорганизованных цитологических объектов, к которым можно отнести и астроциты головного мозга.

Целью данной работы стало изучение возможностей двухмерного и трехмерного количественного анализа структурно-функционального состояния астроцитов на примере изображений, полученных при двойной иммуноцитохимической реакции на астроцитарные маркеры GFAP и GLT-1 с применением свободно распространяемого программного обеспечения.

Выбор маркеров, анализируемых в рамках представленной работы, был обусловлен следующими причинами. Белок цитоскелета GFAP широко используется в качестве маркера для оценки морфологического состояния астроцитов как в норме, так и при патологических состояниях (Emsley, Macklis, 2006; Takahashi et al., 2010; Kulijewicz-Nawrot et al., 2013). GLT-1 – это глутаматный транспортер астроцитов, обеспечивающий захват глутамата из синаптической щели. Многочисленные исследования свидетельствуют о роли этих транспортеров в развитии и формировании нейродегенеративных заболеваний (Baber, Haghghat, 2010; Gibbons et al., 2013; Kulijewicz-Nawrot et al., 2013; Hubbard et al., 2016; Murphy-Royal et al., 2017). Мембранные транспортеры глутамата формируют кластеры, размеры и расположение которых могут варьировать в зависимости от функционального состояния астроцитов (Benediktsson et al., 2012; Murphy-Royal et al., 2015). Таким образом, были использованы маркеры, позволяющие произвести количественную оценку морфологических особенностей как мембранного, так и цитоплазматического белков.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Животные.** В качестве объекта исследования использовали интактных половозрелых самцов крыс линии Вистар в возрасте 4–6 мес. ( $n = 5$ ). При содержании и умерщвлении животных соблюдали международные правила Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными и “Правила прове-

дения работ с использованием экспериментальных животных” (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ “ИЭМ” (протокол № 3/18 от 22.11.2018).

**Гистологическое исследование.** Головной мозг был фиксирован в цинк-этанол-формальдегиде (Korzhevskii et al., 2015), обезвожен и залит в парафин обычным способом. Изготавливали фронтальные срезы толщиной 10 мкм. После стандартной процедуры депарафинирования срезы подвергали тепловому демаскированию в модифицированном цитратном буфере S1700 (Dako, Дания). Далее срезы инкубировали в смеси первичных антител к GFAP (моноклональные мышинные антитела, клон SPM507; Spring Bioscience, США) и глутаматным транспортерам GLT-1 (поликлональные кроличьи антитела, ab106289; Abcam, Великобритания). Для визуализации данных маркеров использовали следующие вторичные антитела: моновалентный Fab-фрагмент антикроличьего иммуноглобулина осли, конъюгированного с флуорохромом Rhodamine Red™-X (RRX) (Jackson ImmunoResearch, США) и моновалентный Fab-фрагмент антимышиного иммуноглобулина осли, конъюгированного с флуорохромом Cy-2 (Jackson ImmunoResearch, США). Полученные препараты заключали в водорастворимую среду Fluorescence Mounting Medium (Dako, Дания). Анализировали астроциты зоны *stratum radiatum* поля CA1. Препараты фотографировали с помощью конфокального лазерного микроскопа LSM 710 (Zeiss, Германия) с объективом alpha Plan-Apochromat 100×/1.46 Oil DIC M27, в режиме сканирования по оси z, параметры которого определялись согласно общепринятым методикам (Штейн, 2007). Для этого была использована управляющая программа Zen2011 Black (Zeiss, Германия). С каждого образца мозга животных было получено по 3 z-стека толщиной от 4 до 7 мкм, которые использовали для дальнейшего анализа.

**Анализ изображений.** Нормализацию изображений проводили в свободно распространяемой программе Intensify 3D (<https://github.com/nadavyayon/Intensify3D>) (Yayon et al., 2018). Для унификации полученных данных z-стеки обрезали до размеров 40×40×4 мкм по 13 оптических срезов. Далее осуществляли двухмерный анализ в ImageJ в плагине GDSC (<http://sites.imagej.net/GDSC/>) (Herbert et al., 2014), где использовали каждый 4-й срез в z-стеке. Для трехмерного анализа применяли плагины DiAna (<https://github.com/JeffGilles/DistanceAnalysis-DiAna>) и 3D Suite в ImageJ (Gilles et al., 2017). Трехмерную визуализацию изображений выполняли с помощью бесплатно распространяемого программного обеспечения Blender (<https://www.blender.org/>) (Cali et al., 2016).

**Статистический анализ.** Для расчета значений коэффициента Пирсона и Манделера использовали корреляционный поиск порога интенсивности

флюоресценции с уровнем значимости  $p < 0.05$ . Для трехмерного анализа рассчитывали объем колокализованных вокселей, объем и площади поверхности исследованных маркеров, объем и количество кластеров глутаматных транспортеров. Статистический анализ данных параметров осуществляли в программе Origin 2016 (<https://www.originlab.com/>). Результаты расчетов представлены в виде медианы и интерквартильного интервала.

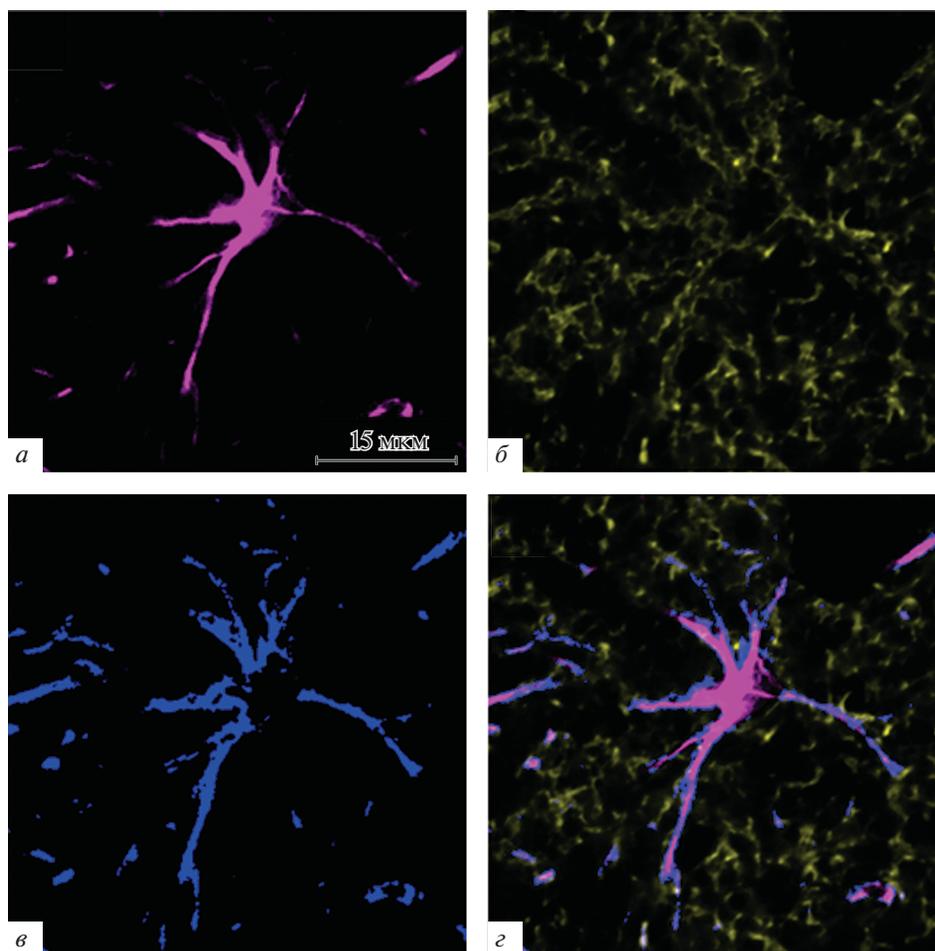
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Предварительная обработка изображений.** Полученные цифровые изображения подвергались предварительной обработке перед анализом. Для коррективы неоднородности распределения сигнала (абберация оптических систем, различное проникновение и рассеивание света по z-оси в образце) применяли алгоритм нормализации интенсивности флюоресценции (Yayon et al., 2018). Каждый канал оригинального стека проходил нормализацию в программе Intensify 3D со следующими параметрами: размер пространственного фильтра 205 пикселей, автоматическая детекция ткани с помощью EM-алгоритма с параметром чувствительности равным 9 пикселям. Данные параметры выбирали с учетом имеющегося опыта использования данного алгоритма. Следует учитывать, что при использовании слишком высоких или слишком низких значений параметров фильтра, возможно появление артефактных зон с повышенным уровнем флюоресценции, что является критичным для дальнейшего анализа (Yayon et al., 2018). Затем для удаления шума применяли медианный фильтр (Median3D Filter; параметры фильтра:  $x$  радиус “2” пикселя,  $y$  радиус “2” пикселя,  $z$  радиус “2” пикселя), являющийся стандартным плагином в ImageJ. Таким образом были получены нормализованные изображения, с более четким контуром как тел, так и отростков исследуемых клеток.

**Двухмерный анализ.** Изображения анализировали в плагине GDSC (Herbert et al., 2014), который позволяет осуществлять анализ колокализации белков в разных каналах. Применение такого подхода позволяет производить более объективную оценку колокализованных областей интереса, в сравнении с описательным методом. Кроме того, этот анализ используется для определения точного местоположения интересующих структур и их общих характеристик. Анализ выполнялся в два этапа: поиск корреляционного порога, где отделяется сигнал от шума, и анализ колокализации пикселей, где пиксели считаются колокализованными, если присутствуют в двух каналах одновременно. Поиск корреляционного порога выполняется автоматически плагином GDSC (Costes et al. 2004). Далее вычисляли значения коэффициента Мандерса, коэффициента корреляции Пирсона, и процент колокализованных пикселей — показатели, которые широко используются для коло-

кализационного анализа (Manders et al., 1993; Zinchuk, Grossenbacher-Zinchuk, 2009; Adler, Parmryd, 2010; Ramírez et al., 2010; Zinchuk et al., 2013; Wang et al., 2016; Papageorgiou et al., 2018). Коэффициент Пирсона отражает корреляцию интенсивности флюоресценции между двумя каналами и может варьировать от  $-1$  (отрицательная корреляция) до  $1$  (положительная корреляция). Коэффициент Мандерса представляет собой долю пикселей от каждого канала, которые вносят вклад в колокализованную область, т.е. представляет степень перекрытия сигнала и может принимать значения в пределах от  $0$  до  $1$  (Manders et al., 1993; Adler, Parmryd, 2010; Ramírez et al., 2010). Эти критерии позволяют получить информацию о степени взаимного перекрытия маркированных белков, а также оценить степень колокализации между ними (Zinchuk et al., 2013). Поскольку значения коэффициентов Мандерса и Пирсона часто принимают промежуточные значения, необходимо ввести оценочные критерии для различных уровней показателя. На практике удобно использовать классификатор, предложенный Зинчук с соавторами (Zinchuk et al., 2013). Данный метод подразумевает использование следующих оценок для характеристики степени колокализации с учетом значений коэффициента корреляции Пирсона и коэффициента Мандерса:  $0.1$  — очень слабая,  $0.2$  — слабая,  $0.3$  — менее слабая,  $0.4$  — меньше умеренной,  $0.5$  — умеренная,  $0.6$  — более умеренная,  $0.7$  — меньше сильной,  $0.8$  — сильная,  $0.9$  — очень сильная). Тем не менее, применение данного подхода не избавляет от трудностей интерпретирования близких значений. Например, при очень слабой степени колокализации сложно объяснить в чем состоит биологический смысл ее отличия от слабой степени колокализации.

С использованием плагина GDSC были получены изображения с колокализованными пикселями (рис. 1а), где пурпурным цветом отображен GFAP (рис. 1а), желтым — GLT-1 (рис. 1б), синим — колокализованные пиксели (рис. 1в). Рассчитанные основные характеристики представлены в табл. 1. Согласно коэффициенту Пирсона ( $0.15 \pm 0.07$  при  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ), изучаемые белки демонстрируют очень слабую степень колокализации. Анализ показал, что коэффициент Мандерса имеет значения  $0.63 \pm 0.18$  при  $p < 0.05$  для GFAP и  $0.22 \pm 0.29$  при  $p < 0.05$  для GLT-1 (табл. 1). Значение параметра доли колокализованных пикселей для обоих каналов оказалось малым и составило  $0.09 \pm 0.17$  при  $p < 0.05$ . Объяснить это можно тем, что исследуемые маркеры располагаются не слишком близко друг к другу, что обусловлено размещением в разных клеточных компартментах (GFAP — белок цитоскелета, GLT-1 — мембранный белок). В целом, такого рода данные могут быть использованы для исследования структурно-функциональных особенностей распределения двух белков в разных физиологических и патологических состояниях.



**Рис. 1.** Визуализация GFAP и GLT-1 в одном из астроцитов гиппокампа крысы с помощью плагина GDSC в пределах одного оптического среза толщиной 0.3 мкм. *а* – GFAP (пурпурный), *б* – GLT-1 (желтый), *в* – области колокализации астроцитарных GFAP и GLT-1 (синий), *г* – объединенное изображение GFAP, GLT-1 и колокализованных пикселей.

Описанный подход к анализу изображений позволяет получить количественную информацию о колокализации исследуемых белков, что представляет возможность для оценки структурно-функционального состояния отдельных астроцитов. Тем не менее, этот метод имеет значительный недостаток, связанный со сложностью интерпретации промежуточных значений используемых коэффициентов Пирсона и Мандерса. В целом, количественные параметры описанного подхода позволяют получить информацию о перекрывающихся пикселях исследуемых маркеров, но не о пространственных характеристиках, таких как объем, площадь поверхности и т.д. Подобные недостатки ограничивают применение двумерного подхода к анализу изображений сложно организованных биологических объектов, что требует использования трехмерного подхода, который их устраняет.

