# Том 85, выпуск 2, 2020

Гранзимы и митохондрии (обзор) Д.Б. Киселевский	155
Протеогеномика единичных клеток — ближайшая перспектива (обзор) С.А. Мошковский, А.А. Лобас, М.В. Горшков	165
Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот и их применение в биоанализе (обзор) О.Л. Бодулев, И.Ю. Сахаров	174
Тимохинон как потенциальный нейропротектор при острых и хронических формах церебральной патологии (обзор) <i>Н.К. Исаев, Н.С. Четвериков, Е.В. Стельмашук, Е.Е. Генрихс,</i> <i>Л.Г. Хаспеков, С.Н. Иллариошкин</i>	197
Липидные рафты в биогенезе экзосом (обзор) Г.О. Скрябин, А.В. Комельков, Е.Е. Савельева, Е.М. Чевкина	208
Каталитически компетентные конформации активного центра 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека А.В. Попов, А.В. Юдкина, Ю.Н. Воробьев, Д.О. Жарков	225
Тимохинон вызывает повреждение митохондрий и гибель зернистых нейронов мозжечка <i>Е.В. Стельмашук, Н.С. Четвериков, С.А. Голышев, Е.Е. Генрихс, Н.К. Исаев</i>	239
Нейротрофины мозга плода и плаценты при пренатальной гипергомоцистеинемии А.В. Арутюнян, Ю.П. Милютина, А.Д. Щербицкая, Г.О. Керкешко, И.В. Залозняя, А.В. Михель	248
Характеристика комплексов, полученных методом биоконъюгации генетически модифицированных частиц ВТМ и консервативного антигена вируса гриппа А <i>Т.В. Гасанова, А.А. Королева, Е.В. Скурат, П.А. Иванов</i>	260
Изменения в экспрессии концевых олигосахаридных звеньев и гликозилирование цепи поли- <i>N</i> -ацетиллактозамина в липополисахариде <i>Helicobacter pylori</i> при колонизации макак-резус <i>А.В. Перепелов, С.Н. Сенченкова, Ю.А. Книрель</i>	272
Установление структуры капсульного полисахарида К32 и характеристика генного кластера KL32 Acinetobacter baumannii LUH5549 С.М. Кахилл, Н.П. Арбатский, А.С. Шашков, М.М. Шнейдер, А.В. Попова, Р.М. Хэлл, Дж.Дж. Кенион, Ю.А. Книрель	280
Глутамат-рацемаза необходима для выживаемости клеток Streptococcus iniae и целостности их клеточной стенки М. Мухаммад, Дж. Бай, А.Дж. Альхассан, Х. Суле, Дж. Цзюй, Б. Чжао, Д. Лю	287

# Vol. 85, Publ. 2, 2020

=

Granzymes and Mitochondria (Review) D. B. Kiselevsky	155
Single Cell Proteogenomics as an Immediate Prospect (Review) S. A. Moshkovskii, A. A. Lobas, and M. V. Gorshkov	165
Isothermal Amplification Methods of Nucleic Acids and Their Application in Bioanalysis (Review) O. L. Bodulev and I. Yu. Sakharov	174
Thymoquinone as a Potential Neuroprotective Drug in Acute and Chronic Forms of Cerebral Pathology (Review) N. K. Isaev, N. S. Chetverikov, E. V. Stelmashook, E. E. Genriks, L. G. Khaspekov, and S. N. Illarioshkin	197
Lipid Rafts in Exosome Biogenesis (Review) G. O. Skryabin, A. V. Komelkov, E. E. Savelyeva, and E. M. Tchevkina	208
Catalytically Competent Conformations of the Active Site of Human 8-Oxoguanine-DNA Glycosylase A. V. Popov, A. V. Yudkina, Yu. N. Vorobjev, and D. O. Zharkov	225
Thymoquinone Induces Mitochondrial Damage and Death of Cerebellar Granule Neurons E. V. Stelmashook, N. S. Chetverikov, S. A. Golyshev, E. E. Genrikhs, and N. K. Isaev	239
Neurotrophins of the Fetal Brain and Placenta in Prenatal Hyperhomocysteinemia A. V. Arutjunyan, Yu. P. Milyutina, A. D. Shcherbitskaia, G. O. Kerkeshko, I. V. Zalozniaia, and A. V. Mikhel	248
Complexes Formed <i>via</i> Bioconjugation of Genetically Modified TMV Particles with Conserved Influenza A Virus Antigen: Synthesis and Characterization <i>T. V. Gasanova, A. A. Koroleva, E. V. Skurat, and P. A. Ivanov</i>	260
Variations in the Expression of Terminal Oligosaccharide Units and Glycosylation of Poly( <i>N</i> -acetyllactosamine) Chain in the <i>Helicobacter pylori</i> Lipopolysaccharide upon Colonization of Rhesus Macaques <i>A. V. Perepelov, S. N. Senchenkova, and Yu. A. Knirel</i>	272
<ul> <li>Elucidation of the K32 Capsular Polysaccharide Structure and Characterization of the KL32 Gene</li> <li>Cluster of Acinetobacter baumannii LUH5549</li> <li>S. M. Cahill, N. P. Arbatsky, A. S. Shashkov, M. M. Shneider, A. V. Popova, R. M. Hall,</li> <li>J. J. Kenyon, and Yu. A. Knirel</li> </ul>	280
Significance of Glutamate Racemase for the Viability and Cell Wall Integrity of <i>Streptococcus iniae M. Muhammad, J. Bai, A. J. Alhassan, H. Sule, J. Ju, B. Zhao, and D. Liu</i>	287

УДК 577.15

## ГРАНЗИМЫ И МИТОХОНДРИИ

## Обзор

#### © 2020 Д.Б. Киселевский

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: dkiselevs@mail.ru

> Поступила в редакцию 01.10.2019 После доработки 01.11.2019 Принята к публикации 04.11.2019

Цитотоксические Т-лимфоциты и естественные киллеры избавляют организм от зараженных клеток путем включения в них программы гибели (апоптоза). Это может происходить в результате высвобождения содержимого литических гранул клеток-киллеров, в которых локализованы порообразующие белки перфорины и протеолитические ферменты гранзимы, и их последующего проникновения в клетки-мишени. Гранзим В способен инициировать зависимый от митохондрий путь апоптоза несколькими способами: через 1) проапоптозный белок Bid, 2) белки McI-1 и Bim или 3) белок p53. В результате из митохондрий в цитоплазму выходит цитохром *c*, и образуются апоптосомы, обеспечивающие протеолитический каскад активации каспаз. Гранзимы М, Н и F вызывают гибель клеток, которая сопровождается выходом цитохрома *c* из митохондрий. Гранзим А индуцирует образование активных форм кислорода (AФK), которые способствуют транслокации ассоциированного с эндоплазматическим ретикулумом комплекса SET в ядро клетки. В клеточном ядре гранзим А расщепляет SET; это активирует нуклеазы, которые осуществляют одноцепочечные разрывы ДНК. Гранзимы А и В проникают в митохондрии и разрезают субъединицы комплекса I дыхательной цепи. Одна из субъединиц комплекса I является мишенью также и для каспазы-3. Гранзим-зависимое повреждение комплекса I приводит к образованию АФК и гибели клеток.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** активные формы кислорода, апоптоз, гранзимы, митохондрии, программируемая клеточная смерть.

DOI: 10.31857/S0320972520020013

Если организм инфицирован, то основной способ его защиты – избавление от собственных зараженных клеток. Специализированные клетки иммунной системы – цитотоксические Т-лимфоциты и естественные киллеры (NK, natural killer) – осуществляют поиск и уничтожение клеток, содержащих чужеродные компоненты: инфицированных, мутировавших или раковых клеток. Ликвидация таких клеток осуществляется посредством включения в них программы гибели клеток (апоптоза) и может происходить двумя путями [1, 2].

Первый путь реализуется через взаимодействие лигандов и рецепторов суперсемейства фактора некроза опухоли (TNF, tumor necrosis factor), например, CD95L (FasL, Fas-лиганд), расположенного трансмембранно на клеткахкиллерах, и рецептора CD95 (Fas) на клеткахмишенях [3, 4]. В результате происходит активация каспаз, начиная с каспазы-8, и апоптоз [5]. При определенных условиях связывание лигандов с рецепторами может приводить не к апоптозу, а к некроптозу – одной из форм программируемого (регулируемого) некроза. Образуется рипоптосома – белковый комплекс (2 МДа), содержащий киназу RIPK1 (receptor-interacting protein kinase 1), адаптерный белок FADD (Fasassociated death domain), каспазу-8 и cFLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein). Некроптоз реализуется в условиях подавления активности cIAPs (cellular inhibitors of apoptosis proteins), которые способствуют убиквитинированию и разрушению киназы RIPK1. Образование рипоптосомы регулируется разными изоформами белка сFLIР и обеспечивает последовательное фосфорилирование RIPK1, RIPK3 и белка MLKL (mixed lineage kinase-like protein), который олигомеризуется и образует каналы в плазматической мембране клеток [6-8].

Второй путь — это высвобождение содержимого литических гранул клеток-убийц (рис. 1).

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода;  $O_2^-$  супероксидный анион-радикал; GAAD – ДНКаза, активируемая гранзимом А; FeS-кластеры – железо-серные кластеры; FMN – флавинмононуклеотид; NK – естественные киллеры;  $\Delta \overline{\mu}_{H^+}$  – разность электрохимических потенциалов ионов водорода;  $\Delta \psi$  – трансмембранная разность электрических потенциалов.



Рис. 1. Путь доставки гранзимов из литических гранул цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток в цитоплазму клетки-мишени

Чтобы сконцентрировать содержимое литических гранул и обезопасить от него соседние клетки, между клеткой-киллером и клеткой-мишенью формируется иммунный синапс – микроскопическая межклеточная щель, ограниченная плазматическими мембранами взаимодействующих клеток, в которую высвобождаются компоненты литических гранул. Размеры иммунного синапса достигают нескольких микрон, а ширина щели между клетками – порядка десятков нанометров [9–11]. В гранулах содержится перфорин с мембраноатакующим комплексом, подобным С9-компоненту системы комплемента [12], создающий каналы в мембране диаметром в среднем ~16 нм [13, 14].

Другой компонент литических гранул – кальретикулин. В отсутствие Ca<sup>2+</sup> он связывает перфорин (рис. 1), а при увеличении концентрации Ca<sup>2+</sup> до 0,1 мМ и выше комплекс кальретикулин-перфорин диссоциирует. Предполагается, что кальретикулин препятствует образованию перфориновых пор в мембране литических гранул, предохраняя цитотоксические Т-лимфоциты и естественные киллеры от опасного содержимого гранул [15]. В жидкостях и тканях животных общая концентрация кальция варьирует от 2,1 до 2,6 мМ, доля свободного ионизированного Ca<sup>2+</sup> снаружи клеток обычно составляет половину от этих значений, а внутри клеток его концентрация на ~5 порядков ниже [16].

С помощью перфориновых пор внутрь клеток-мишеней проникает еще один компонент гранул – гранзимы – сериновые протеазы, разрезающие внутриклеточные белки-субстраты. Проникновение гранзимов в клетку происходит не напрямую через перфориновые каналы в плазматической мембране. Длительное нарушение барьерной функции наружной мембраны клеток, вызванное перфорином, может приводить к гибели клеток по типу некроза, который сопровождается воспалением, тогда как гранзим-зависимая гибель клеток - это апоптоз, происходящий, как правило, без воспаления [17]. Перфориновые поры в плазматической мембране вызывают временный приток Ca<sup>2+</sup> в клетку-мишень (рис. 1), который длится несколько минут. Увеличение внутриклеточной концентрации Ca<sup>2+</sup> активирует механизм восстановления повреждений плазматической мембраны, включающий эндоцитоз для удаления поврежденных участков мембраны. Перфорин и гранзимы попадают в эндосомы. Гранзимы могут медленно выходить из эндосом через перфориновые поры в их мембране. Затем, примерно через 15 мин после воздействия на клетки перфорином и гранзимом, мембрана эндосом разрывается, и гранзимы высвобождаются в цитоплазму клетки-мишени (рис. 1) [18].

Название гранзимы (от словосочетания «гранулярные энзимы») было впервые предложено для двух обнаруженных протеаз – гранзимов А (35 кДа) и В (29 кДа) – в 1986 г. в работе Masson et al. [19]. В настоящее время идентифицированы 12 гранзимов (А, В, С, D, Е, F, G, H, J, K, M и N), из них пять (А, В, Н, К и М) найдены у человека [20–22]. В литических гранулах цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток ~90% массы приходится на долю гранзимов [23].

#### ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ЦИТОХРОМА С ИЗ МИТОХОНДРИЙ

Гранзим В инициирует зависимый от митохондрий путь апоптоза с участием проапоптозного белка Bid (BH3 interacting domain death agonist). При входе в цитоплазму из эндосомального компартмента гранзим В расщепляет Bid с образованием gtBid (granzyme-truncated Bid), приводя к апоптозу (рис. 2). Участок разрезания белка Bid гранзимом В отличается от места его расщепления каспазой-8. Сверхэкспрессия в

митохондриях антиапоптозного белка Bcl-2 (Вcell lymphoma 2) может блокировать проявления клеточной гибели, вызванной гранзимом В [24–26]. Белок gtBid (14 кДа) транслоцируется в митохондрии и рекрутирует белки Вах (Bcl-2associated X-protein) или Bak (Bcl-2antagonist/killer), которые интегрируются в мембрану и индуцируют высвобождение цитохрома с (рис. 2) [27, 28]. Согласно одной из моделей взаимодействия белков семейства Bcl-2, ингибирующее действие белка Bcl-2 может быть обусловлено его прямым связыванием с Вах, Bak или gtBid. Другая модель предполагает, что в норме белок Вах, имеющий сродство к липидной мембране, постоянно транслоцируется с наружной мембраны митохондрии в цитоплазму белком Bcl-2. При апоптозе gtBid (а также другие белки из группы проапоптозных белков семейства Bcl-2, содержащих только домен BH3) препятствует действию антиапоптозного Bcl-2, в результате чего Вах связывается с мембраной, димеризуется, а затем олигомеризуется, формируя поры, через которые цитохром с выходит из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму [29, 30].

Связывание цитохрома c в цитоплазме с мономерным Apaf-1 (арорtotic protease activating factor-1) вызывает конформационные изменения последнего, приводящие к нуклеотидному обмену: ADP в нуклеотид-связывающем домене Apaf-1 заменяется на dATP или ATP. В этой реакции dATP более эффективен в сравнении с ATP, но внутриклеточная концентрация ATP выше, поэтому оба нуклеотида могут быть вовлечены в митохондриальный путь апоптоза [31]. Далее Apaf-1, связанный с цитохромом c, олигомери-

зуется. Образовавшийся гептамер – апоптосома, являющаяся платформой для активации каспазы-9. Апоптосома напрямую связывает молекулы прокаспазы-9 через гомотипическое взаимодействие доменов CARD (caspase activation and recruitment domain), расположенных в центральной части апоптосомы и на прокаспазе-9 [32, 33]. Удаление домена CARD существенно увеличивает каталитическую активность прокаспазы-9, поэтому роль апоптосомы в активации каспазы-9 может заключаться не только в олигомеризации прокаспаз-9 и их автопротеолизе [34, 35], но и в устранении ингибирующего эффекта домена CARD [36]. Каспаза-9 инициирует протеолитический каскад, активирующий эффекторные каспазы-3 и -7 [34]. Каспаза-3 может активироваться напрямую гранизимом В (рис. 2), но не гранзимом А [37, 38]. Субстратами эффекторных каспаз, в т.ч. каспазы-3, являются сотни белков клетки. Среди них белки ядра и цитоскелета, протеолиз которых приводит к фрагментации клеточного ядра и образованию везикул на плазматической мембране - характерным проявлениям апоптоза [39, 40].

У гранзима В, кроме белка Віd и прокаспаз-2, -3, -7, -8, -9 и -10, есть множество других белков-мишеней в клетке, включая белки теплового шока, белки цитоскелета (среди которых актин и тубулин), ингибитор каспаза-активируемой ДНКазы ICAD/DFF45 (inhibitor of caspaseactivated DNase/DNA fragmentation factor, 45 кДа), ядерные белки (в т.ч. ламин, поли(ADP-рибоза)полимераза и другие белки, связанные с репарацией ДНК) [10]. Митохондриальные субстраты гранзима В включают белок Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1), расположенный на



Рис. 2. Гранзим В активирует митохондриальный путь апоптоза

внешней мембране митохондрий [41, 42], и дигидролипоилтрансацетилазу E2 пируватдегидрогеназного комплекса [43], осуществляющего окислительное декарбоксилирование пирувата с образованием ацетил-кофермента A и CO<sub>2</sub>, а также восстановлением NAD<sup>+</sup> в матриксе митохондрий.

При протеолизе Mcl-1 гранзимом В может осуществляться альтернативный, независимый от белка Bid митохондриальный путь апоптоза (рис. 2). Антиапоптозный белок Mcl-1 связывает проапоптозный белок Bim (или Bcl-2-like 11, арорtosis facilitator). Оба этих белка, как и белки Bid, Bax и Bak, принадлежат к семейству белков Bcl-2 [44]. Гранзим В высвобождает Bim из комплекса Mcl-1–Bim, активируя его [10, 41]. Как и в случае с Bid, обработанным гранзимом В, белок Bim напрямую инициирует олигомеризацию белков Bax и Bak, образование пор в мембранах митохондрий и выход цитохрома *с*. Bid преимущественно активирует Bak, тогда как Bim предпочитает Bax [45].

В еще одном пути регуляции апоптоза гранзимом В, связанном с митохондриями, участвует опухолевый супрессор p53. Активированный гранзимом В белок p53 транслоцируется к митохондриям и взаимодействует с Bcl-2 на внешней митохондриальной мембране (рис. 2). Это устраняет ингибирующее воздействие Bcl-2 на Вах и способствует образованию пор в митохондриальной мембране [46].

Изученные в меньшей степени гранзимы М, Н и F индуцировали гибель клеток с участием митохондрий, которая сопровождалась выходом цитохрома с из митохондрий в цитоплазму. Гранзим М напрямую не расщеплял прокаспазу-3 и Bid, его действие опосредовано каспазой-8. Ассоциированный с рецептором смерти CD95 (Fas) адаптерный белок FADD (Fas-associated protein with death domain) специфически расщеплялся гранзимом М после остатка Met196, образуя усеченный белок (tFADD). Это облегчало рекрутирование прокаспазы-8. Индуцированной гранзимом М гибели клеток сопутствовало высвобождение цитохрома с из митохондрий в цитоплазму [47]. Гранзим Н вызывал гибель клеток при участии Bcl-2, однако также не осуществлял прямого расщепления Bid. Вызванная гранзимом Н гибель клеток сопровождалась выходом цитохрома с из митохондрий. Активация каспаз и защитный эффект ингибиторов каспаз наблюдались, однако были небольшими при сравнении гранзима Н с другими индукторами апоптоза. Гранзим Н, подобно гранзиму В, непосредственно взаимодействовал с ICAD/DFF45, что, вероятно, приводило к повреждению ДНК и гибели клеток [48, 49]. Смерть клеток, вызванная гранзимом F, не включала расщепление Bid и активацию каспаз. Гранзим F нарушал транспорт электронов в дыхательной цепи митохондрий, снижая скорость поглощения O<sub>2</sub> и образование ATP в клетках [50].

Гранзим А, подобно гранзиму В, способен расщеплять множество клеточных белков, в т.ч. белки цитоскелета и ядра [51]. Губительное действие гранзима А на клетки связывают с активацией нуклеаз, производящих одноцепочечные разрывы ДНК и способствующих гибели клеток с признаками апоптоза. С эндоплазматическим ретикулумом связан белковый комплекс (270-420 кДа), содержащий ДНКазу NM23-H1 (или GAAD, granzyme A-activated DNase) и ее ингибитор SET, который разрезается гранзимом А. В результате ДНКаза высвобождается и активируется. Клетки с подавленной экспрессией NM23-H1 устойчивы к повреждению ДНК, вызванному гранзимом А, и цитолизу, а клетки со сверхэкспрессией NM23-H1, напротив, более чувствительны [52, 53]. Было обнаружено, что гранзим А вызывает образование активных форм кислорода (АФК) и снижение разности электрических потенциалов ( $\Delta \psi$ ) в митохондриях. Повреждение митохондрий является важным этапом в апоптозе, вызванном гранзимом А [54].

## ОБРАЗОВАНИЕ АФК В МИТОХОНДРИЯХ

NADH:убихинон-оксидоредуктаза (комплекс I дыхательной цепи митохондрий) катализирует окисление NADH убихиноном. Двухэлектронное окисление одной молекулы NADH сопровождается трансмембранным переносом четырех протонов и генерацией на внутренней мембране митохондрий разности электрохимических потенциалов ионов водорода ( $\Delta \mu_{H^+}$ ) [55]. Комплекс I — один из крупнейших (970 кДа) комплексов белков в клетке, связанных с мембраной. Комплекс I млекопитающих содержит 45 субъединиц: 14 основных субъединиц консервативны и имеются у живых организмов от бактерий до человека; 31 субъединица специфична для млекопитающих [56, 57].

Гранзим А действует непосредственно на митохондрии, вызывая образование АФК и снижение  $\Delta \psi$  на внутренней мембране митохондрий. После 2 мин обработки гранзимом А в комбинации с перфорином митохондрии клеток HeLa начинали генерировать супероксидный анионрадикал ( $O_{\overline{2}}$ ), который детектировали с помощью MitoSOX Red, митохондриального флуоресцентного индикатора  $O_{\overline{2}}$ . Показано, что гранзим A разрезает субъединицу комплекса I NDUFS3 после остатка Lys56 [58]. Гранзим B,

который подобно гранзиму А в сочетании с перфорином вызывал образование митохондриальных АФК, расщепляет субъединицы NDUFV1, NDUFS1 и NDUFS2 [59]. Примечательно, что NDUFS1 разрезается также каспазой-3 – центральным протеолитическим ферментом при апоптозе. В NDUFS1 есть участок из четырех остатков аминокислот (DVMD у млекопитающих), являющийся субстратом каспазы [60]. На рис. 3 отмечены субъединицы комплекса I, подвергающиеся протеолизу каспазой-3 (NDUFS1), гранзимами A (NDUFS3) или B (NDUFV1, NDUFS1 и NDUFS2). Все эти субъединицы из числа основных субъединиц расположены в гидрофильном (немембранном) домене комплекса I, в котором происходит перенос электронов с NADH на убихинон по цепочке FeS-кластеров. NDUFV1 содержит флавинмононуклеотид (FMN) и FeS-кластер N3; NDUFS1 – FeSкластеры N1b, N4 и N5; NDUFS2 и NDUFS3 содержат FeS-кластеры, не принадлежащие к основному пути переноса электронов от NADH к убихинону [57].

Проникновение в митохондрии гранзима В происходит независимо от транслоказы внешней митохондриальной мембраны Tom (translocase of the outer mitochondrial membrane), вместо этого используется Sam50 (sorting and assembly machinery). Через внутреннюю мембрану гранзим В проходит с помощью Tim22 (translocase of the inner mitochondrial membrane) при участии митохондриального белка теплового шока 70 (mtHsp70). Гранзим А и каспаза-3 доставляются в митохондрии по похожему пути. Для проникновения гранзимов и каспазы-3 митохондрии должны обладать  $\Delta \psi$  на внутренней мембране [63, 64].

Генерация  $O_{\overline{2}}$  в комплексе I дыхательной цепи митохондрий зависит от  $\Delta \psi$ , концентрации и соотношения NADH/NAD<sup>+</sup>, соотношения восстановленного и окисленного убихонона и концентрации  $O_2$  [65–68]. Считается, что основным кофактором, ответственным за генерацию  $O_{\overline{2}}$ , является FMN, но не исключено и образование AФK на участке связывания убихинона. Предположительно, существуют два пути



**Рис. 3.** Структура комплекса I дыхательной цепи митохондрий (по статьям Hirst и Roessler [61], Rodenburg [62]). Обозначены субъединицы, расщепляемые каспазой-3 (NDUFS1), гранзимом A (NDUFS3) или гранзимом B (NDUFV1, NDUFS1 и NDUFS2). Пунктирной линией показан перенос электронов от FMN к участку связывания убихинона по цепочке FeS-кластеров

образования  $O_{2}^{-}$ . Первый путь: NADH  $\rightarrow$  FMN в комплексе I  $\rightarrow$  O $\frac{1}{2}$ . Высокий уровень NADH/NAD<sup>+</sup> приводит к восстановлению FMN. FMN (полностью восстановленный или в форме семихинона) реагирует с  $O_2$ , образуя  $O_{\overline{2}}$ . Второй путь (обратный перенос электронов): восстановленный убихинон → цепь FeS-кластеров в комплексе I  $\rightarrow$  FMN в комплексе I  $\rightarrow$  O $\frac{1}{2}$ . Сукцинат, субстрат комплекса ІІ дыхательной цепи, восстанавливающего убихинон, вызывал генерацию O<sup>-</sup>/<sub>2</sub> в субмитохондриальных частицах. Она подавлялась ротеноном, ингибирующим взаимодействие убихинона с комплексом I, и протонофорным разобщителем, снимающим  $\Delta \psi$ . NADH-Зависимое образование A $\Phi$ K, напротив, могло усиливаться ротеноном и быть нечувствительным к действию разобщителя. NADH в миллимолярной концентрации (близкой к физиологической) и NAD<sup>+</sup> подавляли образование  $O_{\overline{2}}$ , по-видимому, конкурируя с  $O_2$  за связывание с восстановленным FMN. Есть предположение, что FMN комплекса I взаимодействует по меньшей мере с двумя разными участками связывания нуклеотидов: в одном осуществляется окисление NADH, а в другом может происходить восстановление NAD<sup>+</sup> или O<sub>2</sub> [65, 66].

Неясно, каким образом опосредованный гранзимами протеолиз субъединиц комплекса I приводит к образованию АФК. Поскольку действие гранзимов сопровождается снижением  $\Delta \psi$ , можно предположить, что разрезание субъединиц, в т.ч. и тех, в которых находятся компоненты электронтранспортной цепи (NDUFV1 и NDUFS1), нарушает перенос электронов на убихинон, и генерация  $O_{\overline{2}}^{-}$  происходит по первому пути: NADH  $\rightarrow$  FMN  $\rightarrow$  O $\frac{1}{2}$ . Однако это противоречит наблюдению, что ротенон подавлял образование АФК и гибель клеток, вызванную гранзимом А в комбинации с перфорином [58]. Ингибирование процесса ротеноном – признак обратного переноса электронов, от убихинона на FMN. По-видимому, при обработке клеток гранзимами основной путь переноса электронов сохраняется. Возможно, протеолиз субъединиц комплекса I способствует доступу О2 к скрытым внутри белка FMN и FeS-центрам и их окислению с образованием О<sup>-</sup>/<sub>2</sub>. Наряду с глутамат- и малат-зависимым поглощением О2, гранзим В подавлял дыхание с сукцинатом, а также активность комплекса III дыхательной цепи, поэтому не исключено взаимодействие гранзимов с другими комплексами дыхательной цепи [59].

АФК играют важную роль при внедрении в клетку гранзимов. Образование АФК в митохондриях может провоцировать окисление кардиолипина и высвобождение электростатически связанного с ним цитохрома *с* в цитоплазму [69, 70]. Антиоксиданты подавляли гибель клеток, вызванную гранзимом А и перфорином [54]. АФК способствуют транслокации ассоциированного с эндоплазматическим ретикулумом комплекса SET в ядро, где этот комплекс расщепляется гранзимом A с высвобождением двух ДНКаз (NM23-H1 или GAAD и TREX1), которые разрезают ядерную ДНК при гибели клеток, опосредованной гранзимом A [54, 71]. Антиоксиданты также уменьшали проявление признаков апоптоза, индуцированного гранзимом B [59].

Литические гранулы клеток-киллеров у человека (но не у грызунов), в дополнение к перфорину, кальретикулину и гранзимам, содержат антимикробный пептид гранулизин, который избирательно разрушает микробные мембраны с низким содержанием холестерина. Этот пептид способствует защите организма от внутриклеточных паразитических простейших (трипаносомы, токсоплазмы, лейшмании). Перфорин обеспечивает проникновение гранзимов и гранулизина в инфицированные клетки, а затем гранулизин доставляет гранзимы к внутриклеточным паразитам. Показано, что гранзимы запускали образование АФК и инактивировали ферменты антиоксидантной защиты для уничтожения паразита. Гибель паразитических простейших была нечувствительна к ингибиторам каспаз, но по ряду признаков напоминала апоптоз млекопитающих [72].

Таким образом, цитотоксические клеткикиллеры, использующие гранзимы, могут инициировать множество путей активации клеточной гибели. По-видимому, это необходимо для противодействия патогенам, которые могут использовать разные способы уклонения от иммунитета [49].

В последние годы растет интерес к Т- или NK-клеткам-киллерам. Это связано как с их участием в противовирусной защите организма, так и с возможным применением в иммунотерапии опухолей. Цитотоксические Т- и NK-клетки вырабатывают интерферон-у, который обеспечивает включение ряда различных механизмов противовирусной защиты [73]. Цитотоксические Т-лимфоциты распознают и уничтожают клетки, зараженные вирусом и презентирующие вирусные пептиды на молекулах главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС I, major histocompatibility complex class I) [74]. Это свойство может иметь практическое применение в медицине. Так, например, трансплантация сопряжена с ослаблением иммунитета и повышенным риском инфицирования. При этом использование специфичных к вирусным антигенам цитотоксических Т-лимфоцитов, полученных с помощью МНС, которые несут синтетические вирусные пептиды — это возможная альтернатива высокотоксичным противовирусным препаратам [75].

Для ускользания от противовирусной реакции цитотоксических Т-клеток вирусы могут препятствовать презентации антигена: подавлять функции протеасом, транспорт пептидов, транслокацию молекул МНС I из эндоплазматического ретикулума на поверхность клеток [74]. Естественные киллеры способны выявлять и уничтожать инфицированные клетки, в которых нарушена презентация антигенов, т.е. нет МНС I на клеточной поверхности. Вклад цитолитической функции NK-клеток, обеспечиваемой перфорином и гранзимами, в противовирусную защиту зависит от многих факторов и может быть неодинаковым в разных тканях организма [76].

Перспективно использование клеток-киллеров в иммунотерапии рака. Есть свидетельства успешного применения адоптивной терапии опухолей, при которой у пациента берут клеткикиллеры, подвергают их обработке цитокинами и/или генно-инженерным модификациям для активации и усиления противоопухолевого ответа и вводят обратно в организм [77]. Особый интерес представляют модифицированные клетки с химерными антигенными рецепторами (CAR, chimeric antigen receptors) – синтетическими рецепторами, содержащими антигенсвязывающие, активирующие и костимуляторные домены, в которых антигенсвязывающий сайт рецептора Т-клеток (TCR, T-cell receptor) заменяется сайтом иммуноглобулина с высокой аффинностью и специфичностью к целевому опухолевому антигену. Терапия на основе CAR позволяет устранить необходимость МНС-зависимой презентации антигена клеткам-киллерам и является многообещающей стратегией избавления от злокачественных новообразований, устойчивых к традиционным методам лечения. Отсутствие МНС I на поверхности клеток может быть следствием опухолевой трансформации. Утилизация таких клеток естественными киллерами дополняет уничтожение клеток опухоли цитотоксическими Т-лимфоцитами [77, 78].

Ликвидация инфицированных или мутировавших клеток - основа защитной реакции, осуществляемой цитотоксическими Т-лимфоцитами и естественными киллерами и направленной на поддержание гомеостаза организма. Существование множества альтернативных путей инициации гибели клеток, которые описаны в настоящей работе, по-видимому, важно, чтобы: 1) препятствовать механизмам ускользания от иммунных реакций, возникающим у патогенов; 2) осуществлять клеточную смерть даже в случае мутаций отдельных компонентов путей, приводящих к ней. Как и в случае зависимого от каспаз апоптоза, большинство выявленных путей гибели клетки, включаемых гранзимами, ассоциированы с митохондриями.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке научно-исследовательской работы (НИР) из средств федерального бюджета (регистрационный номер НИР в ЦИТИС: АААА-А16-116021660081-0).

**Благодарности.** Автор благодарен д.б.н. профессору В.Д. Самуилову за внимательное прочтение рукописи статьи и ценные замечания.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящее исследование проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008) Mechanisms of granule-dependent killing, *Cell Death Differ.*, **15**, 251–262, doi: 10.1038/sj.cdd.4402244.
- 2. Cullen, S.P., Brunet, M., and Martin, S.J. (2010) Granzymes in cancer and immunity, *Cell Death Differ.*, **17**, 616–623, doi: 10.1038/cdd.2009.206.
- Wajant, H. (2014) Principles and mechanisms of CD95 activation, *Biol. Chem.*, **395**, 1401–1416, doi: 10.1515/hsz-2014-0212.
- 4. Siegmund, D., Lang, I., and Wajant, H. (2017) Cell deathindependent activities of the death receptors CD95, TRAILR1, and TRAILR2, *FEBS J.*, **284**, 1131–1159, doi: 10.1111/febs.13968.
- 5. Tummers, B., and Green, D.R. (2017) Caspase-8: regulating life and death, *Immunol. Rev.*, **277**, 76–89, doi: 10.1111/imr.12541.
- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014) Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15, 135–147, doi: 10.1038/nrm3737.
- Tsuchiya, Y., Nakabayashi, O., and Nakano, H. (2015) FLIP the switch: regulation of apoptosis and necroptosis by cFLIP, *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 30321–30341, doi: 10.3390/ijms161226232.
- Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., and Han, J. (2018) Plasma membrane changes during programmed cell deaths, *Cell Res.*, 28, 9–21, doi: 10.1038/cr.2017.133.

- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation, *Science*, 285, 221–227, doi: 10.1126/science.285.5425.221.
- Rousalova, I., and Krepela, E. (2010) Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review), *Int. J. Oncol.*, **37**, 1361–1378, doi: 10.3892/ijo\_00000788.
- Woodsworth, D.J., Dunsing, V., and Coombs, D. (2015) Design parameters for granzyme-mediated cytotoxic lymphocyte target-cell killing and specificity, *Biophys. J.*, **109**, 477–488, doi: 10.1016/j.bpj.2015.06.045.
- 12. Podack, E.R., and Munson, G.P. (2016) Killing of microbes and cancer by the immune system with three mammalian pore-forming killer proteins, *Front. Immunol.*, **7**, 464, doi: 10.3389/fimmu.2016.00464.
- Stewart, S.E., D'Angelo, M.E., and Bird, P.I. (2012) Intercellular communication via the endo-lysosomal system: translocation of granzymes through membrane barriers, *Biochim. Biophys. Acta*, **1824**, 59–67, doi: 10.1016/ j.bbapap.2011.05.020.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J.C., and Trapani, J.A. (2015) Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology, *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 388–400, doi: 10.1038/ nri3839.
- Andrin, C., Pinkoski, M.J., Burns, K., Atkinson, E.A., Krahenbuhl, O., Hudig, D., Fraser, S.A., Winkler, U., Tschopp, J., Opas, M., Bleackley, R.C., and Michalak, M. (1998) Interaction between a Ca<sup>2+</sup>-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules, *Biochemistry*, **37**, 10386–10394, doi: 10.1021/ bi980595z.
- Carafoli, E., and Krebs, J. (2016) Why calcium? How calcium became the best communicator, *J. Biol. Chem.*, 291, 20849–20857, doi: 10.1074/jbc.R116.735894.
- Davidovich, P., Kearney, C.J., and Martin, S.J. (2014) Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis, *Biol. Chem.*, **395**, 1163–1171, doi: 10.1515/hsz-2014-0164.
- Thiery, J., Keefe, D., Boulant, S., Boucrot, E., Walch, M., Martinvalet, D., Goping, I.S., Bleackley, R.C., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2011) Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells, *Nat. Immunol.*, 12, 770–777, doi: 10.1038/ni.2050.
- 770–777, doi: 10.1038/ni.2050.
   Masson, D., Nabholz, M., Estrade, C., and Tschopp, J. (1986) Granules of cytolytic T-lymphocytes contain two serine esterases, *EMBO J.*, 5, 1595–1600.
- Masson, D., and Tschopp, J. (1987) A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes, *Cell*, 49, 679–685, doi: 10.1016/0092-8674(87)90544-7.
- 21. Susanto, O., Trapani, J.A., and Brasacchio, D. (2012) Controversies in granzyme biology, *Tissue Antigens*, **80**, 477–487, doi: 10.1111/tan.12014.
- Vahedi, F., Fraleigh, N., Vlasschaert, C., McElhaney, J., and Hanifi-Moghaddam, P. (2014) Human granzymes: related but far apart, *Med. Hypotheses*, **83**, 688–693, doi: 10.1016/j.mehy.2014.09.019.
- 23. Trapani, J.A. (2001) Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases, *Genome Biol.*, **2**, reviews3014.1–3014.7, doi: 10.1186/gb-2001-2-12-reviews3014.
- Sutton, V.R., Wowk, M.E., Cancilla, M., and Trapani, J.A. (2003) Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors, *Immunity*, 18, 319–329, doi: 10.1016/s1074-7613(03)00050-5.
- 25. Goping, I.S., Barry, M., Liston, P., Sawchuk, T., Constantinescu, G., Michalak, K.M., Shostak, I.,

Roberts, D.L., Hunter, A.M., Korneluk, R., and Bleackley, R.C. (2003) Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition, *Immunity*, **18**, 355–365, doi: 10.1016/s1074-7613(03)00032-3.