**3D анализ.** Изображения, подвергавшиеся пре-процессингу, далее проходили процедуру сегмента-

ции в дополнительном плагине ImageJ 3D Suite. К настоящему времени разработаны различные алгоритмы сегментации, что позволяет при выборе алгоритма учитывать особенности распределения марке-

**Таблица 1.** Значения коэффициентов колокализации, рассчитанные в плагине GDSC для изображений с двойным иммуномечением GFAP и GLT-1

Коэффициент колокализации	Значения коэффициентов
Коэффициент Пирсона	$0.15 \pm 0.07$
Коэффициент Мандерса для GFAP	$0.63 \pm 0.18$
Коэффициент Мандерса для GLT-1	$0.22 \pm 0.29$
Общий объем колокализованных пикселей	$0.09 \pm 0.17$

Данные представлены в виде медианы  $\pm$  интерквартильный размах при  $p < 0.05$ . Для анализа использовали каждый 4-й срез из каждого z-стека для 5 животных.

ров (Bolte, Cordeliers, 2006; Heck et al., 2015; Sigal et al., 2015). В данной работе, принимая во внимание особенности распределения белков GLT-1 (мембранный белок) и GFAP (белок цитоскелета), применяли разные алгоритмы сегментации. Так, изображения с реакцией на GLT-1 сегментировали с использованием точечной сегментации ("spot segmentation"), что позволяет более правильно определять кластеры транспортеров глутамата. В то время как для цитоплазматического белка GFAP применяли алгоритм простой сегментации ("simple segmentation"), в результате чего отростки лучше выявлялись. Сегментированные изображения анализировали в плагине DiAna в ImageJ (Gilles et al., 2017). Плагин позволяет получить значения объема колокализованных вокселей (объем, занимаемый вокселями, которые располагаются в одном и том же объеме пространства в обоих каналах, нормализованных к общему объему вокселей одного канала): общий объем колокализованных вокселей в обоих каналах (составил  $0.053 \pm 0.05\%$ ), объем колокализованных вокселей для каждого из каналов (для GFAP  $0.05 \pm 0.05\%$ , для GLT-1  $31.86 \pm 41.42\%$ ). Использование этих параметров позволяет косвенно судить об объеме, который занимает изучаемый белок, а также об изменениях соотношения маркеров в ткани. Также изменения в объеме колокализованных вокселей могут свидетельствовать о перераспределении наблюдаемых белков. Кроме того, рассчитываются значения объема и площади поверхности для маркеров обоих каналов (объем GFAP в ткани  $925.62 \pm 1035.6$  мкм<sup>3</sup>, площадь поверхности GFAP  $8074.31 \pm 6929.66$  мкм<sup>2</sup>, объем GLT-1  $1543.96 \pm 1499.9$  мкм<sup>3</sup>, площадь поверхности GLT-1  $19723.64 \pm 40917.76$  мкм<sup>2</sup>). Более того, для белков с преимущественно кластерным распределением актуально использование параметра объема и количества кластеров (объем кластера GLT-1  $0.16 \pm 0.15$  мкм<sup>3</sup>, количество кластеров GLT-1  $86.38 \pm 76.49$  на  $125$  мкм<sup>3</sup>) (рис. 2б), что также может являться важным физиологическим показателем. Исследованные параметры, в отличие от двухмерного подхода, позволяют оценить пространственные характеристики исследуемых маркеров в норме (объем, площадь поверхности исследуемых маркеров ткани, объем и количество кластеров), что может быть использовано в дальнейшем для сравнительного исследования при патологических состояниях. При использовании различных алгоритмов сегментации важно учитывать характер распределения маркера, так, при использовании точечной сегментации для цитоплазматических белков можно получить артефактные изменения в толщине и форме отростков. Поэтому необходимо подбирать метод сегментации в соответствии с характером цитологического объекта. Для графического представления полученных в результате трехмерного анализа изображений возможно применение программы Blender, имеющей более широкие возможности для трехмерного реконструиро-

вания, чем базовая программа ImageJ (рис. 2). Таким образом, использование трехмерного подхода к анализу изображений позволяет получить свидетельства функционального состояния рассматриваемых маркеров, что может быть использовано как при исследовании нормального морфофункционального состояния мозга, так и его патологических изменений.

Описанный трехмерный подход, в отличие от двухмерного, позволяет получить информацию не только о колокализации исследуемых маркеров, но и о пространственных характеристиках изучаемых объектов. В частности, используемый алгоритм анализа позволяет рассчитать площадь поверхности изучаемого объекта и объем, занимаемый анализируемым маркером. Более того, для белков с кластерным распределением возможно получение информации о количестве и размерах кластеров. Учитывая то, что трехмерный подход показал информативность при анализе распределения как цитоплазматического, так и мембранного астроцитарных маркеров, можно заключить, что использование подобных маркеров и при исследованиях других клеток нервной системы окажется перспективным.

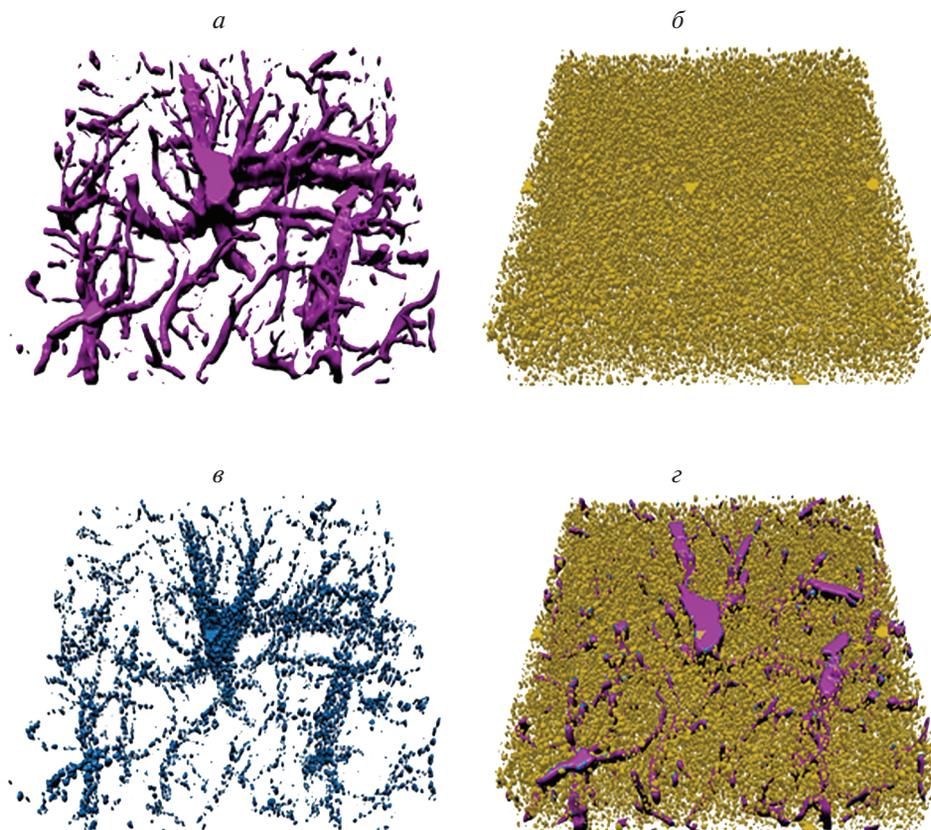
Полученные результаты свидетельствуют о том, что использование многомаркерной конфокальной микроскопии в сочетании с современными методами 2D и 3D анализа позволяет увеличить объем информации о структурно-функциональной организации астроцитов центральной нервной системы в дополнение к традиционным методам морфометрического анализа. На основании проведенного исследования можно заключить, что для исследования сложноорганизованных цитологических структур, к которым относятся и астроциты, предпочтительнее выбирать трехмерные алгоритмы анализа. Несомненным преимуществом представленного подхода является использование общедоступного программного обеспечения, которое широко используется исследователями, что обеспечивает определенный уровень стандартизации морфологических подходов, необходимый для сопоставления данных, получаемых различными научными группами.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-34-80016).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При работе с животными были соблюдены все применимые международные и национальные принципы гуманного обращения с животными. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ "ИЭМ" (протокол № 3/18 от 22.11.2018).



**Рис. 2.** Трехмерная реконструкция астроцита гиппокампа из оптических срезов в программе Blender. Для создания изображения был использован z-стек размером  $40 \times 40 \times 4$  мкм. *а* – Трехмерная реконструкция на основе реакции на GFAP, *б* – реконструкция на основе распределения глутаматных транспортеров, *в* – трехмерная визуализация колокализованных вокселей, *г* – совмещенное изображение для обоих маркеров (GFAP и GLT-1).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ведяйкин А.Д., Ходорковский М.А., Вишняков И.Е.* 2019. Методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения и их использование для визуализации различных клеточных структур. *Цитология*. Т. 61. № 5 С. 343. (*Vedyaykin A.D., Khodorkovskii M.A., Vishnyakov I.E.* 2019. Super-resolution microscopy methods and their use for visualization of various cell structures. *Tsitologiya*. V. 61. № 5. P. 343.)
- Штейн Г.И.* 2007. Руководство по конфокальной микроскопии. СПб: Институт цитологии РАН. (*Stein G.I.* 2007. Guide to confocal microscopy. SPb: Institute of Cytology RAS.)
- Adler J., Parmryd I.* 2010. Quantifying colocalization by correlation: The pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytom. Part A*. V. 77. P. 733.
- Baber Z., Haghghat N.* 2010. Glutamine synthetase gene expression and glutamate transporters in C6-glioma cells. *Metab. Brain Dis.* V. 25. P. 413.
- Benediktsson A.M., Marrs G.S., Tu J.C., Worley P.F., Rothstein J.D., Bergles D.E., Dailey M.E.* 2012. Neuronal activity regulates glutamate transporter dynamics in developing astrocytes. *Glia*. V. 60. P. 175.
- Bernardinelli Y., Muller D., Nikonenko I.* 2014. Astrocyte-synapse structural plasticity. *Neural. Plast.* V. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/232105>
- Bolte S., Cordelieres F.P.* 2006. A guided tour into subcellular colocalisation analysis in light microscopy. *J. Microsc.* V. 224. P. 213.
- Calì C., Baghabra J., Boges D.J., Holst G.R., Kreshuk A., Hamprecht F.A., Srinivasan M., Lehvälaiho H., Magistretti P.J.* 2016. Three-dimensional immersive virtual reality for studying cellular compartments in 3D models from EM preparations of neural tissues. *J. Comp. Neurol.* V. 524. P. 23.
- Costes S. V., Daelemans D., Cho E.H., Dobbin Z., Pavlakis G., Lockett S.* 2004. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys. J.* V. 86. P. 3993.
- Emsley J.G., Macklis J.D.* 2006. Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol.* V. 2. P. 175.

- Gibbons M.B., Smeal R.M., Takahashi D.K., Vargas J.R., Wilcox K.S. 2013. Contributions of astrocytes to epileptogenesis following status epilepticus: Opportunities for preventive therapy. *Neurochem. Int.* V. 3. P. 660.
- Gilles J.-F., Dos Santos M., Boudier T., Bolte S., Heck N. 2017. DiAna, an ImageJ tool for object-based 3D co-localization and distance analysis. *Methods.* V. 115. P. 55.
- Hancock S.M., Finkelstein D.I., Adlard P.A. 2014. Glia and zinc in ageing and alzheimer's disease: A mechanism for cognitive decline. *Front. Aging Neurosci.* V. 6. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00137>
- Heck N., Dos Santos M., Amairi B., Salery M., Besnard A., Herzog E., Boudier T., Vanhoutte P., Caboche J. 2015. A new automated 3D detection of synaptic contacts reveals the formation of cortico-striatal synapses upon cocaine treatment *in vivo*. *Brain Struct. Funct.* V. 220. P. 2953.
- Herbert A.D., Carr A.M., Hoffmann E. 2014. FindFoci: A focus detection algorithm with automated parameter training that closely matches human assignments, reduces human inconsistencies and increases speed of analysis. *PLoS One.* V. 9. P. 344
- Hubbard J.A., Szu J.I., Yonan J.M., Binder D.K. 2016. Regulation of astrocyte glutamate transporter-1 (GLT1) and aquaporin-4 (AQP4) expression in a model of epilepsy. *Exp. Neurol.* V. 283. P. 85.
- Jonkman J., Brown C.M., Wright G.D., Anderson K.I., North A.J. 2020. Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy. *Nat. Protoc.* V. 15. P. 1585.
- Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. 2015. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur. J. Histochem.* V. 59. P. 5.
- Kraus F., Miron E., Demmerle J., Chitiashvili T., Budco A., Alle Q., Matsuda A., Leonhardt H., Schermelleh L., Markaki Y. 2017. Quantitative 3D structured illumination microscopy of nuclear structures. *Nat. Protoc.* V. 12. P. 1011.
- Kulijewicz-Nawrot M., Syková E., Chvátal A., Verkhratsky A., Rodríguez J.J. 2013. Astrocytes and glutamate homeostasis in Alzheimer's disease: A decrease in glutamine synthetase, but not in glutamate transporter-1, in the prefrontal cortex. *ASN Neuro.* V. 5. P. 273.
- Lagache T., Sauvonnnet N., Danglot L., Olivo-Marin J.-C. 2015. Statistical analysis of molecule colocalization in bioimaging. *Cytom. Part A.* V. 87. P. 568.
- Manders E.M., Verbeek F.J., Aten J.A. 1993. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microsc.* V. 169. P. 375.
- Murphy-Royal C., Dupuis J., Groc L., Oliet S.H.R. 2017. Astroglial glutamate transporters in the brain: Regulating neurotransmitter homeostasis and synaptic transmission. *J. Neurosci. Res.* V. 95. P. 2140.
- Murphy-Royal C., Dupuis J.P., Varela J.A., Panatier A., Pinson B., Baufreton J., Groc L., Oliet S.H.R. 2015. Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* V. 18. P. 219.
- Papageorgiou I.E., Valous N.A., Lahrmann B., Janova H., Klafit Z., Koch A., Schneider U.C., Vajkoczy P., Heppner F.L., Grabe N., Halama N., Heinemann U., Kann O. 2018. Astrocytic glutamine synthetase is expressed in the neuronal somatic layers and down-regulated proportionally to neuronal loss in the human epileptic hippocampus. *Glia.* V. 66. P. 920.
- Pekny M., Pekna M. 2014. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: Costs and benefits. *Physiol. Rev.* V. 94. P. 1077.
- Ramírez O., García A., Rojas R., Couve A., Härtel S. 2010. Confined displacement algorithm determines true and random colocalization in fluorescence microscopy. *J. Microsc.* V. 239. P. 173.
- Rizk A., Paul G., Incardona P., Bugarski M., Mansouri M., Niemann A., Ziegler U., Berger P., Sbalzarini I.F. 2014. Segmentation and quantification of subcellular structures in fluorescence microscopy images using Squash. *Nat. Protoc.* V. 9. P. 586.
- Rodríguez-Arellano J.J., Parpura V., Zorec R., Verkhratsky A. 2016. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience.* V. 323. P. 170.
- Sigal Y.M., Speer C.M., Babcock H.P., Zhuang X. 2015. Mapping synaptic input fields of neurons with super-resolution imaging. *Cell.* V. 163. P. 493.
- Sukhorukova E.G., Korzhevskii D.E., Alekseeva O.S. 2015. Glial fibrillary acidic protein: The component of intermediate filaments in the vertebrate brain astrocytes. *J. Evol. Biochem. Phys.* V. 51. P. 1.
- Takahashi D.K., Vargas J.R., Wilcox K.S. 2010. Increased coupling and altered glutamate transport currents in astrocytes following kainic-acid-induced status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* V. 40. P. 573.
- Verkhratsky A., Rodríguez J.J., Parpura V. 2014. Neuroglia in ageing and disease. *Cell Tissue Res.* V. 357. P. 493.
- Verkhratsky A., Zorec R., Rodríguez J.J., Parpura V. 2016. Pathobiology of neurodegeneration: The role for astroglia. *Opera Med. Physiol.* V. 2. P. 1.
- Wang W., Kiyoshi C.M., Du Y., Ma B., Alford C.C., Chen H., Zhou M. 2016. mGluR3 activation recruits cytoplasmic TWIK-1 channels to membrane that enhances ammonium uptake in hippocampal astrocytes. *Mol. Neurobiol.* V. 53. P. 6169.
- Yayon N., Dudai A., Vrieler N., Amsalem O., London M., Soreq H. 2018. Intensify3D: Normalizing signal intensity in large heterogenic image stacks. *Sci. Rep.* V. 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22489-1>
- Zinchuk V., Grossenbacher-Zinchuk O. 2009. Recent advances in quantitative colocalization analysis: Focus on neuroscience. *Prog. Histochem. Cytochem.* V. 44. P. 125.
- Zinchuk V., Wu Y., Grossenbacher-Zinchuk O. 2013. Bridging the gap between qualitative and quantitative colocalization results in fluorescence microscopy studies. *Sci. Rep.* V. 3. <https://doi.org/10.1038/srep01365>

## **Astrocyte Structural Organization Analysis Based on Fluorescent Microscopy with 2D and 3D Quantitative Approaches**

**O. I. Nosova<sup>a,\*</sup>, D. A. Sufieva<sup>a</sup>, and D. E. Korzhevsky<sup>a</sup>**

*<sup>a</sup>Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia*

*\*e-mail: nosova@neuro.nnov.ru*

According to the obtained data over the last decades, astrocytes play a crucial role in neuronal homeostasis. Therefore, the software for assessing morphological changes in astrocytes is not sufficiently cover in the literature. Hence, the article examines two- and three-dimensional quantitative approach of astrocytic structure analysis based on freely available software. The brains of mature male Wistar rats was used ( $n = 5$ ). Double immunocytochemical GFAP/GLT-1 staining was performed to obtain fluorescent confocal images. The article supposes the implementation of recent analysis approaches using freely available software to obtain qualitative and quantitative information about the structural features of heterogeneous cells of central nervous system such as astrocytes. Moreover, proposed approach provides standardization of data that necessary for comparing the results obtained by different scientific groups.

**Keywords:** astrocytes, ImageJ, immunocytochemistry, confocal laser microscopy, quantitative analysis, morphometry

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОНОМЕРОВ В БЛИЖНЕ-ИНФРАКРАСНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БИОМАРКЕРАХ

© 2021 г. О. В. Степаненко<sup>1</sup>, \*, О. В. Степаненко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

\*E-mail: sov@incras.ru

Поступила в редакцию 16.09.2020 г.

После доработки 02.10.2020 г.

Принята к публикации 03.10.2020 г.

В настоящей работе мы проанализировали, как изменяется взаимодействие между мономерами в ближне-инфракрасных флуоресцентных биомаркерах iRFP713 и iRFP713/C15S/V256C при изменении сети водородных связей между хромофором и его белковым окружением в результате аминокислотной замены треонина в положении 204 на аланин (T204A) в микроокружении хромофора или при замене природного лиганда биливердина на фикоцианобилин. Обнаруженное ранее аллостерическое ингибирование ковалентного присоединения биливердина к мономеру iRFP713/C15S/V256C после ковалентного присоединения хромофора к другому мономеру белка существенно уменьшается при введении замены T204A. Аллостерического ингибирования ковалентного связывания фикоцианобилина с iRFP713/C15S/V256C не происходит, в отличие от связывания биливердина с этим белком. Напротив, замена биливердина на фикоцианобилин в iRFP713 приводит к усилению аллостерического ингибирования ковалентного связывания хромофора. Наши исследования свидетельствуют, что изменение внутримолекулярных связей между хромофором и остатками его микроокружения в биомаркерах, происходящее при замене хромофора или в результате аминокислотных замен, оказывает влияние на взаимодействие мономеров в биомаркере.

**Ключевые слова:** бактериальные фитохромы, флуоресцентные биомаркеры, аллостерическое взаимодействие

**DOI:** 10.31857/S0041377121010107

Предметом настоящего исследования являются димерные ближне-инфракрасные (NIR) биомаркеры, разработанные на основе бактериальных фитохромов – фотосенсорных белков, которые участвуют в свето-зависимой регуляции биологических процессов в клетках бактерий. NIR-биомаркеры состоят из двух доменов PAS (Per-ARNT-Sim) и GAF (cGMP PDE/AC/FhlA), которые вместе образуют так называемый хромофор-связывающий домен полноразмерных фитохромов. В состав N-концевого участка домена PAS входит цистеиновый остаток, который необходим для ковалентной фиксации хромофора, а в домене GAF находится карман для встраивания тетрапиррольного хромофора (Rodriguez et al., 2017). Комплексы NIR-биомаркеров с их лигандом биливердином (BV) нашли широкое применение в качестве генетически-кодируемых меток для прижизненной визуализации молекулярных процессов с высоким разрешением в реальном масштабе времени, происходящих в отдельных клетках и в целом организме (Rodriguez et al., 2017).

В фитохромах при фотоконверсии происходит передача структурных изменений от тетрапиррольного хромофора к хромофор-связывающему домену и далее последовательно к остальным доменам белка (Takala et al., 2014; Burgie et al., 2016; von Horsten et al., 2016). Кроме того, домены фоторецепторов, аминокислоты которых не контактируют с тетрапирролом в хромофор-связывающем домене напрямую, также влияют на процесс изомеризации хромофора (Burgie et al., 2017). Считается, что подобная связь между доменами фоторецепторов расширяет возможности регуляции процессов фотоактивации и темновой релаксации этих белков (Gourinchas et al., 2018).

Наши исследования также выявили влияние мономеров в NIR-биомаркерах на структуру друг друга, которое определяет характер связывания хромофора с отдельными мономерами белка (Stepanenko et al., 2016, 2017). Этот эффект заключается в том, что ковалентное связывание BV с остатком Cys в одном из мономеров биомаркера аллостерически ингибирует формирование ковалентной связи между встроенным в карман белка хромофором и остатком Cys второго мономера биомаркера. Характер связывания хромофора в NIR-биомаркерах оказывает существенное влияние их фотофизические свойства, в частности

**Принятые сокращения:** NIR-биомаркеры – ближне-инфракрасные флуоресцентные биомаркеры; BV – биливердин; PСВ – фикоцианобилин; GdnHCl – гидрохлорид гуанидина.

квантовый выход и стабильность, существенные для их использования в качестве генетически-кодируемых меток в клетке. Это определяет актуальность дальнейшего исследования межмономерных аллостерических эффектов в NIR-биомаркерах.

В настоящей работе мы анализировали, какое влияние оказывает изменение внутримолекулярных связей между хромофором и его белковым окружением в NIR-биомаркере на взаимодействие между мономерами. Для этого мы проанализировали, как изменяются спектры поглощения флуоресценции биомаркеров iRFP713 и iRFP713/C15S/V256C, имеющих цистеиновые остатки, способные к ковалентному присоединению BV, в разных доменах белка в нативном состоянии и под действием денатуранта при введении аминокислотной замены в положение 204 (замена треонина на аланин) и при изменении вида тетрапиррола.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Материалы.** Гидрохлорид гуанидина (GdnHCl) и трис(гидроксиметил)аминометан (Tris) производства Sigma (США), а также фикоцианобилин (PCB, Frontier Scientific, США) использованы без дополнительной очистки. Концентрацию GdnHCl определяли с помощью рефрактометра Аббе (ЛОМО, Россия). Для определения концентрации PCB использовали коэффициент молярной экстинкции  $\epsilon_{662} = 35.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  в денатурирующих условиях при высокой кислотности раствора (8 M, pH 2.0) (Glazer, Fang, 1973).

**Выделение и очистка белков.** Гены целевых биомаркеров, а именно белков iRFP713 и iRFP713/C15S/V256C и их мутантных форм, несущих аминокислотную замену треонина в положении 204 на аланин iRFP713/T204A и iRFP713/C15S/V256C/T204A, с полигистидиновой меткой на N-конце клонированы в вектор pBAD/His-B (Invitrogen, США) по сайтам BglII и EcoRI, которым трансформировали штамм бактерий *E. coli* LMG 194. Биомаркеры получены и очищены, как описано ранее (Stepanenko et al., 2016, 2019). Кратко, биомаркеры в апо- (т.е. в отсутствие хромофора) и холоформе (т.е. в комплексе с биливердином) получены при экспрессии только гена целевого белка и совместно с геном гемоксигеназы (НО) с вектора pWA23h-НО соответственно. Фермент НО обеспечивает синтез BV. Для экспрессии биомаркеров в апоформах использовали среду RM (48 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 22 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 19 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 8.5 mM NaCl, 2% казаминовых кислот, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM тиамин), содержащую ампицилин. В состав культуральной среды для экспрессии биомаркеров в холоформе входили ампицилин и канамицин. Для индукции экспрессии биомаркера и НО использовали арабинозу и рамнозу соответственно. Клеточный лизат очищали с помощью афинной хроматографии на колонках His-GraviTrap (GE Healthcare, Швеция)

и ион-обменной хроматографии на колонке MonoQ (GE HealthCare, Швеция). Чистоту полученных биомаркеров контролировали электрофоретически. Оптическая плотность в растворах белка не превышала 0.1, измерения выполнены в растворе 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, содержащем 1 mM гидрохлорида трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCPEP).

**Спектрофотометрические измерения.** Спектры поглощения биомаркеров измерены с использованием спектрофотометра U-3900H (Hitachi, Япония) и кварцевых кювет (101.016-QS, Hellma, Германия) с длиной оптического пути 5 мм.

**Флуоресцентные измерения.** Для измерений использовали спектрофлуориметр Cary Eclipse (Agilent, США) и кюветы  $10 \times 10 \times 4$  мм (Starna, США). Интенсивность флуоресценции BV и PCB корректировали на эффект вторичного внутреннего фильтра (Fonin et al., 2014).

**Разворачивание белка.** Разворачивание белка инициировали ручным смешением нативного белка с буферным раствором, содержащим необходимую концентрацию денатуранта. Равновесные значения оптической плотности и эллиптичности при 222 нм белков измеряли после инкубации белка в присутствии GdnHCl при 23°C в течение 24 ч. Значения доли нативных молекул белка получены в результате аппроксимации зависимостей эллиптичности при 222 нм белков от концентрации GdnHCl, выполненной в программе Sigma Plot (Systat Software Inc., USA) согласно уравнению:

$$\begin{aligned} \theta_{222}([D]) &= \alpha_N([D])\theta_{222}^N + \alpha_U([D])\theta_{222}^U = \\ &= \alpha_N([D])\theta_{222}^N + (1 - \alpha_N([D]))\theta_{222}^U, \end{aligned}$$

где  $\alpha_N(\alpha_U)$  – доля белка в нативном (денатурированном) состояниях,  $\theta_{222}^N(\theta_{222}^U)$  – сигнал нативного (денатурированного) белка,  $[D]$  – концентрация GdnHCl. Сигнал  $\theta_{222}^N(\theta_{222}^U)$  нативного и денатурированного белка аппроксимировали линейно:  $\theta_{222}^{N/U} = a_{N/U} + b_{N/U}[D]$ . Здесь  $a_{N/U}$  и  $b_{N/U}$  – постоянные.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**План эксперимента.** Известно, что в полноразмерных фитохромах и в NIR-биомаркерах на их основе контакты остатка в положении 204 с хромофором и другими аминокислотами играют ключевую роль в индуцированных светом процессах в этих белках (Toh et al., 2011; Auldrige et al., 2012; Bhattacharya et al. 2014; Velazquez Escobar et al., 2014; Buhrke et al., 2016). Кроме того, наши предыдущие результаты свидетельствуют о том, что аминокислотная замена треонина в положении 204 на аланин (T204A) в биомаркере iRFP713 (Filonov et al., 2011) затрагивает внутрибелковые водородные связи вокруг хромофора (Stepanenko et al., 2020). Мы также показали, что замена BV на фикоцианобилин (PCB), который явля-

ется кофактором фоторецепторов цианобактерий и представляет собой восстановленную форму BV (Frankenberg, 2003; Rockwell et al., 2017), в NIR-биомаркерах приводит к реорганизации сети внутримолекулярных водородных связей в хромофор-связывающем кармане этих белков (Stepanenko et al., 2019).