- Wowk, M.E., and Trapani, J.A. (2004) Cytotoxic activity of the lymphocyte toxin granzyme B, *Microbes Infect.*, 6, 752–758, doi: 10.1016/j.micinf.2004.03.008.
- 27. Heibein, J.A., Goping, I.S., Barry, M., Pinkoski, M.J., Shore, G.C., Green, D.R., and Bleackley, R.C. (2000) Granzyme B-mediated cytochrome *c* release is regulated by the Bcl-2 family members Bid and Bax, *J. Exp. Med.*, **192**, 1391–1402, doi: 10.1084/jem.192.10.1391.
- Wang, G.Q., Wieckowski, E., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Rabinovitz, A., Gambotto, A., Li, S., Fang, B., Yin, X.M., and Rabinowich, H. (2001) Resistance to granzyme Bmediated cytochrome *c* release in Bak-deficient cells, *J. Exp. Med.*, **194**, 1325–1337, doi: 10.1084/jem.194.9.1325.
- Cosentino, K., and Garcia-Saez, A.J. (2017) Bax and Bak pores: Are we closing the circle? *Trends Cell Biol.*, 27, 266–275, doi: 10.1016/j.tcb.2016.11.004.
- Kale, J., Osterlund, E.J., and Andrews, D.W. (2018) BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death, *Cell Death Differ.*, 25, 65–80, doi: 10.1038/cdd.2017.186.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell*, **91**, 479–489, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80434-1.
- 32. Li, J., and Yuan, J. (2008) Caspases in apoptosis and beyond, *Oncogene*, **27**, 6194–6206, doi: 10.1038/onc.2008.297.
- Dorstyn, L., Akey, C.W., and Kumar, S. (2018) New insights into apoptosome structure and function, *Cell Death Differ.*, 25, 1194–1208, doi: 10.1038/s41418-017-0025-z.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization, *Mol. Cell*, 1, 949–957, doi: 10.1016/s1097-2765(00)80095-7.
- Chang, H.Y., and Yang, X. (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 821–846, doi: 10.1128/mmbr.64.4.821-846.2000.
- 36. Li, Y., Zhou, M., Hu, Q., Bai, X.-C., Huang, W., Scheres, S.H.W., and Shi, Y. (2017) Mechanistic insights into caspase-9 activation by the structure of the apoptosome holoenzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 1542–1547, doi: 10.1073/pnas.1620626114.
- Darmon, A.J., Nicholson, D.W., and Bleackley, R.C. (1995) Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B, *Nature*, **377**, 446–448, doi: 10.1038/377446a0.
- Quan, L.T., Tewari, M., O'Rourke, K., Dixit, V., Snipas, S.J., Poirier, G.G., Ray, C., Pickup, D.J., and Salvesen, G.S. (1996) Proteolytic activation of the cell death protease Yama/CPP32 by granzyme B, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 1972–1976, doi: 10.1073/ pnas.93.5.1972.
- Luthi, A.U., and Martin, S.J. (2007) The CASBAH: a searchable database of caspase substrates, *Cell Death Differ.*, 14, 641–650, doi: 10.1038/sj.cdd.4402103.
- Julien, O., and Wells, J.A. (2017) Caspases and their substrates, *Cell Death Differ.*, 24, 1380–1389, doi: 10.1038/ cdd.2017.44.
- Han, J., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Froelich, C.J., Yin, X.M., and Rabinowich, H. (2004) Degradation of Mcl-1 by granzyme B: implications for Bim-mediated mitochondrial apoptotic events, *J. Biol. Chem.*, 279, 22020–22029, doi: 10.1074/jbc.M313234200.

- Han, J., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Rabinovitz, A., and Rabinowich, H. (2005) Disruption of Mcl-1·Bim complex in granzyme B-mediated mitochondrial apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **280**, 16383–16392, doi: 10.1074/jbc. M411377200.
- Matsumura, S., Van De Water, J., Kita, H., Coppel, R.L., Tsuji, T., Yamamoto, K., Ansari, A.A., and Gershwin, M.E. (2002) Contribution to antimitochondrial antibody production: cleavage of pyruvate dehydrogenase complex-E2 by apoptosis-related proteases, *Hepatology*, 35, 14–22, doi: 10.1053/jhep.2002.30280.
- 44. Siddiqui, W.A., Ahad, A., and Ahsan, H. (2015) The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update, *Arch. Toxicol.*, **89**, 289–317, doi: 10.1007/s00204-014-1448-7.
- 45. Sarosiek, K.A., Chi, X., Bachman, J.A., Sims, J.J., Montero, J., Patel, L., Flanagan, A., Andrews, D.W., Sorger, P., and Letai, A. (2013) BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response, *Mol. Cell*, **51**, 751–765, doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.048.
- Ben Safta, T., Ziani, L., Favre, L., Lamendour, L., Gros, G., Mami-Chouaib, F., Martinvalet, D., Chouaib, S., and Thiery, J. (2015) Granzyme B-activated p53 interacts with Bcl-2 to promote cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis, *J. Immunol.*, **194**, 418–428, doi: 10.4049/jimmunol.1401978.
- 47. Wang, S., Xia, P., Shi, L., and Fan, Z. (2012) FADD cleavage by NK cell granzyme M enhances its self-association to facilitate procaspase-8 recruitment for auto-processing leading to caspase cascade, *Cell Death Differ.*, **19**, 605–615, doi: 10.1038/cdd.2011.130.
- Hou, Q., Zhao, T., Zhang, H., Lu, H., Zhang, Q., Sun, L., and Fan, Z. (2008) Granzyme H induces apoptosis of target tumor cells characterized by DNA fragmentation and Biddependent mitochondrial damage, *Mol. Immunol.*, 45, 1044–1055, doi: 10.1016/j.molimm.2007.07.032.
- Ewen, C.L., Kane, K.P., and Bleackley, R.C. (2013) Granzyme H induces cell death primarily via a Bcl-2-sensitive mitochondrial cell death pathway that does not require direct Bid activation, *Mol. Immunol.*, 54, 309–318, doi: 10.1016/j.molimm.2012.12.020.
- Shi, L., Wu, L., Wang, S., and Fan, Z. (2009) Granzyme F induces a novel death pathway characterized by Bid-independent cytochrome *c* release without caspase activation, *Cell Death Differ.*, 16, 1694–1706, doi: 10.1038/ cdd.2009.101.
- Van Damme, P., Maurer-Stroh, S., Hao, H., Colaert, N., Timmerman, E., Eisenhaber, F., Vandekerckhove, J., and Gevaert, K. (2010) The substrate specificity profile of human granzyme A, *Biol. Chem.*, **391**, 983–997, doi: 10.1515/BC.2010.096.
- Beresford, P.J., Zhang, D., Oh, D.Y., Fan, Z., Greer, E.L., Russo, M.L., Jaju, M., and Lieberman, J. (2001) Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspaseindependent nuclease to induce single-stranded DNA nicks, J. Biol. Chem., 276, 43285–43293, doi: 10.1074/ jbc.M108137200.
- Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D.Y., Zhang, D., and Lieberman, J. (2003) Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor, *Cell*, **112**, 659–672, doi: 10.1016/s0092-8674(03)00150-8.
- Martinvalet, D., Zhu, P., and Lieberman, J. (2005) Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis, *Immunity*, 22, 355–370, doi: 10.1016/j.immuni.2005.02.004.
- Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. (2003) Митохондриальный комплекс I, Успехи биологической химии, 43, 19–58.

- Zhu, J., Vinothkumar, K.R., and Hirst, J. (2016) Structure of mammalian respiratory complex I, *Nature*, 536, 354–358, doi: 10.1038/nature19095.
- Fiedorczuk, K., Letts, J.A., Degliesposti, G., Kaszuba, K., Skehel, M., and Sazanov, L.A. (2016) Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I, *Nature*, 538, 406–410, doi: 10.1038/nature19794.
- Martinvalet, D., Dykxhoorn, D.M., Ferrini, R., and Lieberman, J. (2008) Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death, *Cell*, 133, 681–692, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.032.
- Jacquemin, G., Margiotta, D., Kasahara, A., Bassoy, E.Y., Walch, M., Thiery, J., Lieberman, J., and Martinvalet, D. (2015) Granzyme B-induced mitochondrial ROS are required for apoptosis, *Cell Death Differ.*, 22, 862–874, doi: 10.1038/cdd.2014.180.
- Ricci, J.E., Muñoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G.A., Yadava, N., Scheffler, I.E., Ellisman, M.H., and Green, D.R. (2004) Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain, *Cell*, **117**, 773–786, doi: 10.1016/j.cell.2004.05.008.
- Hirst, J., and Roessler, M.M. (2016) Energy conversion, redox catalysis and generation of reactive oxygen species by respiratory complex I, *Biochim. Biophys. Acta*, 1857, 872–883, doi: 10.1016/j.bbabio.2015.12.009.
- Rodenburg, R.J. (2016) Mitochondrial complex I-linked disease, *Biochim. Biophys. Acta*, 1857, 938–945, doi: 10.1016/j.bbabio.2016.02.012.
- Chiusolo, V., Jacquemin, G., Yonca Bassoy, E., Vinet, L., Liguori, L., Walch, M., Kozjak-Pavlovic, V., and Martinvalet, D. (2017) Granzyme B enters the mitochondria in a Sam50-, Tim22- and mtHsp70-dependent manner to induce apoptosis, *Cell. Death Differ.*, 24, 747–758, doi: 10.1038/cdd.2017.3.
- 64. Martinvalet, D. (2019) Mitochondrial entry of cytotoxic proteases: a new insight into the granzyme B cell death pathway, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 9165214, doi: 10.1155/2019/9165214.
- Grivennikova, V.G., and Vinogradov, A.D. (2006) Generation of superoxide by the mitochondrial complex I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 553–561, doi: 10.1016/ j.bbabio.2006.03.013.
- Murphy, M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem. J.*, 417, 1–13, doi: 10.1042/ BJ20081386.
- Korge, P., Calmettes, G., and Weiss, J.N. (2016) Reactive oxygen species production in cardiac mitochondria after complex I inhibition: modulation by substrate-dependent regulation of the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio, *Free Radic. Biol. Med.*, 96, 22–33, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.002.
- Robb, E.L., Hall, A.R., Prime, T.A., Eaton, S., Szibor, M., Viscomi, C., James, A.M., and Murphy, M.P. (2018) Control of mitochondrial superoxide production by reverse electron transport at complex I, *J. Biol. Chem.*, 293, 9869–9879, doi: 10.1074/jbc.RA118.003647.
- Shidoji, Y., Hayashi, K., Komura, S., Ohishi, N., and Yagi, K. (1999) Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264, 343–347, doi: 10.1006/bbrc.1999.1410.
- Kagan, V.E., Tyurin, V.A., Jiang, J., Tyurina, Y.Y., Ritov, V.B., Amoscato, A.A., Osipov, A.N., Belikova, N.A., Kapralov, A.A., Kini, V., Vlasova, I.I., Zhao, Q., Zou, M., Di, P., Svistunenko, D.A., Kurnikov, I.V., and Borisenko, G.G. (2005) Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors, *Nat. Chem. Biol.*, 1, 223–232, doi: 10.1038/nchembio727.

- Lucken-Ardjomande, S., and Martinou, J.-C. (2008) Granzyme A, a stealth killer in the mitochondrion, *Cell*, 133, 568–570, doi: 10.1016/j.cell.2008.04.031.
- Dotiwala, F., Mulik, S., Polidoro, R.B., Ansara, J.A., Burleigh, B.A., Walch, M., Gazzinelli, R.T., and Lieberman, J. (2016) Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites, *Nat. Med.*, 22, 210–216, doi: 10.1038/nm.4023.
- Kang, S., Brown, H.M., and Hwang, S. (2018) Direct antiviral mechanisms of interferon-gamma, *Immune Netw.*, 18, e33, doi: 10.4110/in.2018.18.e33.
- Hansen, T.H., and Bouvier, M. (2009) MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies, *Nat. Rev. Immunol.*, 9, 503–513, doi: 10.1038/nri2575.
- Вдовин А.С., Филькин С.Ю., Ефимова П.Р., Шитиков С.А., Капранов Н.М., Давыдова Ю.О., Егоров Е.С., Хамаганова Е.Г., Дроков М.Ю., Кузьмина Л.А., Паровични-

кова Е.Н., Ефимов Г.А., Савченко В.Г. (2016) Применение рекомбинантных МНС-тетрамеров для изоляции вирусспецифичных CD<sup>8+</sup>-клеток здоровых доноров: потенциальный подход к клеточной терапии посттрансплантационной цитомегаловирусной инфекции, *Биохимия*, **81**, 1628–1642, doi: 10.1134/ S0006297916110146.

- Biron, C.A., and Brossay, L. (2001) NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections, *Curr. Opin. Immunol.*, 13, 458–464, doi: 10.1016/s0952-7915(00)00241-7.
- Ruella, M., and Kalos, M. (2014) Adoptive immunotherapy for cancer, *Immunol. Rev.*, 257, 14–38, doi: 10.1111/ imr.12136.
- Kim, N., Lee, H.H., Lee, H.J., Choi, W.S., Lee, J., and Kim, H.S. (2019) Natural killer cells as a promising therapeutic target for cancer immunotherapy, *Arch. Pharm. Res.*, 42, 591–606, doi: 10.1007/s12272-019-01143-y.