В настоящей работе мы проанализировали, как влияет замена аминокислоты треонина в положении 204 на аланин (T204A) и изменение вида тетрапиррола в iRFP713 на характер связывания хромофора в отдельных мономерах белка. Такой же анализ был выполнен для биомаркера iRFP713/C15S/V256C, в котором сайт ковалентного присоединения хромофора изменен с Cys15 в N-концевом участке PAS-доменов на Cys256 в GAF-доменах белка. Мы использовали предложенный нами ранее подход, который основан на совместном анализе формы спектра поглощения в видимой области спектра и структуры биомаркера при его разворачивании (Stepanenko et al., 2016). Подобный анализ ранее помог нам обнаружить, что некоторые NIR-биомаркеры содержат спектрально идентичные виды хромофора, которые по-разному связаны с белком (Stepanenko et al., 2016).

**Характер связывания хромофора в NIR-биомаркерах, содержащих аминокислотную замену T204A.** Длинноволновое положение спектров поглощения и флуоресценции биомаркера iRFP713/T204A свидетельствует о том, что в этом белке так же, как и в iRFP713, BV ковалентно связан с Cys15 (рис. 1а). Однако очень похожие спектральные свойства имеет BV, который встроен в карман GAF-домена, но не связан с белком ковалентно (Stepanenko et al., 2016). Поэтому мы провели анализ изменения формы спектра поглощения iRFP713/T204A и доли белка в нативном состоянии при его денатурации под действием GdnHCl. Обе зависимости имеют простую сигмоидальную форму, что указывает на то, что этот белок имеет в своем составе только одну форму хромофора – BV, ковалентно связанную с Cys15 (рис. 1б, в).

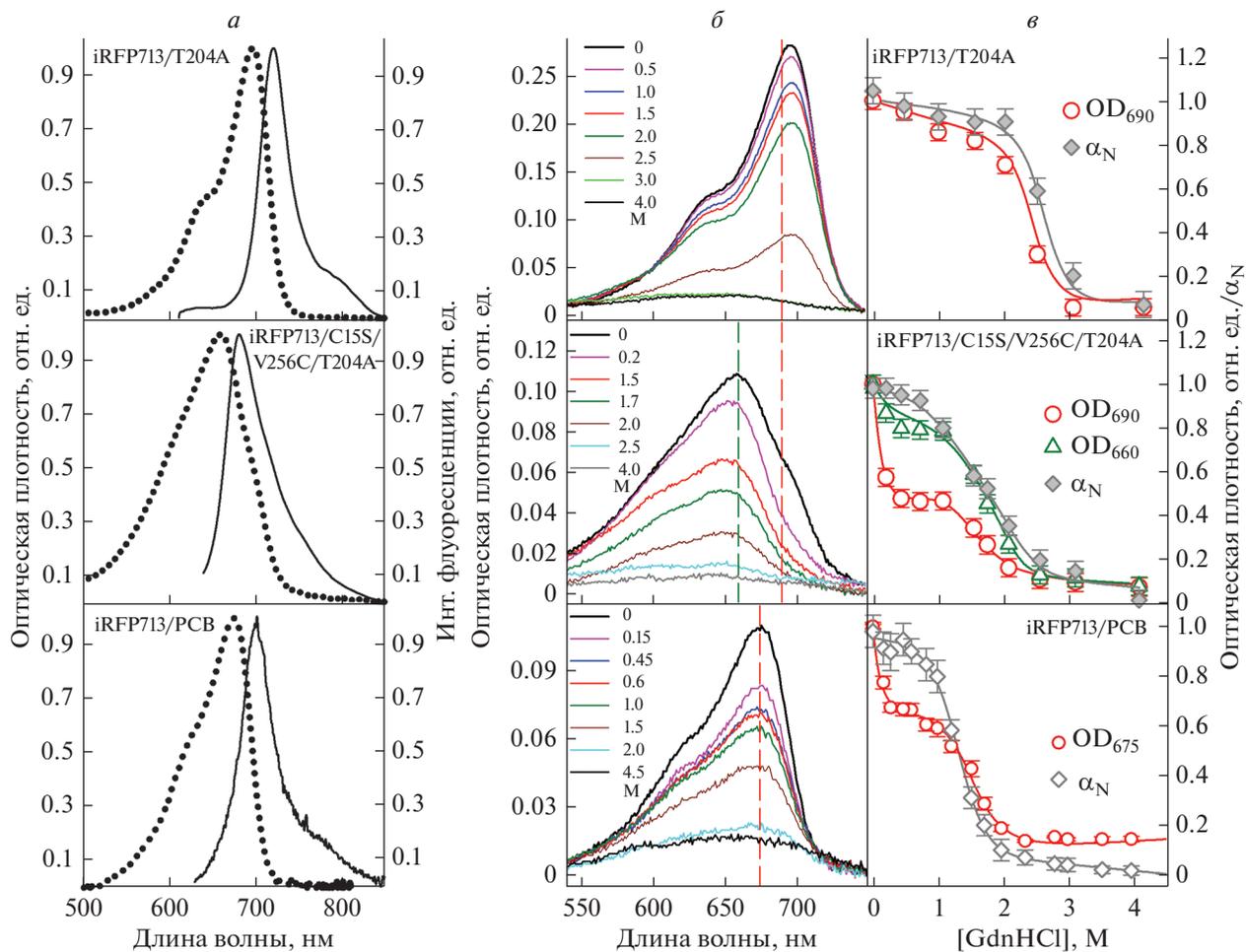
Коротковолновое положение спектров поглощения и флуоресценции iRFP713/C15S/V256C/T204A позволяет нам утверждать, что в состав этого белка входит преимущественно BV, образующий химическую связь с Cys256 (рис. 1а). Молекулы iRFP713/C15S/V256C/T204A содержат еще один вид хромофора: BV, встроенный в белковую глобулу, но не зафиксированный химическими связями с цистеиновыми остатками белка. Об этом свидетельствуют длинноволновое плечо в спектрах поглощения (флуоресценции) iRFP713/C15S/V256C/T204A, сложный характер зависимостей оптической плотности белка от концентрации денатуранта и несовпадение зависимостей оптической плотности, измеренной в максимуме и на длинноволновом краю спектра поглощения белка (рис. 1б, в). Следует отметить, что длинноволновое плечо в спектре поглощения

iRFP713/C15S/V256C более выражено по сравнению с длинноволновым плечом в спектре поглощения iRFP713/C15S/V256C/T204A (Stepanenko et al., 2016). Это означает, что доля BV, встроенного в белковую глобулу, но не присоединенного ковалентно к цистеиновым остаткам, в iRFP713/C15S/V256C/T204A меньше, чем в iRFP713/C15S/V256C (рис. 1а). Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение замены T204A в iRFP713/C15S/V256C приводит к уменьшению межмономерного аллостерического ингибирования ковалентного присоединения BV к Cys256 в этом белке.

**Характер связывания PCB в NIR-биомаркерах.** Спектр поглощения в инфракрасной области спектра iRFP713/C15S/V256C/PCB (рис. 2) аналогичен спектрам поглощения фитохромов цианобактерий и растительных фитохромов, кофактором которых служит PCB (Hahn et al., 2006; Burgie et al., 2017). Это свидетельствует о том, что PCB при включении в карман GAF домена белка iRFP713/C15S/V256C образует химическую связь с Cys256 и теряет одну двойную связь, что приводит к коротковолновому сдвигу его спектра поглощения по сравнению со свободным тетрапирролом. В спектре поглощения (флуоресценции) iRFP713/C15S/V256C/PCB отсутствуют длинноволновые плечи, т.е. этот биомаркер не содержит в своем составе хромофора, который не присоединен ковалентно к белку. Это говорит о том, что в данном случае не наблюдается аллостерического ингибирования ковалентного связывания PCB в мономерах iRFP713/C15S/V256C, которое характерно для комплексов этого белка с BV (Stepanenko et al., 2016).

При ковалентном присоединении PCB к Cys15 в iRFP713 образуется хромофор с необычно длинноволновыми спектрами поглощения и флуоресценции (рис. 1а), которые практически совпадают со спектрами поглощения и флуоресценции PCB в белке, не содержащем остатков цистеина, подходящих для ковалентного связывания тетрапиррола (Stepanenko et al., 2019). Это означает, что на основании характера спектра поглощения iRFP713/PCB мы не можем сказать, входит ли в состав белка хромофор, не присоединенный к нему ковалентно.

Было изучено, как изменяется характер спектров поглощения при разворачивании iRFP713/PCB (рис. 1б, в). Зависимость оптической плотности в максимуме спектра поглощения iRFP713/PCB от концентрации GdnHCl имеет сложный характер. Наблюдается уменьшение оптической плотности iRFP713/PCB в области малых концентраций денатуранта, при которых белок сохраняет свою нативную структуру. Это говорит о высвобождении от iRFP713/PCB хромофора, который не связан прочно с белком, т.е. не связан с ним ковалентно. Уменьшение оптической плотности iRFP713/PCB в области концентраций денатуранта от 1 до 2 М сопровождается разрушением структуры белка. Это свидетель-



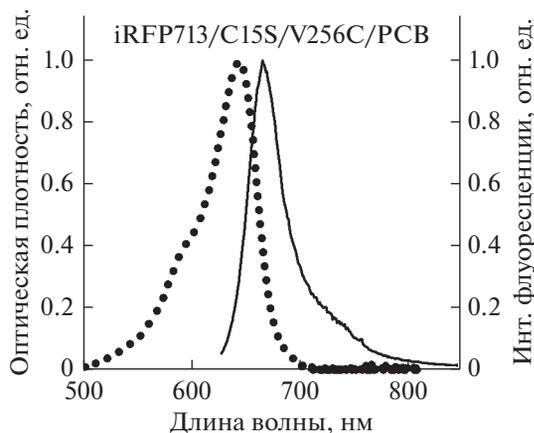
**Рис. 1.** Спектральные свойства биомаркеров: iRFP713/T204A (верхний ряд), iRFP713/C15S/V256C/T204A в комплексе с BV (средний ряд) и iRFP713/PCB (нижний ряд). а – Спектры поглощения (точечные линии) и флуоресценции (сплошные линии) хромофора белка в отсутствие денатуранта ( $\lambda_{\text{возб}} = 600\text{--}620\text{ нм}$ ). б – Изменение спектров поглощения хромофора биомаркера в присутствии денатуранта; измерение проводили после инкубации белка в растворе GdnHCl различной концентрации (указана цветом кривых) в течение 24 ч. в – Изменение оптической плотности хромофора и структуры биомаркера при его разворачивании под действием GdnHCl; показаны зависимости оптической плотности раствора белка, измеренной в максимуме и на длинноволновом краю спектра поглощения хромофора, и зависимости доли белка в нативном состоянии ( $\alpha_N$ , символы серого цвета) от концентрации денатуранта. За единицу принято значение оптической плотности (OD) при соответствующей длине волны нативного белка.

ствуем о том, что в этих условиях происходит разрушение комплекса между iRFP713 и PCB, который ковалентно связан с Cys15. Эти данные указывают на наличие двух видов хромофора в составе iRFP713/PCB. Таким образом, замена хромофора с BV на PCB в iRFP713 приводит к усилению аллостерического ингибирования связывания хромофора.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящей работы указывают на то, что изменение внутримолекулярных связей между хромофором и остатками его микроокружения в биомаркерах, происходящее при замене хромофора или в результате аминокислотных замен, могут приводить к усилению или ослаблению аллостерическо-

го ингибирования ковалентного связывания хромофора с белком. В результате взаимного влияния мономеров в NIR-биомаркере могут образовываться димеры, содержащие в одном мономере белка хромофор, который ковалентно присоединен к остатку цистеина, и во втором мономере белка хромофор, который только встроен в хромофор-связывающий карман. Ранее было обнаружено образование ассиметричных комплексов полноразмерных фитохромов, в которых отдельные мономеры белка имеют различную структуру и отличаются конформацией лиганда (Tagutina et al., 2006; Yang et al., 2007; Essen et al., 2008; Rottwinkel et al., 2010; Burgie et al., 2017; Buhre et al., 2018; Gourinchas et al., 2018; Gourinchas et al., 2019). Взаимное влияние мономеров в полноразмерных фито-