## **GRANZYMES AND MITOCHONDRIA**

#### Review

#### D. B. Kiselevsky

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia; E-mail: dkiselevs@mail.ru

Received October 1, 2019 Revised November 1, 2019 Accepted November 4, 2019

Cytotoxic T-lymphocytes and natural killers eliminate infected cells from an organism by triggering programmed cell death (apoptosis). The contents of the lytic granules of killer cells, including pore-forming proteins perforins and proteolytic enzymes granzymes, are released with subsequent penetration into target cells. Granzyme B initiates mitochondria-dependent apoptosis via (i) proapoptotic Bid protein, (ii) Mcl-1 and Bim proteins, or (iii) p53 protein. As a result, cytochrome *c* is released from mitochondria into cytoplasm, causing formation of apoptosomes that provide proteolytic cascade of caspases' activation. Granzymes M, H, and F cause cell death, which is accompanied by the release of cytochrome *c* from mitochondria. Granzyme A induces generation of reactive oxygen species, which promote translocation of the endoplasmic reticulum-associated SET complex to cell nucleus. In cell nucleus granzyme A cleaves the SET thus activating nucleases that cause single-strand DNA breaks. Granzymes A and B penetrate mitochondria and cut the complex I subunits of the respiratory chain. One of the complex I subunits is a target for the caspase-3 as well. Granzyme-dependent damage to complex I leads to ROS generation and cell death.

Keywords: reactive oxygen species, apoptosis, granzymes, mitochondria, programmed cell death

УДК 577.21

## ПРОТЕОГЕНОМИКА ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК – БЛИЖАЙШАЯ ПЕРСПЕКТИВА

## Обзор

## © 2020 С.А. Мошковский<sup>1,2\*</sup>, А.А. Лобас<sup>3</sup>, М.В. Горшков<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, 117997 Москва, Россия; электронная почта: smosh@mail.ru

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121 Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе,

Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.10.2019 После доработки 11.11.2019 Принята к публикации 11.11.2019

Технические достижения в области геномных технологий последних лет привели к взрывному росту исследований живых систем на уровне единичных клеток в масштабах целых транскриптомов. В обзоре представлено как вслед за транскриптомикой свой путь в анализе единичных клеток начинает протеомика. Уже появились первые работы по использованию хроматомасс-спектрометрического анализа полных протеомов на отдельных клетках. Разделение клеток в них осуществляют по аналогии с транскриптомным анализом, например, методом клеточного сортинга, а масс-спектрометрический анализ проводят с помощью модифицированного метода тандемных массовых меток. Объединение результатов транскриптомного и протеомного анализа в рамках протеогеномного подхода к молекулярному профилированию анализируемых клеток улучшит понимание механизмов клеточного взаимодействия как при развитии организмов, так и в различных патологиях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** протеомика, транскриптомика, протеогеномика, анализ единичных клеток, таргетная массовая метка (TMT), масс-спектрометрия.

**DOI:** 10.31857/S0320972520020025

Молекулярное профилирование с использованием омиксных технологий разного вида [1] до недавнего времени имело дело с биологическими образцами, объединяющими свыше нескольких тысяч, а иногда и миллионов отдельных клеток. С учетом того, что участки тканей, состоящие из морфологически сходных клеток, редко встречаются в организмах, сравнение транскриптомов или протеомов таких образцов обладает принципиальным недостатком, который принято называть «средней температурой по больнице». Особенно неблагоприятно этот эффект сказывается на результатах поиска биомаркеров, где неоднородность представленности тех или иных молекул в клетке может приводить к ложно-положительным результатам. Понятно, что более корректными с точки зрения результата могли быть работы по сравнению биологических образцов большого объема в случае анализа биологических жидкостей [2], где молекулы распределены более или менее равномерно, или

однородных клеточных культур, в особенности, синхронизированных [3]. Частично проблему гетерогенности исследуемых образцов решают микродиссекцией: однородные участки ткани выявляют либо визуально, либо с использованием автоматизированного анализа изображений, получаемых под микроскопом. Затем однородные участки разделяют физическими методами и подвергают молекулярному анализу [4].

Таким образом, для молекулярного сравнения тканей многоклеточных организмов омиксными методами, в том числе и в медицинских целях, существует явная потребность в поиске новых подходов для анализа единичных клеток. Первые успехи в этом направлении были достигнуты в области транскриптомов единичных клеток [5]. В настоящем обзоре обсуждаются проблемы появившихся в самое последнее время подходов к протеомному анализу единичных клеток в контексте достижений транскриптомики в этой области, а также возможности интеграции уже на новом уровне результатов этих двух омиксных технологий.

<sup>\*</sup> Адресат для корреспонденции.

### МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК – ТЕХНИЧЕСКИЙ ПРОРЫВ В АНАЛИЗЕ ТРАНСКРИПТОМОВ

Анализ транскриптомов единичных клеток с помощью секвенирования нового поколения (NGS) в последние пять лет интенсивно развивается. Предтечей используемых сейчас методов является флуоресцентное секвенирование РНК in situ (FISSEQ), в котором фиксированную на подложке ткань использовали для получения кДНК, которую также привязывали к клеточному матриксу [6]. Поскольку секвенирование на платформе Illumina, по сути, основано на флуоресцентной спектроскопии, его вариант удалось адаптировать для секвенирования полученной кДНК непосредственно на срезе ткани. В итоге получали достаточно разрешенные изображения по уровню каждого из зарегистрированных транскриптов, подходящие для сравнения интактных клеток и тканей в различных состояниях [7].

Практически сразу после появления первых работ начался взрывообразный рост разработки методов транскриптомики единичных клеток, и уже через несколько лет существовало не меньше пяти альтернативных технических решений [5], работающих, тем не менее, на примерно одинаковых принципах. Сначала необходимо разделить в пространстве клетки или их ядра. Для этого можно использовать, например, сортировку клеток с помощью флуоресценции (FACS), подобно той, которую давно применяли в клеточных сортерах [8]. В итоге клетки по одной располагаются в планшетах для дальнейших манипуляций. Сходным образом клеточный сортер от «BD Biosciences» (США) использует разбавление клеточной суспензии, в ходе чего при ее раскапывании в маленькие лунки планшета в каждой из них статистически оказывается по одной клетке [9]. В еще одном широко используемом техническом решении от компании «10Х Genomics» (США) клетки в специальном микрофлюидном устройстве по одной связываются с особыми гранулами, а полученные комплексы для дальнейшего анализа упаковываются в отдельные масляные капли [10].

Следующий этап после изоляции клеток это подготовка РНК к секвенированию, которая, с некоторыми вариациями, напоминает обычную подготовку к NGS, включающую в себя получение кДНК и расщепление ее на считываемые фрагменты. Однако существенным отличием является потребность в индивидуальном мечении каждой клетки, поскольку кДНК от всех выделенных клеток следует вновь объединить для получения высокой производительности. Поэтому в каждую лунку планшета или на каждую гранулу, используемую в капельной технологии выделения клеток, добавляют индивидуальные, синтезированные комбинаторным путем олигонуклеотидные метки. Впоследствии, после получения огромного набора считываний фрагментов целевой кДНК, по этим меткам уже программным путем распознаются подмножества считываний (ридов), принадлежавшие единичным клеткам [5].

Методы анализа транскриптомов единичных клеток в настоящее время ориентированы, в основном, на анализ кодирующих поли-А-транскриптов. В итоге, в разных вариантах методов, получают полные транскриптомы единичных клеток или т.н. уникальные молекулярные идентификаторы (UMI) генов [11], по которым можно определить их уровень экспрессии в единичных клетках. Предложенные к использованию совсем недавно методы секвенирования транскриптомов единичных клеток конкурируют между собой, а публикации, в основном, сфокусированы на результатах сравнения их эффективности [5, 12].

Вскоре после использования перечисленные выше методы транскриптомики единичных клеток принесли свои плоды в виде ярких, значимых для биологии результатов. В этом обзоре не будет представлен исчерпывающих обзор этих работ, поэтому приведем несколько примеров. Так, по транскриптомам единичных ядер исследователи смогли детализированно проследить за судьбой клеток нервного гребня при их дифференцировке в мышином эмбрионе [13]. В результате было установлено состояние бинарности, когда клетки находятся в состоянии выбора между двумя траекториями их развития, а также выявлены факторы управления их судьбами. В другой работе было показано, что транскриптомика единичных клеток может определять отношение интронных и экзонных последовательностей в кодирующих белки транскриптах, и был предложен подход для оценки кинетики концентрации индивидуальных РНК (RNA velocity) [14]. Если многие транскрипты содержали интронные последовательности, значит транскрипция только началась, а продукт будет наращивать свою концентрацию. Наоборот, присутствие только зрелых, сплайсированных транскриптов означает конечную фазу экспрессии данного гена. Этот остроумный подход позволил оценивать тенденции экспрессии генов в масштабах единичных клеток по одному «снимку» транскриптома [15]. Особенно важна роль единичных клеток в центральной нервной системе. Выделить нейроны без их разрушения, как представляется, почти невозможно, но транскриптомика единичных клеточных ядер также нашла широкое применение в нейронауках. Транскриптомы единичных ядер позволяют картировать и кластеризовать нейроны коры головного мозга, дополняя другие виды функционального картирования. Сравнение клеток коры человека и мыши позволило выявить существенный консерватизм устройства некоторых ключевых участков, а также выявить видо-специфические черты [16]. Важные эволюционные выводы удалось сделать при анализе единичных клеток головного мозга четырех видов приматов, включая человека [17].

Таким образом, за считанные годы своего существования транскриптомика единичных клеток революционным образом изменила подход к наблюдению за клеточными процессами *in vivo*. Благодаря этому подходу были охарактеризованы многие клеточные типы, которые не нельзя было отличить морфологическими микроскопическими методами [18].

#### ПРОТЕОМИКА ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК

Поскольку амплификация белков, подобная полимеразной цепной реакции для нуклеиновых кислот, недоступна, протеомика отстает от методов анализа нуклеиновых кислот по аналитической чувствительности [19]. В случае протеомики анализ единичных клеток по своей природе предъявляет еще большие требования по этому параметру, в то время как микроскопия и клеточный сортинг, основанные на флуоресценции, уже давно предоставляли возможность для работы с единичными клетками. Флуоресцентные белки, например, слитые с интересующими продуктами генно-инженерным путем, использовали для исследования накопления этих продуктов в реальном времени, на уровне единичных клеток [20]. К недостаткам этой группы методов относится потребность в генетических манипуляциях, эффекты от которых могут исказить процессы, происходящие в модельных клетках.

Еще более разнообразны методы анализа единичных клеток, основанные на распознавании интересующих клеток антителами и другими специфически связующими молекулами. Технология клеточного сортинга, основу которой заложили более полувека назад [21], стала самым распространенным методом анализа единичных клеток на белковом уровне [22]. Даже хорошо известный метод Вестерн-блоттинга был адаптирован для анализа единичных клеток, когда их сортируют по микролункам планшета и после лизиса переносят на гель для связывания с антителами [23].

Т.н. масс-цитометрический метод был предложен для анализа отдельных белков на уровне единичных клеток. В этом методе количественные измерения таргетных белков осуществляются с использованием антител, коньюгированных с ионами переходных металлов. Белковые комплексы, содержащие такие антитела, поступают в источник ионизации на основе индуктивно-связанной плазмы (ICP), где происходит ионизация переходных металлов с последующим измерением масс-спектров стабильных изотопов этих металлов с использованием времяпролетного масс-анализатора. С помощью масс-цитометрии была продемонстрирована возможность количественного профилирования иммунного отклика на уровне единичных клеток [24]. В настоящее время этот метод все чаще используется для анализа единичных клеток, например, когда интерес исследователей сфокусирован на ограниченной группе белков. Так, в развивающихся кроветворных клетках с помощью масс-цитометрии проводили количественный анализ ответственных за дифференцировку этих клеток транскрипционных факторов [25].

Следует отметить, что все основанные на антителах методы имеют ряд принципиальных ограничений в случае единичных клеток. Во-первых, при их масштабировании, когда технология становится по-настоящему омиксной, тестирование десятков или даже сотен отдельных антител на предмет перекрестных взаимодействий становится практически невозможным. В основном, антитела проходят отбор на связывание своей мишени, в то время как остается неизвестным, способны ли они связывать структурно сходные мотивы в других белках. Кроме того, антительные методы ограничены проницаемостью клеток и необходимостью диффузии реагента через концентрированное клеточное содержимое [26].

Что же с классической протеомикой, основанной на масс-спектрометрии, где белки и пептиды анализируются напрямую, без применения аффинных реагентов? В режиме панорамной протеомики, направленной на выявление всех белков клетки, с масс-спектрометрическими детекторами высокого разрешения возможна идентификация и полуколичественный анализ белковых продуктов примерно десяти тысяч генов в клеточных линиях, что близко к теоретической оценке всего продуцируемого протеома какого-либо клеточного типа [27]. Однако такой анализ до недавнего времени проводили для протеомов, полученных от десятков и сотен тысяч клеток. Есть ли перспективы у панорамного протеомного анализа единичных

клеток с точки зрения аналитической чувствительности? Действительно, детекторы, используемые в настоящее время в масс-спектрометрии, демонстрируют, по биологическим меркам, высочайшую чувствительность, будучи способными зарегистрировать от нескольких сотен до нескольких тысяч ионов, удерживаемых в ионной ловушке масс-анализатора [28]. При этом, согласно одному из последних мета-анализов, количество молекул белка в дрожжевой клетке составляет ~40 млн [29], а в опухолевой клетке *HeLa* – примерно на два порядка больше [30]. Даже с учетом гетерогенности природных белков, многочисленных потерь на стадиях обработки образца между белком в интактной клетке и регистрируемым ионом пептида от этого белка, которые включают клеточный лизис и трипсинолиз, хроматографию и ионизацию, ситуация с регистрацией протеома единичной клетки методом панорамной протеомики не кажется такой уж безнадежной. Это иллюстрируется исследованиями последних лет, когда было предложено несколько подходов к анализу единичных клеток посредством хроматомасс-спектрометрии, широко принятой в протеомике. Вопервых, проблема чувствительности снимается при анализе очень больших клеток, когда можно использовать обычные методики без существенных изменений. С такими клетками исследователи сталкиваются в эмбриологии. Например, в недавно опубликованном исследовании удалось отследить изменения протеома единичных ооцитов при их созревании in vitro [31]. При массе белка на клетку, по оценкам авторов, равной 100 нг, из единичного ооцита удавалось идентифицировать 450 белков. Кроме того, анализировали единичные бластомеры при делении яйца шпорцевой лягушки на стадии крупных бластомеров, в одном удавалось идентифицировать ~1400 белков! [32]. Привлекательной представляется еще не вполне реализованная идея протеомного анализа гигантских нейронов моллюсков, тела которых могут достигать диаметра 400 мкм [33]. При исследовании этого объекта знание о дифференциально продуцирующихся белках может помочь расшифровать важные механизмы работы нервной системы, в частности, раскрыть материальную основу памяти [34].

Гигантские клетки — привлекательная модель для анализа, однако очевидна потребность в исследовании протеома клеток обычных размеров, например, опухолевых или кроветворных клеток диаметром 10–30 мкм. Первые шаги в этом направлении уже сделаны. Авторы этих первых работ использовали клеточную сортировку с помощью микрофлюидики, наподобие той, которую применяли для транскриптомных исследований единичных клеток. После разделения клетки подвергали обработке, т.н. «тандемными массовыми метками» (ТМТ, tandem mass tag) [35]. Подход с использованием мультиплексных ТМТ-меток обеспечивает одновременный количественный анализ нескольких образцов за счет мечения пептидов в каждом из них изотопными метками, которые проявляют себя после фрагментации пептидных ионов в масс-спектрометре. Химические метки сконструированы таким образом, что они имеют одинаковую молекулярную массу, однако после фрагментации пептидов в масс-спектрометре за счет комбинаций встроенных стабильных тяжелых изотопов <sup>13</sup>С и <sup>15</sup>N их фрагменты приобретают различную массу, в зависимости от присоединенной метки. В настоящее время в коммерческих наборах, доступных на рынке, достигается возможность достигать мультиплексности до 16 ТМТ-меток и проводить количественный анализ их протеомов друг относительно друга (TMT 10-plex, 11-plex, 16-plex, наборы компании «Thermo Fisher Scientific», США).

Именно такие наборы ТМТ-меток использовали Slavov et al. для первой демонстрации панорамной протеомики единичных клеток человека [36]. Метод назвали SCoPE-MS (Single Cell ProtEomics by Mass Spectrometry). Клетки разделяли по одной на лазерном сортере (FACS) и помещали в лунки микропланшета (рисунок, а). Одновременно использовали т.н. «носитель» помещенные в отдельную лунку 200 клеток того же типа. Этот носитель должен обеспечить сигнал для идентификации белков обычным панорамным методом, а единичные клетки должны были сравниваться с сигналом носителя. Действительно, с помощью ТМТ в первом эксперименте удалось количественно проанализировать более 700 белков в каждой из восьми исследуемых клеток (из 10 ТМТ-меток одну оставили для контроля, а одной пометили 200 клеток «носителя», рисунок, б). Для работы с белками на пределе чувствительности пришлось изменить настройки масс-спектрометра высокого разрешения на основе ионной ловушки Orbitrap [37] и модернизировать методы обработки первичных масс-спектрометрических данных для идентификации и количественного анализа [38]. За первой, демонстрационной работой по SCoPE-MS последовала следующая, в которой предложенная методика была существенно улучшена с целью повышения производительности [39]. Методом SCoPE2 за 85 ч работы хроматомасс-спектрометра с использованием 11комплексного набора ТМТ удалось проанализи-

ровать протеомы 356 единичных моноцитов и макрофагов из иммортализованных клеточных линий. По протеомам, в которых был проведен количественный анализ ~2 тыс. белков, удалось хорошо разделить две клеточные популяции. Безусловно, проблемой использования ТМТ по сравнению с транскриптомикой является значительно более низкая мультиплексность этого метода и возможность анализа всего 10 клеток одновременно, тогда как при секвенировании РНК все клетки снова смешиваются на чипе секвенатора с надежным разделением результатов программными методами. В целом, результаты, полученные методом SCoPE2, дают повод для осторожного оптимизма.

Другие исследователи также начали работу по анализу единичных клеток с использованием массовых меток и тандемной масс-спектрометрии. Так, в недавней статье описан анализ 72 мышиных клеток с глубиной анализа каждой из них, доходящей до 1600 идентифицированных белков [40]. Процедура заняла около двух суток, что сопоставимо со скоростью анализа моноцитов и макрофагов в ранее упомянутой работе [39]. Клетки разделяли и распределяли по «нанолункам» специального чипа на серийном сортере BD. После этого процедуру пробо-подготовки, включая химическую модификацию белков и гидролиз протеазами, осуществляли с помощью особой роботизированной системы nanoPOTS, где все реакции проходили в каплях нанометрового размера [41].

В процессе подготовки этого материала в открытом доступе появился препринт, описывающий сходное по исполнению исследование единичных клеток линии лейкоза с использованием клеточного сортинга и тандемных массовых меток [42]. Как и в предыдущих работах, хромато-масс-спектры меченых единичных клеток сравнивали с носителем (авторы называли его «boost») из 500 клеток. Для количественного анализа использовали режим получения тандемных масс-спектров (MS2), а также в других запусках прибора получали фрагменты фрагментов трипсиновых пептидов (MS3). Для анализа данных авторы разработали вычислительный конвейер SCeptre, который еще предстоит оценить рецензентам для дальнейшей публикации статьи в журнале.

Очевидно, что методы, позволяющие анализировать протеомы единичных клеток при помощи панорамной масс-спектрометрии, остаются уделом немногих лабораторий, работающих на пределе возможностей технологии, в том числе, с использованием уникальных, сконструированных в лабораторных условиях устройств, в отличие от транскриптомики, где технические



Протеомика единичных клеток с детекцией на основе тандемных массовых меток (ТМТ), по [36] с изменениями. Сначала клетки с помощью стандартного клеточного сортинга помещают в лунки микропланшета, где их расщепляют протеазами по особому протоколу (*a*). Затем осуществляют мечение набором ТМТ, а для сравнения используют образец-«носитель» из 100 или более клеток. Количественный анализ проводят на хромато-масс-спектрометре высокого разрешения (*б*)

решения для анализа единичных клеток полностью коммерциализированы [5]. Также следует отметить, что упомянутые результаты первых работ по панорамной протеомике единичных клеток [36, 39, 40, 42] пока требуют подтверждения ортогональными методами, например, с использованием специфичных антител.

## НА ПУТИ К ПРОТЕОГЕНОМИКЕ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК

Интеграция данных омиксных технологий, в случае нуклеиновых кислот и белков обозначаемая как протеогеномика, позволяет более эффективно оценивать молекулярные каскады, вовлеченные в те или иные процессы [43], а также обнаруживать протеоформы и выяснять их функциональность [44]. Здесь и далее, под протеоформами мы понимаем продукты одного и того же гена, различающиеся за счет генного полиморфизма, альтернативного сплайсинга и посттранскрипционных модификаций мРНК, а также протеолитического расщепления и посттрансляционных модификаций белков [45].

В случае протеогеномики единичных клеток существуют два возможных направления развития. Для тех, кто создает уникальные методы, можно задуматься об анализе в рамках одной и той же клетки, и транскриптома, и протеома [46], по аналогии с анализом образцов большего объема, например, биоптатов злокачественных опухолей [47]. Уникальные молекулярные траектории отдельных клеток в таких процессах, как дифференцировка или онтогенез, можно будет рассматривать на двух сочетанных уровнях. Что же касается пользователей стандартизованных протеомных методов, то им, как представляется, также можно воспользоваться разрастающимся банком данных по транскриптомике единичных клеток. Качество секвенирования РНК в некоторых исследованиях уже позволяет производить в транскриптомах отдельных клеток поиск единичных участков полиморфизма (SNP) [48]. Соответственно, в субпопуляциях клеток различных органов и тканей может быть предсказано обогащение несинонимичными SNP, возникшими вследствие мутагенеза или посттранскрипционных модификаций, например, редактирования РНК. Анализ новых протеоформ, предсказанных из данных транскриптомики единичных клеток, может быть осуществлен на группах клеток традиционными таргетными или панорамными протеомными методами. Например, основываясь на данных панорамного протеомного анализа методами хроматомасс-спектрометрии, мы недавно показали, что редактирование РНК ферментами ADAR модифицирует разные белки в глиальных и нейрональных клетках головного мозга мыши [49]. Поиск аналогичных участков редактирования в данных транскриптомики единичных клеток [50] мог бы значительно облегчить понимание функционального значения этого явления.

Таким образом, несмотря на отсутствие амплификации, которая способствует быстрому развитию способов анализа нуклеиновых кислот в единичных клетках, панорамная протеомика также движется к завоеванию своего места в этой области. Несомненным остается то, что оптимальные результаты по анализу молекулярных траекторий единичных клеток в различных процессах могут быть достигнуты при интеграции технологий анализа генной экспрессии и продукции белков.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 17-15-01229).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая работа не содержит описания исследований, выполненных с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Horgan, R.P., and Kenny, L.C. (2011) "Omic" technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics, *Obstet. Gynaecol.*, 13, 189–195, doi: 10.1576/toag.13.3.189.27672.
- Geyer, P.E., Voytik, E., Treit, P. V, Doll, S., Kleinhempel, A., Niu, L., Müller, J.B., Buchholtz, M., Bader, J.M., Teupser, D., Holdt, L.M., and Mann, M. (2019) Plasma proteome profiling to detect and avoid sample-related biases in biomarker studies, *EMBO Mol. Med.*, doi: 10.15252/emmm. 201910427.
- Banfalvi, G. (2011) Overview of cell synchronization, *Methods Mol. Biol.*, **761**, 1–23, doi: 10.1007/978-1-61779-182-6 1.
- 4. Emmert-Buck, M.R., Bonner, R.F., Smith, P.D., Chuaqui, R.F., Zhuang, Z., Goldstein, S.R., Weiss, R.A.,

and Liotta, L.A. (1996) Laser capture microdissection, *Science*, **274**, 998–1001, doi: 10.1126/science.274. 5289.998.

- Ziegenhain, C., Vieth, B., Parekh, S., Reinius, B., Guillaumet-Adkins, A., Smets, M., Leonhardt, H., Heyn, H., Hellmann, I., and Enard, W. (2017) Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods, *Mol. Cell*, 65, 631–643, doi: 10.1016/j.molcel.2017.01.023.
- Lee, J.H., Daugharthy, E.R., Scheiman, J., Kalhor, R., Yang, J.L., Ferrante, T.C., Terry, R., Jeanty, S.S.F., Li, C., Amamoto, R., Peters, D.T., Turczyk, B.M., Marblestone, A.H., Inverso, S.A., Bernard, A., Mali, P., Rios, X., Aach, J., and Church, G.M. (2014) Highly multiplexed subcellular RNA sequencing *in situ*, *Science*, **343**, 1360–1363, doi: 10.1126/ science.1250212.