**Рис. 2.** Спектры поглощения и флуоресценции РСВ в биомаркере iRFP713/C15S/V256C. Длина волны возбуждения – 620 нм.

хромах может являться частью многоуровневой регуляции их активности.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-01515-а).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют, что в проведенных экспериментах люди или животные в качестве объектов не участвовали.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Auldridge M.E., Satyshur K.A., Anstrom D.M., Forest K.T.* 2012. Structure-guided engineering enhances a phytochrome-based infrared fluorescent protein. *J. Biol. Chem.* V. 287. P. 7000.
- Bhattacharya S., Auldridge M. E., Lehtivuori H., Ihalainen J. A., Forest K. T.* 2014. Origins of fluorescence in evolved bacteriophytochromes. *J. Biol. Chem.* V. 289. P. 32144.
- Buhrke D., Kuhlmann U., Michael N., Hildebrandt P.* 2018. The photoconversion of phytochrome includes an unproductive shunt reaction pathway. *Chemphyschem.* V. 19. P. 566.
- Buhrke D., Velazquez Escobar F., Sauthof L., Wilkening S., Herder N., Tavraz N.N., Willoweit M., Keidel A., Utesch T., Mroginski M.A., Schmitt F.J., Hildebrandt P., Friedrich T.* 2016. The role of local and remote amino acid substitutions for optimizing fluorescence in bacteriophytochromes: A case study on iRFP. *Sci Rep.* V. 6. P. 28444.
- Burgie E.S., Bussell A.N., Lye S.H., Wang T., Hu W., McLoughlin K.E., Weber E.L., Li H., Vierstra R.D.* 2017. Photosensing and thermosensing by phytochrome b require both proximal and distal allosteric features within the dimeric photoreceptor. *Sci Rep.* V. 7. P. 13648.
- Burgie E.S., Zhang J., Vierstra R.D.* 2016. Crystal structure of deinococcus phytochrome in the photoactivated state reveals a cascade of structural rearrangements during photoconversion. *Structure.* V. 24. P. 448.
- Essen L.O., Mailliet J., Hughes J.* 2008. The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 105. P. 14709.
- Filonov G.S., Piatkevich K.D., Ting L.M., Zhang J., Kim K., Verkhusha V.V.* 2011. Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* V. 29. P. 757.
- Fonin A.V., Sulatskaya A.I., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K.* 2014. Fluorescence of dyes in solutions with high absorbance. Inner filter effect correction. *PLoS One.* V. 9. P. e103878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103878>
- Frankenberg N.F., Lagarias J.C.* 2003. Biosynthesis and biological function of bilins. In: *The porphyrin handbook. Chlorophylls and bilins: biosynthesis structure and degradation.* N.Y.: Academic Press. V. 13. P. 211.
- Glazer A.N., Fang S.* 1973. Chromophore content of blue-green algal phycobiliproteins. *J. Biol. Chem.* V. 248. P. 659.
- Gourinchas G., Ettl S., Winkler A.* 2019. Bacteriophytochromes – from informative model systems of phytochrome function to powerful tools in cell biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* V. 57. P. 72.
- Gourinchas G., Heintz U., Winkler A.* 2018. Asymmetric activation mechanism of a homodimeric red light-regulated photoreceptor. *Elife.* V. 7. P. 1.
- Hahn J., Strauss H.M., Landgraf F.T., Gimenez H.F., Lochnit G., Schmieder P., Hughes J.* 2006. Probing protein-chromophore interactions in Cph1 phytochrome by mutagenesis. *FEBS J.* V. 273. P. 1415.
- Rockwell N.C., Martin S.S., Li F.W., Mathews S., Lagarias J.C.* 2017. The phycocyanobilin chromophore of streptophyte algal phytochromes is synthesized by HY2. *New Phytol.* V. 214. P. 1145.
- Rodriguez E.A., Campbell R.E., Lin J.Y., Lin M.Z., Miyawaki A., Palmer A.E., Shu X., Zhang J., Tsien R.Y.* 2017. The growing and glowing toolbox of fluorescent and photoactive proteins. *Trends Biochem. Sci.* V. 42. P. 111.
- Rottwinkel G., Oberpichler I., Lamparter T.* 2010. Bathy phytochromes in rhizobial soil bacteria. *J. Bacteriol.* V. 192. P. 5124.
- Stepanenko O.V., Balaban M., Bublikov G.S., Shcherbakova D.M., Stepanenko O.V., Turoverov K.K., Kuznetsova I.M., Verkhusha V.V.* 2016. Allosteric effects of chromophore interaction with dimeric near-infrared fluorescent proteins engineered from bacterial phytochromes. *Sci. Rep.* V. 6. P. 18750. <https://doi.org/10.1038/srep18750>
- Stepanenko O.V., Stepanenko O.V., Kuznetsova I.M., Shcherbakova D.M., Verkhusha V.V., Turoverov K.K.* 2017. Interaction of biliverdin chromophore with near-infrared fluorescent protein bphp1-fp engineered from bacterial phytochrome. *Int. J. Mol. Sci.* V. 18. P. 1009.
- Stepanenko O.V., Stepanenko O.V., Shpironok O.G., Fonin A.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K.* 2019. Near-infrared markers based on bacterial phytochromes with phycocyanobilin as a chromophore. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 6067.
- Stepanenko O.V., Stepanenko O.V., Turoverov K.K., Kuznetsova I.M.* 2020. Probing the allostery in dimeric near-infrared bio-

- markers derived from the bacterial phytochromes: The impact of the T204A substitution on the inter-monomer interaction. *Int. J. Biol. Macromol.* V. 162. P. 894.
- Takala H., Bjorling A., Berntsson O., Lehtivuori H., Niebling S., Hoernke M., Kosheleva I., Henning R., Menzel A., Ihalainen J.A., Westenhoff S.* 2014. Signal amplification and transduction in phytochrome photosensors. *Nature.* V. 509. P. 245.
- Tarutina M., Ryjenkov D.A., Gomelsky M.* 2006. An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J. Biol. Chem.* V. 281. P. 34751.
- Toh K.C., Stojkovic E.A., van Stokkum I.H., Moffat K., Kennis J.T.* 2011. Fluorescence quantum yield and photochemistry of bacteriophytochrome constructs. *Phys. Chem. Chem. Phys.* V. 13. P. 11985.
- Velazquez Escobar F., Hildebrandt T., Utesch T., Schmitt F.J., Seuffert I., Michael N., Schulz C., Mroginski M.A., Friedrich T., Hildebrandt P.* 2014. Structural parameters controlling the fluorescence properties of phytochromes. *Biochemistry.* V. 539. P. 20.
- Von Horsten S., Strass S., Hellwig N., Gruth V., Klasen R., Mielcarek A., Linne U., Morgner N., Essen L.O.* 2016. Mapping light-driven conformational changes within the photosensory module of plant phytochrome B. *Sci. Rep.* V. 6. P. 34366.  
<https://doi.org/10.1038/srep34366>
- Yang X., Stojkovic E. A., Kuk J., Moffat K.* 2007. Crystal structure of the chromophore binding domain of an unusual bacteriophytochrome, RpBphP3, reveals residues that modulate photoconversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 104. P. 1257.

## Interaction of Monomers in Near-Infrared Fluorescent Biomarkers

O. V. Stepanenko<sup>a, \*</sup> and O. V. Stepanenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia*

*\*e-mail: sov@incras.ru*

Here, we analyze how the inter-monomeric interaction in the near-infrared fluorescent biomarkers iRFP713 and iRFP713/C15S/V256C is affected by the rearrangement of the hydrogen bond network between the chromophore and the adjacent amino acids and bound water molecules as result of amino acid substitution of threonine at position 204 for alanine (T204A) in its local environment or replacement of natural ligand biliverdin with phycocyanobilin. Previously found allosteric inhibition of covalent binding of the biliverdin to a monomer of iRFP713/C15S/V256C after covalent binding of the chromophore to another monomer is markedly reduced in the protein with T204A substitution. There is no allosteric inhibition of covalent binding of phycocyanobilin to iRFP713/C15S/V256C, in contrast to the binding of biliverdin to this protein. Contrary, the replacement of biliverdin with phycocyanobilin in iRFP713 leads to increased allosteric inhibition of covalent chromophore binding. Our studies indicate that the change in the intramolecular contacts involving the chromophore and its protein environment in biomarkers caused by chromophore replacement or amino acid substitutions influences allosteric communication between monomers the biomarker.

**Keywords:** bacterial phytochromes, fluorescent biomarkers, allosteric interaction

## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ ЗА 2020 ГОД, ТОМ 62

### ОБЗОРЫ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

**Александров В.Н., Соколова М.О., Комаров А.В., Михайлова Е.В., Кокорина А.А., Кривенцов А.В.** Клеточные технологии для регенерации хрящевой ткани. № 3. С. 160–172.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120030025>

**Бобков Д.Е., Полянская Г.Г.** Клеточные и молекулярные характеристики репликативного старения мезенхимных стволовых клеток человек. № 11. С. 782–792. <https://doi.org/10.31857/S0041377120110036>

**Добрынин М.А., Енукашвили Н.И.** Зародышевые гранулы в оогенезе животных. № 12. С. 851–000. <https://doi.org/10.31857/S0041377120120020>

**Домнина А.П., Петросян М.А.** Клеточный состав культур, получаемых из ткани эндометрия. № 4. С. 231–237.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120040033>

**Дробинцева А.О., Аверкиева А.С., Петросян М.А., Домнина А.П., Кветной И.М., Полякова В.О.** 3D-культуры клеток эндометрия: возможности и перспективы применения. № 8. С. 535–541. <https://doi.org/10.31857/S0041377120080027>

**Летуновская А.В., Олейников Д.А., Порембская О.Я., Торопова Я.Г.** Роль экстрацеллюлярного матрикса в патогенезе опухолей молочной железы. № 2. С. 98–111. <https://doi.org/10.31857/S0041377120020029>

**Марусова Т.А., Иготти М.В.** Метаболизм глюкозы раковых клеток как мишень в противоопухолевой терапии. № 11. С. 773–781.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120110061>

**Матвеева Д.К., Андреева Е.Р.** Регуляторная активность децеллюляризованного матрикса мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. № 10. С. 699–715.

<https://doi.org/10.31857/S004137712010003X>

**Моршнева А.В.** Транскрипционные факторы FoxO как многофункциональные регуляторы клеточных процессов № 10. С. 687–696. <https://doi.org/10.31857/S0041377120100041>

**Нашекина Ю.А., Луконина О.А., Михайлова Н.А.** Химические сшивающие агенты для коллагена: механизмы взаимодействия и перспективность для регенеративной медицины. № 7. С. 459–472. <https://doi.org/10.31857/S0041377120070044>

**Поздняков Д.Ю., Шувалов О.Ю., Барлев Н.А., Миттенберг А.Г.** Транскрипционный фактор Zeb1: посттранскрипционная регуляция его активности в карциномах молочной железы человека. № 1. С. 3–15. <https://doi.org/10.31857/S0041377120010071>

**Семенова Е.В., Варфоломеева Е.Ю., Филатов М.В.** Эпигенетическая регуляция – важнейший элемент системы контроля стохастической экспрессии генов. № 2. С. 79–97.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120020054>

**Семенова С.Б.** Принципы формирования кальциевого сигнала в клетках эукариот. № 9. С. 701–712. <https://doi.org/10.31857/S0041377120090047>

**Сутула Г.И., Воробьев М.Л., Суворова И.И.** Роль p53-зависимой аутофагии в регуляции поведения плюрипотентных клеток. № 3. С. 151–159. <https://doi.org/10.31857/S0041377120030074>

**Чихиржина Е.В., Поляничко А.М., Старкова Т.Ю.** Внеядерные функции негистонового белка HMGBl. № 10. С. 716–725.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120100016>

**Чубарь А.В., Енукашвили Н.И.** Мезенхимные стромальные клетки: роль в формировании гематоонкологической ниши. № 11. С. 763–772. <https://doi.org/10.31857/S0041377120110024>

**Шилина М.А., Гринчук Т.М.** Хромотрипсис – форма реорганизации клеточного генома. № 12. С. 839–850.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120120068>

**Шмакова А.А., Рубина К.А., Ткачук В.А., Семина Е.В.** Рецептор урокиназы: от регуляции протеолиза до направленного роста аксонов и регенерации нервов. Механизмы взаимодействия с мембранными лигандами и внутриклеточная сигнализация. № 6. С. 385–395. <https://doi.org/10.31857/S0041377120060097>

**Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Норкин И.К., Иванов П.А., Хлусов И.А., Шунькин Е.О., Мелашенко Е.С., Литвинова Л.С.** Клеточно-молекулярные аспекты воспаления, ангиогенеза и остеогенеза. Краткий обзор. № 5. С. 305–315.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120050090>

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**Александрова С.А., Нашекина Ю.А., Надеждин С.В., Васильев С.А., Савченко Р.Р., Покровская Л.А., Блинова М.И., Михайлова Н.А., Хотин М.Г.** Остеоиндуктивные свойства секрета мезенхимных стволовых клеток человека, полученного с использованием системы для автоматического культивирования клеток. № 4. С. 238–249.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120040021>

**Бахмет Е.И., Пономарцев С.В., Дыбан П.А., Назаров И.Б., Кузьмин А.А., Аксёнов Н.Д., Потапенко Е.В., Гордеев М.Н., Томилин А.Н.** Получение и характери-

стика эмбриональных стволовых клеток мыши с нокаутом по Pcbp1. № 6. С. 396–402.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120060024>

**Билтуева Л.С., Перельман П.Л., Проскурякова А.А., Лемская Н.А., Сердюкова Н.А., Графодатский А.С.** Хромосомы индийского мунтжака (*Muntiacus muntjak*). Возвращение. № 5. С. 316–321.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120050016>

**Вашкевич Е.П., Мигас А.А., Мелешко А.Н., Матвеенко М.А., Струшкевич Н.В., Шман Т.В.** Экспансия и активация естественных киллерных клеток человека *ex vivo* в присутствии трансгенных фидерных клеточных линий. № 4. С. 258–265.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120040070>

**Веряскина Ю.А., Титов С.Е., Агакишиев М.М., Забела А.В., Селиванов В.С., Мелихов С.П., Ковышев И.Б., Поспелова Т.И., Жимулёв И.Ф.** Профилирование экспрессии микроРНК в клетках острого промиелоцитарного лейкоза при различном кариотипе. № 4. С. 250–257.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120050077>

**Ветровой О.В., Нирицкий П.П., Тюлькова Е.И., Рыбникова Е.А.** Транскрипционный фактор NIF1 негативно регулирует содержание глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клетках НЕК293Т. № 9. С. 744–751.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120090084>

**Ветровой О.В., Тюлькова Е.И., Стратилев В.А., Ватаева Л.А.** Пренатальное введение дексаметазона вызывает нарушение глюкокортикоидной обратной связи, ассоциированное с изменением количества кортикостероидных рецепторов в экстрагипоталамических структурах мозга взрослых крыс. № 7. С. 511–521.  
<https://doi.org/10.31857/S004137712007007X>

**Воронкина И.В., Смагина Л.В., Бильдюг Н.Б., Мусорина А.С., Полянская Г.Г.** Динамика активности матриксных металлопротеиназ и содержания белков внеклеточного матрикса в процессе репликативного старения линий мезенхимных стволовых клеток человека. № 3. С. 210–219.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120030086>

**Гнедина О.О., Иготти М.В.** Влияние бутирата натрия на пролиферативные сигнальные каскады в клетках, чувствительных и устойчивых к ингибиторам гистоновых деацетилаз. № 11. С. 803–814.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120110048>

**Гринчук Т.М., Шилина М.А., Алексеенко Л.Л., Иванова В.П.** Кратковременное воздействие полиаллиламина на клетки китайского хомячка линии RJK с множественной лекарственной устойчивостью ведет к дестабилизации структуры их кариотипа. № 6. С. 446–454.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120060048>

**Гусельникова В.В., Суфиева Д.А., Коржевский Д.Э.** Нуклеофосмин, коилин и аргентофильные (Ag-NOR) белки нейронов черного вещества головного

мозга человека. № 3. С. 201–209.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120030104>

**Дьяконов Е.Е., Пономарцев С.В., Зюбко Т.И., Томилин А.Н., Цимоха А.С.** Действие экзогенных 20S-протеасом на продолжительность жизни мышей с меланомой. № 6. С. 403–409.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120060036>

**Ефимова С.С., Остроумова О.С.** Разупорядочивающее действие растительных метаболитов на модельные липидные мембраны различной толщины. № 4. С. 293–302.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120040045>

**Зачепило Т.Г., Лопатина Н.Г.** Метилирование гистона H3 по лизину 4 в нейронах грибовидных тел мозга медоносной пчелы при формировании памяти. № 1. С. 32–37.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120010113>

**Землянских Н.Г.** Регуляция асимметричного распределения липидов в мембране эритроцитов человека в присутствии глицерина и полиэтиленгликоля. № 2. С. 112–120.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120020078>

**Иванов А.Н., Чибрикова Ю.А., Савельева М.С., Рогожина А.С., Норкин И.А.** Оценка биосовместимости поликапролактоновых скаффолдов, обеспечивающих адресную доставку щелочной фосфатазы. № 12. С. 903–912.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120120032>

**Каменцева Р.С., Истомина М.В., Харченко М.В., Корнилова Е.С.** ЭФР вызывает уменьшение количества CD146 в МСК эндометрия человека, не связанное с влиянием на его интернализацию. № 7. С. 487–492.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120070020>

**Кевер Л.В., Семенова С.Б.** Роль холестерина в мембранной локализации кальциевых каналов TRPV5 в Т-клетках человека линии Jurkat. № 3. С. 173–180.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120030037>

**Кириченко Е.Ю., Логвинов А.К., Филиппова С.Ю., Арефьев Р.А., Семьнина В.Г., Лысенко Л.В.** Особенности строения нейро-глио-сосудистых ансамблей в гломерулах обонятельной луковицы крысы. № 4. С. 278–285.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120040057>

**Кольцова А.М., Зенин В.В., Петросян М.А., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.** Получение и характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из разных областей плаценты одного донора. № 9. С. 713–727.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120090035>

**Кочеткова Е.Ю., Блинова Г.И., Бойцов А.С., Поспелов В.А., Поспелова Т.В.** Зависимость жизнеспособности gas-экспрессирующих клеток от повреждения митохондрий, вызванного действием противоопухолевых агентов. № 5. С. 322–332.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120050041>

- Литвинов И.К., Беляева Т.Н., Леонтьева Е.А., Орлова А.О., Корнилова Е.С.** Изменение характеристик флуоресценции квантовых точек на основе InP/ZnS при взаимодействии с клетками. № 6. С. 437–445. <https://doi.org/10.31857/S004137712006005X>
- Литвинова Л.С., Мелашенко Е.С., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Тодосенко Н.М., Хлусов И.А.** Морфофункциональная реакция Т-лимфоцитов при *in vitro* контакте с кальцийфосфатным покрытием в присутствии Т-клеточного активатора. № 8. С. 556–565. <https://doi.org/10.31857/S0041377120080039>
- Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И.** Производное пиразола подавляет депозависимый вход Ca<sup>2+</sup> в перитонеальные макрофаги крысы. № 11. С. 829–836. <https://doi.org/10.31857/S0041377120110073>
- Миль Е.М., Бинюков В.И., Ерохин В.Н., Албантова А.А., Володькин А.А., Голощапов А.Н.** Экспозиция фосфатидилсерина в клетках карциномы Льюис под действием анфена натрия и пероксида водорода. № 7. С. 503–510. <https://doi.org/10.31857/S0041377120070032>
- Мильто И.В., Шевцова Н.М., Иванова В.В., Серебрякова О.Н., Тахауов Р.М., Суходоло И.В.** Гемопоэтические клетки костного мозга крыс после внутривенного введения модифицированных хитозаном наночастиц магнетита. № 6. С. 418–427. <https://doi.org/10.31857/S0041377120060061>
- Моргун А.В., Осипова Е.Д., Бойцова Е.Б., Лопатина О.Л., Горина Я.В., Пожиленкова Е.А., Салмина А.Б.** Васкулярный компонент нейровоспаления при экспериментальной болезни Альцгеймера у мышей. № 1. С. 16–23. <https://doi.org/10.31857/S0041377120010058>
- Никитина М.Ю., Пономарева А.А., Даминова А.Г., Невзорова Т.А., Тараканчикова Я.В., Аточина–Васерман Е.Н., Литвинов Р.И.** Жизнеспособность, ультраструктура и миграционная активность нейтрофилов после фагоцитоза синтетических микрокапсул. № 2. С. 129–140. <https://doi.org/10.31857/S0041377120020030>
- Николаева Е.Д., Дубовцева И.Ю., Белоногов Р.Н., Наркевич А.Н., Мошев А.В., Савченко А.А., Рукша Т.Г.** Вемурафениб индуцирует повышение уровня дормантных (Ki-67-негативных) клеток при BRAF-негативном статусе меланомы. № 11. С. 793–802. <https://doi.org/10.31857/S0041377120110085>
- Нуруллин Л.Ф., Волков Е.М.** Иммунофлуоресцентная идентификация изоформ субъединицы  $\alpha 1$  потенциал-зависимых Ca<sup>2+</sup>-каналов семейств CaV1, CaV2 и CaV3 в зонах холинергических синапсов соматической мускулатуры дождевого червя *Lumbricus terrestris*. № 2. С. 141–148. <https://doi.org/10.31857/S0041377120020042>
- Нуруллин Л.Ф., Волков Е.М.** Ca<sup>2+</sup>-проводящие канонические TRP-каналы в мышечных волокнах m. LAL мыши. № 8. С. 591–600. <https://doi.org/10.31857/S0041377120080040>
- Пиневиц А.А., Вартанян Н.Л., Терехина Л.А., Крутецкая И.Ю., Шашкова О.А., Смирнов И.В., Самойлович М.П.** Экспрессия и обновление эндоглина на мембране мезенхимных стволовых клеток и клеток эндотелия. № 8. С. 542–555. <https://doi.org/10.31857/S0041377120080052>
- Поздина В.А., Данилова И.Г., Абидов М.Т.** Иммунофенотипические особенности макрофагов печени и перитонеальной области животных с моделью сахарного диабета I типа и их коррекция аминодигидрофталазиндионом натрия *in vitro*. № 8. С. 581–590. <https://doi.org/10.31857/S0041377120080064>
- Попов Г.И., Попрядухин П.В., Юкина Г.Ю., Сухорукова Е.Г., Ивановка Е.М., Вавилов В.Н., Юдин В.Е.** Морфологическое исследование биорезорбируемой трубчатой матрицы малого диаметра из поли(L-лактида) для тканеинженерного сосудистого импланта. № 1. С. 38–46. <https://doi.org/10.31857/S004137712001006X>
- Попрядухин П.В., Сударева Н.Н., Суворова О.М., Юкина Г.Ю., Сухорукова Е.Г., Сапрыкина Н.Н.** Морфология компонентов систем адресной доставки лекарственных препаратов (пористых ватеритов CaCO<sub>3</sub>) в мышечной ткани крыс. № 8. С. 738–744. <https://doi.org/10.31857/S0041377120100053>
- Разенкова В.А., Коржевский Д.Э.** ГАМК-ергические аксосоматические синапсы нейронов коры головного мозга крысы. № 11. С. 815–821. <https://doi.org/10.31857/S0041377120110097>
- Рябов В.М., Верещагина Н.А., Петров Н.С., Литвинова М.В., Попов Б.В.** Регуляция экспрессии гена *PPARgamma2* белками семейств P $\sigma$ G и pRb в ходе жировой дифференцировки мезенхимных стволовых клеток. № 12. С. 867–879. <https://doi.org/10.31857/S0041377120120044>
- Рябов В.М., Петрова Е.Н., Попов Б.В.** Изменения уровня деубиквитиназы Usp28 в клеточном цикле клеток аденокарциномы кишечника НСТ116 свидетельствуют о ее функциональной роли в регуляции перехода G1/S. № 3. С. 181–188. <https://doi.org/10.31857/S0041377120030050>
- Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В., Балкан Э., Полевщиков А.В.** Опыт применения лектинов для оценки изменений состава углеводов поверхностного аппарата тимоцитов мыши на ранних и поздних стадиях апоптоза. № 9. С. 752–761. <https://doi.org/10.31857/S0041377120090059>
- Ситковская А.О., Златник Е.Ю., Шамова Т.В., Бондаренко Е.С., Новикова И.А., Вашенко Л.Н., Кечеджиева Э.Э., Дашкова И.Р., Аушева Т.В., Кит О.И.** Генерация лифокин-активированных киллеров на фоне сниженного содержания Т-регуляторных кле-

- ток *in vitro*. № 10. С. 726–737.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120100065>
- Ситковская А.О., Филиппова С.Ю., Златник Е.Ю., Колпаков С.А., Колпакова Е.П., Межевова И.В., Бондаренко Е.С., Игнатов С.Н., Новикова И.А., Росторгуев Э.Е., Кит О.И.** Цитотоксическое действие неклассифицированных ротавирусов группы К на культуры клеток T98G и U87MG *in vitro*. № 3. С. 189–200. <https://doi.org/10.31857/S0041377120030062>
- Скоркина М.Ю., Шевченко Т.С., Сладкова Е.А., Закиро Л.Р.** Функциональные свойства клеточной поверхности гранулоцитов при моделировании активации элементов пуринаргической сигнальной системы. № 5. С. 333–339.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120050053>
- Соколова И.Б., Павличенко Н.Н.** Эффективность применения мезенхимных стволовых клеток для улучшения микроциркуляции в коре головного мозга нефрэктомизированных крыс. № 6. С. 410–417.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120060103>
- Соколова И.Б., Павличенко Н.Н.** Влияние мезенхимных стволовых клеток на реактивность гладкомышечных клеток пиальных артерий у нефрэктомизированных крыс. № 10. С. 745–752.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120100077>
- Соловьёва А.М., Александрова С.А.** Оценка показаний автоматизированного счетчика клеток. № 7. С. 522–532.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120070056>
- Старинец А.А., Егорова Е.Л., Тыртышная А.А., Дюйзен И.В., Барышев А.Н., Манжуло И.В.** Активность микро- и астроглии в вентро-латеральном ядре спинного мозга после повреждения седалищного нерва крыс. № 1. С. 24–31.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120010095>
- Сухарева К.С., Смолина Н.А., Князева А.А., Калугина К.К., Худяков А.А., Костарева А.А.** Влияние мутации L345P в гене десмина на процесс аутофагии в мышечных клетках линии C2C12. № 7. С. 493–502.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120070081>
- Таскаева Ю.С., Гогаева И.С., Бгатова Н.П.** Апоптоз клеток гепатоцеллюлярной карциномы-29 после введения карбоната лития *in vitro*. № 4. С. 286–292. <https://doi.org/10.31857/S0041377120040069>
- Терюкова Н.П., Андреев Г.В., Воронкина И.В., Сахенберг Е.И., Снопов С.А.** Асцитная гепатома Зайдела как континуум для опухолевых клеток в транзитном состоянии. № 7. С. 473–486.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120070068>
- Турищева Е.П., Вильданова М.С., Поташникова Д.М., Смирнова Е.А.** Различная реакция биосинтетической системы дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы человека на действие растительных гормонов. № 8. С. 566.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120080088>
- Федюнин В.А., Поромов А.А., Смуров А.В.** Влияние ионов меди на клеточные элементы целомической жидкости морских звезд *Asterias rubens L.* № 1. С. 47–55.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120010046>
- Филимонова А.Н., Толкаева М.С., Евстратова Е.С., Петин В.Г.** Синергизм одновременного действия тяжелого металла в разной концентрации и ионизирующего излучения (или гипертермии) на выживаемость дрожжевых клеток. № 5. С. 367–374.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120050028>
- Харченко М.В., Злобина М.В., Каменцева Р.С., Корнилова Е.С.** Микротрубочки и актиновые филаменты участвуют в обеспечении слияний и разделений везикул на эндоцитозном пути ЭФР-рецепторных комплексов. № 5. С. 356–366.  
<https://doi.org/10.31857/S004137712005003X>
- Хожай Л.И.** Экспрессия парвальбумина и  $\beta$ -III-тубулина в клетках субвентрикулярной зоны в неонатальный период у крыс. № 11. С. 822–828.  
<https://doi.org/10.31857/S004137712011005X>
- Цапина О.А.** Перераспределение рецептора ЭФР и интегринов  $\alpha 5$  и  $\beta 1$  в клетках эпителия в ответ на заражение бактериями *Serratia proteamaculans*. № 5. С. 349–355.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120050065>
- Чапленко А.А., Меркулова О.В., Семенова И.С., Сайфутдинова А.Р., Мельникова Е.В., Меркулов В.А.** Детекция микоплазм в клеточных линиях эукариот методом ПЦР в реальном времени с использованием различных способов концентрирования образца. № 1. С. 56–63.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120010034>
- Чубинский-Надеждин В.И., Шилина М.А., Сударикова А.В., Люблинская О.Г., Негуляев Ю.А., Морачевская Е.А.** Зависимость присутствия кластеризованного ганглиозида GM1 в мембране эндометриальных мезенхимных стволовых клеток от фазы клеточного цикла. № 10. С. 753–760.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120100028>
- Чурилова А.В., Зачепило Т.Г., Зенько М.Ю.** Влияние тяжелой гипобарической гипоксии на содержание маркера аутофагии LC3 в гиппокампе крыс. № 9. С. 762–768.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120090023>
- Шаповал Н.С., Малиновская Н.А., Моргун А.В., Салмина А.Б., Оболенская О.Н., Медведева Н.А., Медведев О.С.** Влияние убихинола на состояние церебральных эндотелиоцитов в различных структурах головного мозга крыс. № 12. С. 894–902.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120120056>
- Шаповал Н.С., Медведев О.С., Медведева Н.А., Моргун А.В., Бойцова Е.Б., Осипова Е.Д., Салмина А.Б.** Влияние окисленной и восстановленной форм коэнзима Q10 (убихинона и убихинола) на клетки церебрального эпителия в модели гематоэнцефалического барьера. № 6. С. 428–436.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120060085>