- Lee, J.H., Daugharthy, E.R., Scheiman, J., Kalhor, R., Ferrante, T.C., Terry, R., Turczyk, B.M., Yang, J.L., Lee, H.S., Aach, J., Zhang, K., and Church, G.M. (2015) Fluorescent in situ sequencing (FISSEQ) of RNA for gene expression profiling in intact cells and tissues, *Nat. Protoc.*, 10, 442–458, doi: 10.1038/nprot.2014.191.
- Picelli, S., Faridani, O.R., Björklund, Å.K., Winberg, G., Sagasser, S., and Sandberg, R. (2014) Full-length RNAseq from single cells using Smart-seq2, *Nat. Protoc.*, 9, 171–181, doi: 10.1038/nprot.2014.006.
- 9. Valihrach, L., Androvic, P., and Kubista, M. (2018) Platforms for single-cell collection and analysis, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 807, doi: 10.3390/ijms19030807.
- Zheng, G.X.Y., Terry, J.M., Belgrader, P., Ryvkin, P., Bent, Z.W., Wilson, R., Ziraldo, S.B., Wheeler, T.D., McDermott, G.P., Zhu, J., Gregory, M.T., Shuga, J., Montesclaros, L., Underwood, J.G., Masquelier, D.A., Nishimura, S.Y., Schnall-Levin, M., Wyatt, P.W., Hindson, C.M., Bharadwaj, R., Wong, A., Ness, K.D., Beppu, L.W., Deeg, H.J., McFarland, C., Loeb, K.R., Valente, W.J., Ericson, N.G., Stevens, E.A., Radich, J.P., Mikkelsen, T.S., Hindson, B.J., and Bielas, J.H. (2017) Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells, *Nat. Commun.*, **8**, 14049, doi: 10.1038/ncomms14049.
- Islam, S., Zeisel, A., Joost, S., La Manno, G., Zajac, P., Kasper, M., Lönnerberg, P., and Linnarsson, S. (2014) Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers, *Nat. Methods*, **11**, 163–166, doi: 10.1038/ nmeth.2772.
- Zhang, X., Li, T., Liu, F., Chen, Y., Yao, J., Li, Z., Huang, Y., and Wang, J. (2019) Comparative analysis of droplet-based ultra-high-throughput single-cell RNA-seq systems, *Mol. Cell*, 73, 130–142, doi: 10.1016/j.molcel.2018.10.020.
- Soldatov, R., Kaucka, M., Kastriti, M.E., Petersen, J., Chontorotzea, T., Englmaier, L., Akkuratova, N., Yang, Y., Häring, M., Dyachuk, V., Bock, C., Farlik, M., Piacentino, M.L., Boismoreau, F., Hilscher, M.M., Yokota, C., Qian, X., Nilsson, M., Bronner, M.E., Croci, L., Hsiao, W.-Y., Guertin, D.A., Brunet, J.-F., Consalez, G.G., Ernfors, P., Fried, K., Kharchenko, P.V., and Adameyko, I. (2019) Spatiotemporal structure of cell fate decisions in murine neural crest, *Science*, **364**, 9536, doi: 10.1126/science.aas9536.
- La Manno, G., Soldatov, R., Zeisel, A., Braun, E., Hochgerner, H., Petukhov, V., Lidschreiber, K., Kastriti, M.E., Lönnerberg, P., Furlan, A., Fan, J., Borm, L.E., Liu, Z., van Bruggen, D., Guo, J., He, X., Barker, R., Sundström, E., Castelo-Branco, G., Cramer, P., Adameyko, I., Linnarsson, S., and Kharchenko, P.V. (2018) RNA velocity of single cells, *Nature*, **560**, 494–498, doi: 10.1038/s41586-018-0414-6.
- Burgess, D.J. (2018) Full speed ahead for single-cell analysis, *Nat. Rev. Genet.*, **19**, 668–669, doi: 10.1038/s41576-018-0049-3.
- Hodge, R.D., Bakken, T.E., Miller, J.A., Smith, K.A., Barkan, E.R., Graybuck, L.T., Close, J.L., Long, B., Johansen, N., Penn, O., Yao, Z., Eggermont, J., Höllt, T., Levi, B.P., Shehata, S.I., Aevermann, B., Beller, A., Bertagnolli, D., Brouner, K., Casper, T., Cobbs, C., Dalley, R., Dee, N., Ding, S.-L., Ellenbogen, R.G., Fong, O., Garren, E., Goldy, J., Gwinn, R.P., Hirschstein, D., Keene, C.D., Keshk, M., Ko, A.L., Lathia, K., Mahfouz, A., Maltzer, Z., McGraw, M., Nguyen, T.N., Nyhus, J., Ojemann, J.G., Oldre, A., Parry, S., Reynolds, S., Rimorin, C., Shapovalova, N. V, Somasundaram, S., Szafer, A., Thomsen, E.R., Tieu, M., Quon, G.,

Scheuermann, R.H., Yuste, R., Sunkin, S.M., Lelieveldt, B., Feng, D., Ng, L., Bernard, A., Hawrylycz, M., Phillips, J.W., Tasic, B., Zeng, H., Jones, A.R., Koch, C., and Lein, E.S. (2019) Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex, *Nature*, **573**, 61–68, doi: 10.1038/s41586-019-1506-7.

- Khrameeva, E., Kurochkin, I., Han, D., Guijarro, P., Kanton, S., Santel, M., Qian, Z., Rong, S., Mazin, P., Bulat, M., Efimova, O., Tkachev, A., Guo, S., Sherwood, C.C., Camp, J.G., Paabo, S., Treutlein, B., and Khaitovich, P. (2019) Single-cell-resolution transcriptome map of human, chimpanzee, bonobo, and macaque brains, *bioRxiv*, **764936**, doi: 10.1101/764936.
- Shekhar, K., and Menon, V. (2019) Identification of cell types from single-cell transcriptomic data, *Methods Mol. Biol.*, **1935**, 45–77, doi: 10.1007/978-1-4939-9057-3\_4.
- Archakov, A., Ivanov, Y., Lisitsa, A., and Zgoda, V. (2009) Biospecific irreversible fishing coupled with atomic force microscopy for detection of extremely low-abundant proteins, *Proteomics*, 9, 1326–1343, doi: 10.1002/pmic. 200800598.
- Aymoz, D., Wosika, V., Durandau, E., and Pelet, S. (2016) Real-time quantification of protein expression at the single-cell level via dynamic protein synthesis translocation reporters, *Nat. Commun.*, 7, 11304, doi: 10.1038/ ncomms11304.
- Fulwyler, M.J. (1965) Electronic separation of biological cells by volume, *Science*, **150**, 910–911, doi: 10.1126/science.150.3698.910.
- Picot, J., Guerin, C.L., Le Van Kim, C., and Boulanger, C.M. (2012) Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation, *Cytotechnology*, **64**, 109–130, doi: 10.1007/s10616-011-9415-0.
- Hughes, A.J., Spelke, D.P., Xu, Z., Kang, C.-C., Schaffer, D. V, and Herr, A.E. (2014) Single-cell western blotting, *Nat. Methods*, 11, 749–755, doi: 10.1038/nmeth.2992.
- Bendall, S.C., Simonds, E.F., Qiu, P., Amir, El-ad D., Krutzik, P.O., Finck, R., Bruggner, R. V., Melamed, R., Trejo, A., Ornatsky, O.I., Balderas, R.S., Plevritis, S.K., Sachs, K., Pe'er, D., Tanner, S.D., and Nolan, G.P. (2011) Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across human hematopoietic continuum, *Science*, 332, 687–696, doi: 10.1126/science.1198704.
- Palii, C.G., Cheng, Q., Gillespie, M.A., Shannon, P., Mazurczyk, M., Napolitani, G., Price, N.D., Ranish, J.A., Morrissey, E., Higgs, D.R., and Brand, M. (2019) Singlecell proteomics reveal that quantitative changes in coexpressed lineage-specific transcription factors determine cell fate, *Cell Stem Cell*, 24, 812–820, doi: 10.1016/j.stem. 2019.02.006.
- Marcon, E., Jain, H., Bhattacharya, A., Guo, H., Phanse, S., Pu, S., Byram, G., Collins, B.C., Dowdell, E., Fenner, M., Guo, X., Hutchinson, A., Kennedy, J.J., Krastins, B., Larsen, B., Lin, Z.-Y., Lopez, M.F., Loppnau, P., Miersch, S., Nguyen, T., Olsen, J.B., Paduch, M., Ravichandran, M., Seitova, A., Vadali, G., Vogelsang, M.S., Whiteaker, J.R., Zhong, G., Zhong, N., Zhao, L., Aebersold, R., Arrowsmith, C.H., Emili, A., Frappier, L., Gingras, A.-C., Gstaiger, M., Paulovich, A.G., Koide, S., Kossiakoff, A.A., Sidhu, S.S., Wodak, S.J., Gräslund, S., Greenblatt, J.F., and Edwards, A.M. (2015) Assessment of a method to characterize antibody selectivity and specificity for use in immunoprecipitation, *Nat. Methods*, **12**, 725–731, doi: 10.1038/nmeth.3472.
- 27. Coscia, F., Watters, K.M., Curtis, M., Eckert, M.A., Chiang, C.Y., Tyanova, S., Montag, A., Lastra, R.R.,

171

Lengyel, E., and Mann, M. (2016) Integrative proteomic profiling of ovarian cancer cell lines reveals precursor cell associated proteins and functional status, *Nat. Commun.*, 7, 12645, doi: 10.1038/ncomms12645.

- Kaur, P., and O'Connor, P.B. (2007) Quantitative determination of isotope ratios from experimental isotopic distributions, *Anal. Chem.*, **79**, 1198–1204, doi: 10.1021/ ac061535z.
- Ho, B., Baryshnikova, A., and Brown, G.W. (2018) Unification of protein abundance datasets yields a quantitative *Saccharomyces cerevisiae* proteome, *Cell Syst.*, 6, 192–205, doi: 10.1016/j.cels.2017.12.004.
- Siwiak, M., and Zielenkiewicz, P. (2013) Transimulation protein biosynthesis web service, *PLoS One*, 8, e73943, doi: 10.1371/journal.pone.0073943.
- Virant-Klun, I., Leicht, S., Hughes, C., and Krijgsveld, J. (2016) Identification of maturation-specific proteins by single-cell proteomics of human oocytes, *Mol. Cell. Proteomics*, **15**, 2616–2627, doi: 10.1074/mcp.M115. 056887.
- Sun, L., Dubiak, K.M., Peuchen, E.H., Zhang, Z., Zhu, G., Huber, P.W., and Dovichi, N.J. (2016) Single cell proteomics using frog (*Xenopus laevis*) blastomeres isolated from early stage embryos, which form a geometric progression in protein content, *Anal. Chem.*, 88, 6653–665, doi: 10.1021/acs.analchem.6b01921.
- Moroz, L.L. (2018) Neurosystematics and periodic system of neurons: model vs reference species at single-cell resolution, ACS Chem. Neurosci., 9, 1884–1903, doi: 10.1021/ acschemneuro.8b00100.
- 34. Chesnokova, E., Zuzina, A., Bal, N., Vinarskaya, A., Roshchin, M., Artyuhov, A., Dashinimaev, E., Aseyev, N., Balaban, P., and Kolosov, P. (2019) Experiments with snails add to our knowledge about the role of aPKC subfamily kinases in learning, *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 2117, doi: 10.3390/ijms20092117.
- Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Johnstone, R., Mohammed, A.K.A., and Hamon, C. (2003) Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS, *Anal. Chem.*, 75, 1895–904, doi: 10.1021/ac0262560.
- Budnik, B., Levy, E., Harmange, G., and Slavov, N. (2018) SCoPE-MS: mass spectrometry of single mammalian cells quantifies proteome heterogeneity during cell differentiation, *Genome Biol.*, **19**, 161, doi: 10.1186/s13059-018-1547-5.
- Huffman, R.G., Chen, A., Specht, H., and Slavov, N. (2019) DO-MS: data-driven optimization of mass spectrometry methods. *J. Proteome Res.*, 18, 2493–2500, doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00039.
- Chen, A.T., Franks, A., and Slavov, N. (2019) DART-ID increases single-cell proteome coverage, *PLOS Comput. Biol.*, 15, e1007082, doi: 10.1371/journal.pcbi.1007082.
- Specht, H., Emmott, E., Perlman, D.H., Koller, A., and Slavov, N. (2019) High-throughput single-cell proteomics quantifies the emergence of macrophage heterogeneity, *bioRxiv*, 665307, doi: 10.1101/665307.
- 40. Dou, M., Clair, G., Tsai, C.-F., Xu, K., Chrisler, W.B., Sontag, R.L., Zhao, R., Moore, R.J., Liu, T., Pasa-Tolic, L., Smith, R.D., Shi, T., Adkins, J.N., Qian, W.-J., Kelly, R.T., Ansong, C., and Zhu, Y. (2019) High-throughput single cell proteomics enabled by multiplex isobaric labeling in a nanodroplet sample preparation platform, *Anal. Chem.*, 9b03349, doi: 10.1021/acs.analchem.9b03349.