**Шафеи Е.В., Ржанова Л.А., Новикова Ю.П., Куринов А.М., Григорян Э.Н., Александрова М.А., Кузнецова А.В.** Ответ клеток ретикулярного пигментного эпителия человека на воздействие кондиционированных сред регенератов сетчатки тритона. № 9. С. 728–743.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120090060>

**Шекунев Е.В., Юрченко К.С., Шестопалов А.М.** Цитотоксическое действие природного штамма вируса болезни Ньюкасла на опухолевые клетки в условиях *in vitro*. № 2. С. 121–128.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120020066>

**Шолан Р.Ф.** Клеточные элементы собственной пластинки слизистой оболочки мочевого пузыря в экспериментальных моделях интерстициального цистита (синдрома болезненного мочевого пузыря). № 9. С. 769–774.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120090072>

**Шутский Н.А., Шагров Л.Л., Кашутин С.Л., Малавская С.И.** Содержание коллагена дермы и факторов роста сыворотки крови у крыс после локального холодового повреждения. № 8. С. 601–608.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120080076>

**Юдинцева Н.А., Нащекина Ю.А., Шевцов М.А., Михайлова Н.А., Виноградова Т.И., Горелова А.А., Самусенко И.А., Муравьев А.Н.** Использование тканеинженерной конструкции, заселенной клетками буккального эпителия, для заместительной уретропластики. № 4. С. 266–277.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120040082>

**Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С.** Роль  $\gamma$ -цитокинов (И-2, И-7 и И-15) в регуляции клеточной гибели Т-лимфоцитов памяти, индуцированной активацией. № 5. С. 340–348.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120050107>

**Ярцева Н.М., Шитикова Ж.В., Быкова Т.В., Зубова С.Г., Кочетков Е.Ю., Поспелов В.А., Поспелова Т.В.** Изменения кариотипа устойчивых к апоптозу клеток крысы линии HindIII при длительном культивировании после действия ионизирующего облучения. № 12. С. 880–893.

<https://doi.org/10.31857/S004137712012007X>

**Яценко А.А., Кушнарв В.А., Устинов Е.М., Леонов Д.В., Кислицкий В.М., Целуйко С.С., Артемьева А.С.** Культивирование клеток меланомы *in vitro* на 3D-скаффолде, приготовленном на основе желатина. № 5. С. 375–382.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120050089>

#### ПИСЬМА В РЕДАКЦИЮ

**Жарков Н.А.** О неизвестных механизмах мейотического деления клеток у *Triticum aestivum* L.

#### ПОТЕРИ НАУКИ

**Никольский Н.Н., Боголюбов Д.С., Борхсениус С.Н., Вишняков И.Е., Скарлато С.О., Снигиревская Е.С.** Па-

мяти Якова Юрьевича Комиссарчика (1927–2019). № 3. С. 225–228.

**Никольский Н.Н., Михельсон В.М., Жеваго Н.А.** Памяти Киры Александровны Самойловой (1935–2019). № 6. С. 455–456.

#### INDEX OF AUTHORS 2020

#### REVIEWS

**Aleksandrov V.N., Sokolova M.O., Komarov A.V., Mikhailova E.V., Kokorina A.A., Kriventsov A.V.** Cell technologies in cartilage regeneration. № 3. P. 160–172.

**Bobkov D.E., Poljanskaya G.G.** Cellular and molecular characteristics of replicative senescence of human mesenchymal stem cells. № 11. P. 782–792.

**Chikhirzhina E.V., Polyanichko A.M., Starkova T.Yu.** Extranuclear functions of nonhistone protein HMGB1. № 10. P. 716–725.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120100016>

**Chubar A.V., Eukashvily N.I.** Mesenchymal stromal cells: role in the formation of hematological niche. № 11. P. 763–772.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120120068>

**Dobrynin M.A., Eukashvily N.E.** Germ granules in animal oogenesis. № 12. P. 851–866.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120120020>

**Domnina A.P., Petrosyan M.A.** Cellular composition of cultures derived from endometrial tissue № 4. P. 231–237.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120040033>

**Drobintseva A.O., Averkieva A.S., Petrosyan M.A., Domnina A.P., Kvetnoy I.M., Polyakova V.O.** 3D cultures of endometrial cells: Opportunities and prospects. № 7. P. 535–541.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120080027>

**Letunovskaja A.V., Oleinikov D.A., Porembskaya O.Y., Toropova Ya.G.** The role of the extracellular matrix in breast cancer pathogenesis. № 2. P. 98–111.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120020029>

**Marusova T.A., Igotti M.V.** Glucose metabolism of cancer cell as a target in antitumor therapy. № 11. P. 773–781.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120110061>

**Matveeva D.K., Andreeva E.R.** Regulatory activity of decellularized matrix of multipotent mesenchymal stromal cells. № 10. P. 699715.

<https://doi.org/10.31857/S004137712010003X>

**Morshneva A.V.** FoxO transcription factors as multifunctional cell regulators. № 10. P. 687–698.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120100041>

**Nashchekina Yu.A., Lukonina O.A., Mikhailova N.A.** Chemical cross-linking agents for collagen: interaction mechanisms and perspectives for regenerative medicine. № 7. P. 459–472.

<https://doi.org/10.31857/S0041377120070044>

**Pozdnyakov D.Y., Shuvalov O.Y., Barlev N.A., Mittenberg A.G.** Transcription factor Zeb1 and post-transcriptional regulation of its activity in human breast carcinoma. № 1. P. 3–15.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120010071>

**Semenova E.V., Varfolomeeva E.Yu., Filatov M.V.** Epigenetic regulation is prime element in the control over stochastic gene expression. № 2. P. 79–97.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120020054>

**Semenova S.B.** The principles of organization of calcium signal in eukaryotic cells. № 9. P. 701–712.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120090047>

**Shilina M.A., Grinchuk T.M.** Chromothripsis as a form of cell genome reorganization. № 12. P. 839–850.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120120068>

**Shmakova A.A., Rubina K.A., Tkachuk V.A., Semina E.V.** Urokinase receptor: from regulation of proteolysis to directed axon growth and nerve regeneration. Mechanisms of interaction with membrane ligands and intracellular signaling. № 6. P. 385–395.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120060097>

**Sutula G.I., Vorobev M.L., Suvorova I.I.** The role of p53-dependent autophagy in the regulation of pluripotent cell behavior. № 2. P. 151–159.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120030074>

**Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Shunki E.O., Todosenko N.M., Norkin I.K., Ivanov I.A., Khlusov I.A., Melashchenko E.S., Litvinova L.S.** Cellular-molecular aspects of inflammation, angiogenesis and osteogenesis. A short review. № 5. P. 305–315.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120050090>

#### ORIGINAL ARTICLES

**Aleksandrova S.A., Nashchekina Y.A., Nadezhdin S.V., Vasilyev S.A., Savchenko R.R., Pokrovskaya L.A., Blianova M.I., Mikhailova N.A., Khotin M.G.** Osteoinductive properties of human mesenchymal stem cells secretome obtained by automatic cell cultivation system. № 4. P. 238–249.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120040021>

**Bakhmet E.I., Ponomartsev S.V., Dyban P.A., Nazarov I.B., Kuzmin A.A., Aksenov N.D., Potapenko E.V., Gordeev M.N., Tomilin A.N.** Derivation and characterization of Pcbp1-deficient mouse embryonic stem cells. № 6. P. 396–402.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120060024>

**Biltueva L.S., Perelman P.L., Proskuryakova A.A., Lemskaya N.A., Serdyukova N.A., Graphodatsky A.S.** Chromosomes of the indian muntjac (*Muntiacus muntjak*). Comeback. № 5. P. 316–321.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120050016>

**Chaplenko A.A., Merkulova O.V., Semyonova I.S., Sayfutdinova A.R., Melnikova E.V., Merkulov V.A.** Detection of mycoplasmas in eukaryotic cell lines by real-time PCR using different methods of concentration of the

sample. № 1. P. 56–63.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120010034>

**Chubar A.V., Eukashvily N.I.** Mesenchymal stromal cells: role in the formation of hematocarcinoma niche. № 10. P. 763–772.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120110024>

**Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Shilina M.A., Sudarikova A.V., Lyublinskaya O.G., Negulyaev Yu.A., Morachevskaya E.A.** Presence of clustered GM1 ganglioside in the membrane of endometrial mesenchymal stem cells is dependent on cell cycle stage. № 10. P. 753–760.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120100028>

**Churilova A.V., Zachevilo T.G., Zenko M.Y.** Effect of severe hypobaric hypoxia on the levels of autophagy marker LC3 in the rat hippocampus. № 9. P. 762–768.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120090023>

**Diakonov E.E., Ponomartsev S.V., Zyubko T.I., Tomilin A.N., Tsimokha A.S.** 20S proteasome intratumoral delivery effect on lifespan of melanoma-bearing mice. № 6. P. 403–409.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120060036>

**Efimova S.S., Ostroumova O.S.** The disordering effect of plant metabolites on model lipid membranes of various thickness. № 4. P. 293–302.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120040045>

**Fedyunin V.A., Poromov A.A., Smurov A.V.** 2020. Effect of copper ions on cellular elements of the celomic fluid of starfish *Asterias rubens* L. № 1. P. 47–55.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120010046>

**Filimonova A.N., Tolkayeva M.S., Evstratova E.S., Petin V.G.** Synergism of simultaneous action of heavy metals in various concentration and ionizing radiation (or hyperthermia) on yeast cells survival. № 5. P. 367–374.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120050028>

**Gnedina O.O., Igotti M.V.** The influence of a sodium butyrate on proliferative signaling cascades in sensitive and resistant to HDAC inhibitors action cells. № 10. P. 803–814.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120110048>

**Grinchuk T.M., Shilina M.A., Alekseenko L.L., Ivanova V.P.** A short-time influence of polyallylamine on chinese hamster of RJK line with multiple drug resistance results in the destabilization of the caryotype structure. № 6. P. 446–454.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120060048>

**Guselnikova V.V., Sufieva D.A., Korzhevskii D.E.** Nucleophosmin, coilin, and argentophilic (AgNOR) proteins of the neurons of the human substantia nigra. № 3. P. 201–209.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120030104>

**Ivanov A.N., Chibrikova Yu.A., Savel'yeva M.S., Rogozhina A.S., Norkin I.A.** Biocompatibility assessment of polycaprolactone scaffolds for targeted alkaline phosphatase delivery. № 12. P. 903–912.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120120032>

**Kamentseva R.S., Istomina M.V., Kharchenko M.V., Kornilova E.S.** The decrease of CD146 level in the human

- endometrial MSC under EGF treatment is not related to its internalization. № 7. P. 487–492.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120070020>
- Keвер L.V., Semenova S.B.** Role of cholesterol in membrane localization of TRPV5 calcium channels in human Jurkat T cells. № 3. P. 141–148.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120030037>
- Kharchenko M.V., Zlobina M.V., Kamentseva R.S., Kornilova E.S.** Microtubules and actin filaments are involved in facilitating of fusions and fissions of vesicles of EGF-receptor complexes endocytic pathway. № 5. P. 356–366.  
<https://doi.org/10.31857/S004137712005003X>
- Khozhaі L.I.** Parvalbumin and  $\beta$ -III-tubulin expression in cells of the subventricular zone during the neonatal period of rats. № 11. P. 822–828.  
<https://doi.org/10.31857/S004137712011005X>
- Kirichenko E.Yu., Logvinov A.K., Filippova S.Yu., Arfiev R.A., Semynina V.G., Lysenko L.V.** Structural features of neurogliovascular ensembles in rat olfactory bulb glomeruli. № 4. P. 278–285.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120040057>
- Kochetkova E.Yu., Blinova G.I., Boitsov A.S., Pospelov V.A., Pospelova T.V.** Dependence of the death of Ras-expressing tumor cells on mitochondria after treatment with antitumor agents. № 5. P. 322–332.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120050041>
- Koltsova A.M., Zenin V.V., Petrosyan M.A., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G.** Isolation and characterization of mesenchymal stem cell lines from different parts of placenta of the same donor. № 9. P. 713–727.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120090035>
- Litvinov I.K., Belyaeva T.N., Leontieva E.A., Orlova A.O., Kornilova E.S.** Changes in the fluorescence characteristics of quantum dots based on InP/ZnS during the interaction with cells. № 6. P. 437–445.  
<https://doi.org/10.31857/S004137712006005X>
- Litvinova L.S., Melashchenko E.S., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Sharkeev Yu.P., Komarova E.G., Sedelnikova M.B., Todosenko N.M., Khlusov I.A.** Morphofunctional reaction of T-lymphocytes on in vitro contact with calcium phosphate coating in the presence of T-cell activation kit. № 8. P. 556–565.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120080039>
- Mil E.M., Binyukov V.I., Erokhin V.N., Albantova A.A., Volodkin A.A., Goloshchapov A.N.** Exposition phosphatidylerine in lewis carcinoma cells under the action of anphen sodium and hydrogen peroxide. № 7. P. 503–510.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120070032>
- Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Antonov V.G., Krutetskaya N.I.** Pyrazole derivative attenuates store-dependent  $Ca^{2+}$  entry in rat peritoneal macrophages. № 11. C. 829–836.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120110073>
- Milto I.V., Shevtsova N.M., Ivanova V.V., Serebrjakova O.N., Takhauov R.M., Suhodolo I.V.** Hematopoietic cells of rat bone marrow after intravenous application of chitosan modified nanomagnetite. № 6. P. 418–427.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120060061>
- Morgun A.V., Osipova E.D., Boytsova E.B., Lopatina O.L., Gorina Ya.V., Pozhilenkova E.A., Salmina A.B.** Vascular component of neuroinflammation in experimental Alzheimer's disease. № 1. P. 16–23.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120010058>
- Nikitina M.Yu., Ponomareva A.A., Daminova A.G., Nevzorova T.A., Tarakanchikova Ya.V., Atochina-Vasserman E.N., Litvinov R.I.** Viability, ultrastructure, and migration activity of neutrophils after phagocytosis of synthetic microcapsules. № 2. P. 129–140.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120020030>
- Nikolaeva E.D., Dubovtseva I.Yu., Belonogov R.N., Narkevich A.N., Moshev A.V., Savchenko A.A., Ruksha T.G.** Vemurafenib induces the increase of quiescent cells (Ki-67-negative) in BRAF-negative melanoma. № 10. P. 793–802.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120110085>
- Nurullin L.F., Volkov E.M.** Immunofluorescent identification of isoforms subunit  $\alpha 1$  voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels CaV1, CaV2, and CaV3 in cholinergic synapses zones of somatic muscles earthworm *Lumbricus terrestris*. № 2. P. 141–148.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120020042>
- Nurullin L.F., Volkov E.M.**  $Ca^{2+}$  permeable canonical TRP channels in mouse m. LAL muscle fibers. № 8. P. 591–600.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120080040>
- Pinevich A.A., Vartanyan N.L., Terekhina L.A., Krutetskaya I.Y., Shashkova O.A., Smirnov I.V., Samoylovich M.P.** Endoglin expression and surface renewal in mesenchymal stem cells and endothelial cells. № 8. P. 542–555.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120080052>
- Popov G.I., Popryadukhin P.V., Yukina G.Y., Sukhorukova E.G., Ivankova E.M., Vavilov V.N., Yudin V.E.** Morphological study of a bioresorbable tubular matrix of a small diameter from a poly (l-lactide) for a tissue-engineered vascular implant. № 1. P. 38–46.  
<https://doi.org/10.1134/S004137711912006X>
- Popryadukhin P.V., Sudareva N.N., Suvorova O.M., Yukina G.Yu., Sukhorukova E.G., Saprykina N.N.** Morphology of porous  $CaCO_3$  vaterites as components of targeted drug delivery systems in rat muscular tissue. № 10. P. 738–744.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120100053>
- Pozdina V.A., Danilova I.G., Abidov M.T.** Immunophenotypical aspects of peritoneal and liver macrophages derived animals with the model of alloxan diabetes (type I) and their correction by sodium aminodiglydrophthalazindione in vitro. № 8. P. 581–590.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120080064>
- Razenkova V.A., Korzhevskii D.E.** 2020. GABA-ergic axosomatic synapses of rat cortical neurons. № 10. P. 815–821.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120110097>

- Ryabov V.M., Petrova E.N., Popov B.V.** Oscillations of the deubiquitase 28 levels in cell cycle of the human adenocarcinoma cell line HCT116 suggest its functional role in regulation of the G1/S transition. № 3. P. 181–188. <https://doi.org/10.31857/S0041377120030050>
- Ryabov V.M., Vereschagina N.A., Petrov N.S., Litvinova M.V., Popov B.V.** Regulation of the *PPARgamma2* expression by PcG and pRb families proteins in the course of adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells. № 12. P. 867–879. <https://doi.org/10.31857/S0041377120120044>
- Serebriakova M.K., Kudryavtsev I.V., Balkan E., Polevshchikov A.V.** The experience in lectins application to assess changes in the carbohydrate composition of murine thymocytes glycocalyx in the early and late apoptotic stages. № 9. P. 752–761. <https://doi.org/10.31857/S0041377120090059>
- Shafei E.V., Rzhanova L.A., Novikova Y.P., Kurinov A.M., Grigoryan E.N., Aleksandrova M.A., Kuznetsova A.V.** Response of human retinal pigment epithelial cells to the effect of the conditioned media of newt retinal regenerates. № 9. P. 728–743. <https://doi.org/10.31857/S0041377120090060>
- Shapoval N.S., Malinovskaya N.A., Morgun A.V., Salmina A.B., Obolenskaya O.N., Medvedeva N.A., Medvedev O.S.** The effect of ubiquinol on cerebral endothelial cells in different regions of rat brain. № 12. P. 894–902. <https://doi.org/10.31857/S0041377120120056>
- Shapoval N.S., Medvedev O.S., Medvedeva N.A., Morgun A.V., Boytsova E.B., Osipova E.D., Salmina A.B.** Influence of the oxidized and reduced forms of coenzyme Q10 (ubiquinone and ubiquinol) to cerebral endothelial cells in the blood brain barrier model. № 6. P. 428–436. <https://doi.org/10.31857/S0041377120060085>
- Shekunov E.V., Yurchenko K.S., Shestopalov A.M.** A cytotoxic effect of the wild type newcastle disease virus strain on the tumor cells *in vitro*. № 2. P. 121–128. <https://doi.org/10.31857/S0041377120020066>
- Sholan R.F.** The cellular elements of the lamina propria of the bladder mucosa in experimental models of interstitial cystitis (bladder pain syndrome). № 9. P. 769–774. <https://doi.org/10.31857/S0041377120090072>
- Shutskiy N.A., Shagrov L.L., Kashutin S.L., Maityavskaya S.I.** The content of dermal collagen and growth factors in blood serum of rats after local cold injury. № 8. P. 601–608. <https://doi.org/10.31857/S0041377120080076>
- Sitkovskaya A.O., Filippova S.Yu., Zlatnik E.Yu., Kolpakov S.A., Kolpakova E.P., Mezheva I.V., Bondarenko E.S., Ignatov S.N., Novikova I.A., Rostorguev E.E., Kit O.I.** A cytotoxic effect of the unclassified group k rotaviruses on T98G and U87MG cells *in vitro*. № 3. P. 189–200. <https://doi.org/10.31857/S0041377120030062>
- Sitkovskaya A.O., Zlatnik E.Yu., Shamova T.V., Bondarenko E.S., Novikova I.A., Vashchenko L.N., Kechdzheva E.E., Dashkova I.R., Ausheva T.V., Kit O.I.** The effect of T-regulatory cells separation from blood mononuclear cells on the generation of lymphokine-activated killers. № 10. P. 726–737. <https://doi.org/10.31857/S0041377120100065>
- Skorkina M.Yu., Shevchenko T.S., Sladkova E.A., Zakirova L.R.** Functional properties of cell surface of granulocytes at modeling of activation elements of purinergic signaling system. № 5. P. 333–339. <https://doi.org/10.31857/S0041377120050053>
- Sokolova I.B., Pavlichenko N.N.** Effect of mesenchymal stem cell transplantation on the reactivity of smooth muscle cells of pial arteries of nephrectomized rats. № 10. P. 745–752. <https://doi.org/10.31857/S0041377120100077>
- Sokolova I.B., Pavlichenko N.N.** The efficacy of mesenchymal stem cells transplantation for improvement of microcirculation in the cerebral cortex of nephrectomized rats. № 6. P. 410–417. <https://doi.org/10.31857/S0041377120060103>
- Soloveva A.M., Aleksandrova S.A.** Cell number and viability evaluation using an automatic cell counter. № 7. P. 522–532. <https://doi.org/10.31857/S0041377120070056>
- Starinets A.A., Egorova E.L., Tyrtysnaia A.A., Dyuzhen I.V., Baryshev A.N., Manzhulo I.V.** Micro- and astroglia activity in the spinal cord ventrolateral nucleus after sciatic nerve injury in rats. № 1. P. 24–31. <https://doi.org/10.31857/S0041377120010095>
- Sukhareva K.S., Smolina N.A., Knyazeva A.A., Kalugina K.K., Khudiakov A.A., Kostareva A.A.** L345P DES mutation and its influence on the dynamics of autophagy process in muscle cells C2C12. № 7. P. 493–502. <https://doi.org/10.31857/S0041377120070081>
- Taskaeva Iu.S., Gogaeva I.S., Bgatova N.P.** Apoptosis in hepatocellular carcinoma-29 cells after lithium carbonate administration *in vivo*. № 4. P. 286–292. <https://doi.org/10.31857/S0041377120040069>
- Teryukova N.P., Andreev G.V., Voronkina I.V., Sakhenberg E.I., Snopov S.A.** Ascitic Zajdela hepatoma as a continuum for tumor cells at transit state. № 7. P. 473–486. <https://doi.org/10.31857/S0041377120070068>
- Tsaplina O.A.** Redistribution of the EGF receptor and  $\alpha 55$ -,  $\beta 1$ -integrins in response to infection of epithelial cell by *Serratia proteamacu*. № 5. P. 349–355. <https://doi.org/10.31857/S0041377120050065>
- Turishcheva E.P., Vildanova M.S., Potashnikova D.M., Smirnova E.A.** Different reaction of biosynthetic system of human dermal fibroblasts and fibrosarcoma cells to plant hormones. № 8. P. 566–580. <https://doi.org/10.31857/S0041377120080088>
- Vashkevich E.P., Migas A.A., Meleshko A.N., Matveyenka M.A., Strushkevich N.V., Shman T.V.** Human natural killer cells expansion and activation *ex vivo* in the presence of transgenic feeder cell lines. № 4. P. 258–265. <https://doi.org/10.31857/S0041377120040070>

**Veryaskina Yu.A., Titov S.E., Agakishiev M.M., Zabela A.V., Selivanov V.S., Melikhov S.P., Kovynev I.B., Pospelova T.I., Zhimulev I.F.** Profiling karyotype-dependent patterns of miRNA expression in acute promyelocytic leukemia. № 4. P. 250–257.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120050077>

**Vetrovoy O.V., Nimiritsky P.P., Tyulkova E.I., Rybnikova E.A.** Transcription factor HIF1 negatively regulates glucose-6-phosphate dehydrogenase content in HEK293 T-cells. № 9. P. 744–751.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120090084>

**Vetrovoy O.V., Tyulkova E.I., Stratilov V.A., Vataeva L.A.** Prenatal administration of dexamethasone causes a violation of glucocorticoid feedback associated with a change in the number of corticosteroid receptor in extrahypothalamic brain structures. № 7. P. 511–521.  
<https://doi.org/10.31857/S004137712007007X>

**Voronkina I.V., Smagina L.V., Bilyug N.B., Musorina A.S., Poljanskaya G.G.** Dynamics of matrix metalloproteinases activity and extracellular matrix proteins content of human mesenchymal stem cell lines during replicative aging. № 3. P. 210–219.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120030086>

**Yartseva N.M., Chitikova G.V., Bykova T.V., Zubova S.G., Kochetkova E.U., Pospelov V.A., Pospelova T.V.** Alterations of karyotype in irradiated apoptosis-resistant HINDIIIIG cells after prolonged cultivation. № 12. P. 880–893.  
<https://doi.org/10.31857/S004137712012007X>

**Yatsenko A.A., Kushnarev V.A., Ustinov E.M., Leonov D.V., Kislitskiy V.M., Tseluyko S.S., Artemeva A.S.** Cultivation melanoma cells in vitro on a 3D-scaffold prepared on the basis of gelatin. № 5. P. 375–382.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120050089>

**Yudintceva N.M., Nashchekina Ya.A., Shevtsov M.A., Mikhailova N.A., Vinogradova T.I., Gorelova A.A., Samusenko I.A., Muraviov A.N.** Application of the tissue-engineering construction seeded with buccal cells for substitute urethroplasty. № 4. P. 266–277.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120040082>

**Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Todosenko N.M., Litvinova L.S.** Role of  $\gamma$ c-cytokines (IL-2, IL-7, and IL-15) in the regulation of cell death of memory T-lymphocytes induced by activation. № 5. P. 340–348.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120050107>

**Zachepilo T.G., Lopatina N.G.** 2. Histone H3 lysine 4 methylation in the neurons of the mushroom bodies of the honeybee brain in memory formation. № 1. P. 32–37.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120010113>

**Zemlianskykh N.G.** Regulation of the asymmetric lipid distribution in the human erythrocyte membrane at glycerol and polyethylene glycol effects. № 2. P. 112–120.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120020078>

#### LETTER TO EDITOR

**Zharkov N.A.** On the unknown mechanisms of meiotic cells division at *Triticum aestivum L.* № 3. P. 220–224.  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120030098>