- Zhu, Y., Piehowski, P.D., Zhao, R., Chen, J., Shen, Y., Moore, R.J., Shukla, A.K., Petyuk, V.A., Campbell-Thompson, M., Mathews, C.E., Smith, R.D., Qian, W.-J., and Kelly, R.T. (2018) Nanodroplet processing platform for deep and quantitative proteome profiling of 10–100 mammalian cells, *Nat. Commun.*, 9, 882, doi: 10.1038/s41467-018-03367-w.
- 42. Schoof, E.M., Rapin, N., Savickas, S., Gentil, C., Lechman, E., Haile, J.S., auf dem Keller, U., Dick, J.E., and Porse, B.T. (2019) A quantitative single-cell proteomics approach to characterize an acute myeloid leukemia hierarchy, *bioRxiv*, 745679, doi: 10.1101/745679.
- Johansson, H.J., Socciarelli, F., Vacanti, N.M., Haugen, M.H., Zhu, Y., Siavelis, I., Fernandez-Woodbridge, A., Aure, M.R., Sennblad, B., Vesterlund, M., Branca, R.M., Orre, L.M., Huss, M., Fredlund, E., Beraki, E., Garred, Ø., Boekel, J., Sauer, T., Zhao, W., Nord, S., Höglander, E.K., Jans, D.C., Brismar, H., Haukaas, T.H., Bathen, T.F., Schlichting, E., Naume, B., Luders, T., Borgen, E., Kristensen, V.N., Russnes, H.G., Lingjaerde, O.C., Mills, G.B., Sahlberg, K.K., Børresen-Dale, A.-L., and Lehtiö, J. (2019) Breast cancer quantitative proteome and proteogenomic landscape, *Nat. Commun.*, 10, 1600, doi: 10.1038/s41467-019-09018-y.
- 44. Dimitrakopoulos, L., Prassas, I., Diamandis, E.P., Nesvizhskii, A., Kislinger, T., Jaffe, J., and Drabovich, A. (2016) Proteogenomics: opportunities and caveats, *Clin. Chem.*, **62**, 551–557, doi: 10.1373/clinchem.2015.247858.
- 45. Smith, L.M., and Kelleher, N.L. (2013) Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat. Methods*, **10**, 186–187, doi: 10.1038/nmeth.2369.
- 46. Simões, A.E., Pereira, D.M., Amaral, J.D., Nunes, A.F., Gomes, S.E., Rodrigues, P.M., Lo, A.C., D'Hooge, R., Steer, C.J., Thibodeau, S.N., Borralho, P.M., and Rodrigues, C.M. (2013) Efficient recovery of proteins from multiple source samples after trizol(®) or trizol(®)LS RNA extraction and long-term storage, *BMC Genomics*, 14, 181, doi: 10.1186/1471-2164-14-181.
- Mun, D.-G., Bhin, J., Kim, S., Kim, H., Jung, J.H., Jung, Y., Jang, Y.E., Park, J.M., Kim, H., Jung, Y., Lee, H., Bae, J., Back, S., Kim, S.-J., Kim, J., Park, H., Li, H., Hwang, K.-B., Park, Y.S., Yook, J.H., Kim, B.S., Kwon, S.Y., Ryu, S.W., Park, D.Y., Jeon, T.Y., Kim, D.H., Lee, J.-H., Han, S.-U., Song, K.S., Park, D., Park, J.W., Rodriguez, H., Kim, J., Lee, H., Kim, K.P., Yang, E.G., Kim, H.K., Paek, E., Lee, S., Lee, S.-W., and Hwang, D. (2019) Proteogenomic characterization of human early-onset gastric cancer, *Cancer Cell*, 35, 111–124, doi: 10.1016/j.ccell.2018.12.003.
- Poirion, O., Zhu, X., Ching, T., and Garmire, L.X. (2018) Using single nucleotide variations in single-cell RNA-seq to identify subpopulations and genotype-phenotype linkage, *Nat. Commun.*, 9, 4892, doi: 10.1038/s41467-018-07170-5.
- Levitsky, L.I., Kliuchnikova, A.A., Kuznetsova, K.G., Karpov, D.S., Ivanov, M.V., Pyatnitskiy, M.A., Kalinina, O.V., Gorshkov, M.V., and Moshkovskii, S.A. (2019) Adenosineto-inosine RNA editing in mouse and human brain proteomes, *Proteomics*, 1900195, doi: 10.1002/pmic. 201900195.
- Ximerakis, M., Lipnick, S.L., Innes, B.T., Simmons, S.K., Adiconis, X., Dionne, D., Mayweather, B.A., Nguyen, L., Niziolek, Z., Ozek, C., Butty, V.L., Isserlin, R., Buchanan, S.M., Levine, S.S., Regev, A., Bader, G.D., Levin, J.Z., and Rubin, L.L. (2019) Single-cell transcriptomic profiling of the aging mouse brain, *Nat. Neurosci.*, 22, 1696–1708, doi: 10.1038/s41593-019-0491-3.

#### Review

S. A. Moshkovskii<sup>1,2\*</sup>, A. A. Lobas<sup>3</sup>, and M. V. Gorshkov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow, Russia; E-mail: smosh@mail.ru
 <sup>2</sup> Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia
 <sup>3</sup> Talroze Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Semenov Federal Research Center of Chemical Physics,

Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

Received October 15, 2019 Revised November 11, 2019 Accepted November 11, 2019

Recently technical advances in genomic technology led to explosive growth of transcriptome-wide studies at the level of single cells. The review describes the beginning of single-cell proteomics which started soon after transcriptomic methods were developed. Thus, first studies have been published that used liquid chromatography-mass spectrometry to analyze shotgun proteomes of single cells. In these works, cells were separated by methods used in transcriptomics, e.g., by cell sorting, and mass-spectrometric analysis was performed by a modified method of tandem mass tags. Data integration of single cell transcriptomics and proteomics as a proteogenomic approach will provide better understanding of mechanisms of cell interactions in normal development and disease.

Keywords: proteomics, transcriptomics, proteogenomics, single cell analysis, target mass tag (TMT), mass spectrometry

УДК 543.94

## ИЗОТЕРМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОАНАЛИЗЕ

## Обзор

#### © 2020 О.Л. Бодулев, И.Ю. Сахаров\*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: sakharovivan@gmail.com

> Поступила в редакцию 13.08.2019 После доработки 01.11.2019 Принята к публикации 01.11.2019

В последние годы бурно развиваются методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот как альтернатива полимеразной цепной реакции (ПЦР). Их использование позволяет проводить амплификацию нуклеиновых кислот при постоянной температуре в отличие от ПЦР, для которой требуется циклическое изменение температуры. Кроме того, при использовании изотермических методов амплификация может проводиться непосредственно в живых клетках. В настоящем обзоре в краткой форме изложены принципы известных изотермических методов амплификации, а также продемонстрирована их высокая эффективность при конструировании новых высокочувствительных методов анализа как нуклеиновых кислот, так и ферментов, ответственных за их модификацию. Более того, приведены данные об успешном использовании изотермических методов амплификации в анализе клеток и биомолекул, определение которых проводится с применением ДНК/РНК-аптамеров.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** нуклеиновые кислоты, амплификация, изотермическая, биоанализ, аптамеры. **DOI:** 10.31857/S0320972520020037

Количественное и качественное определение нуклеиновых кислот является чрезвычайно важным направлением в современной биологии и медицине. Начиная с 1990-х гг., данная область науки активно развивается, и, вероят-

\* Адресат для корреспонденции.

но, число исследований в этой области будет продолжать расти в следующие десятилетия. Обнаружение ДНК/РНК патогенных бактерий и вирусов может иметь решающее значение для выбора правильной стратегии лечения пациентов. Недавние открытия указали на взаимосвязь между восприимчивостью людей к некоторым заболеваниям и однонуклеотидными полиморфизмами или короткими вставками/делециями. Также было показано, что гены микроРНК человека часто встречаются вблизи геномных регионов и сайтов, связанных с раком. Уровень экспрессии некоторых микроРНК у пациентов с хроническим лимфолейкозом, колоректальной неоплазией, лимфомой Беркитта, раком легких, крупноклеточными лимфомами, глиобластой и другими заболеваниями отличается от уровня экспрессии в нормальных тканях.

Помимо врачей в развитии высокочувствительных методов анализа нуклеиновых кислот чрезвычайно заинтересованы специалисты пищевой химии, т.к. эти методы с большой достоверностью и точностью позволяют проводить оценку качества пищевых продуктов [1]. Методы анализа нуклеиновых кислот также давно и успешно используются в криминалистике [2].

Принятые сокращения: LAMP – петлевая изотермическая амплификация (Loop-mediated isothermal Amplification); NASBA – метод амплификации, основанный на последовательности нуклеиновых кислот (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification); HDA – хеликаза-зависимая амплификация (Helicase-Dependent Amplification); EXPAR – экспоненциальная реакция амплификации нуклеиновых кислот (Exponential Amplification Reaction); SDA – амплификация с замещением цепи (Strand-Displacement Amplification); RPA – рекомбиназная полимеразная амплификация (Recombinase Polymerase Amplification); RCA – метод катящегося кольца (Rolling Circle Amplification); WGA – полногеномная амплификация (Whole Genome Amplification); MDA – амплификация со множественным замещением цепи (Multiple Displacement Amplification); pWGA – полногеномный метод амплификации с применением праймазы (Primase-based Whole Genome Amplification); EASA - метод экзонуклеаза III-зависимой циклизации аналита (Exonuclease III-Assisted Signal Amplification); ICSDP – амплификационный метод с полимеризацией и замещением (Isothermal Circular-Strand-Displacement Polymerization); HCR – реакция цепной гибридизации (Hybridization Chain Reaction); CHA - метод каталитической сборки шпилек (Catalytic Hairpin Assembly).

Обнаружение последовательностей нуклеиновых кислот без предварительной очистки в биологических образцах и непосредственно в живых организмах является крайне актуальной задачей. В основе таких методов анализа лежит реакция гибридизации, что определяет их высокую селективность. С учетом того, что концентрации нуклеиновых кислот в исследуемых образцах практически всегда крайне низкие, а их изменения в случае патологии могут быть незначительными, требуются методы с чрезвычайно высокой чувствительностью и низким пределом обнаружения. Для этого в настоящее время детектирующие методы анализа ДНК/РНК сопрягаются с различными вариантами полимеразной цепной реакции (ПЦР). Данный метод широко используется на практике и является высокоэффективным, т.к. он позволяет синтезировать до 10<sup>9</sup> копий (ампликонов) анализируемой последовательности. Однако данный метод имеет ряд недостатков. Так, при проведении ПЦР возможна неспецифическая гибридизация, приводящая к накоплению посторонних продуктов.

Для количественного определения нуклеиновых кислот широко используется ПЦР с детекцией продукта в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [3]. Существуют два основных варианта ПЦР-РВ. В первом варианте используется Тад ДНК-полимераза и линейный зонд (технология TaqMan), во втором варианте – интеркалирующие красители, такие как SYBR Green, Eva Green, BOXTO и др., флуоресценция которых значительно возрастает при их связывании с двухцепочечной молекулой ДНК. Линейный диапазон ПЦР-РВ лежит в диапазоне от 10 до 5 · 10<sup>9</sup> копий анализируемой последовательности [4]. Чувствительность метода сильно варьирует и зависит от структуры использованных праймеров. Для ПЦР-РВ характерна высокая воспроизводимость.

Циклическое изменение температуры, требуемое при проведении методов с применением ПЦР, способствует неспецифической гибридизации праймеров и ампликонов [5]. Более того, для осуществления циклического изменения температуры в ходе ПЦР необходимо использование дорогостоящего оборудования. Следует также отметить, что в силу необходимости проведения дуплексного плавления в ходе ПЦР, которое проводится путем нагревания, данный метод не может быть использован для обнаружения нуклеиновых кислот в живых клетках.

Вышеупомянутые ограничения ПЦР стимулировали разработку различных изотермических амплификационных платформ для обнаружения ДНК/РНК. Целью данного обзора является описание известных к настоящему времени изотермических методов амплификации, их преимуществ и ограничений применения в биоанализе.

Описанные к настоящему времени изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот можно разделить на две группы: 1) методы амплификации, осуществляющие повышение аналитического сигнала за счет увеличения концентрации аналита; 2) методы амплификации, позволяющие повышать аналитический сигнал без изменения концентрации аналита.

#### МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЕ ПОВЫШЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКОГО СИГНАЛА ЗА СЧЕТ УВЕЛИЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ АНАЛИТА

Во всех методах изотермической амплификации, направленных на повышение концентрации аналита, используются ферменты.

На рис. 1, *а* приведена схема **петлевой изотермической амплификации (LAMP).** Данный метод впервые был описан Notomi et al. в 2000 г. [6]. В этом методе используются несколько праймеров (чаще четыре, но иногда и шесть), комплементарных разным участкам определяемой ДНК, а также ДНК-полимеразы с высокой способностью к замещению цепей. LAMP проводится при температуре 60 °C.

Данная реакция инициируется прямым внутренним праймером, который на первом этапе гибридизуется с комплементарным фрагментом молекулы ДНК-аналита, расположенным в районе 5'-конца, а затем достраивается ДНК-полимеразой. На следующем этапе прямой внешний праймер гибридизируется с 5'-концовым фрагментом аналита, после чего также элонгируется полимеразой, при этом вытесняя ранее синтезированную последовательность. Затем обратный внутренний праймер взаимодействует с комплементарным участком вновь синтезированной последовательности, расположенным вблизи 3'-конца. После достраивания этого праймера с синтезированной последовательностью ДНК гибридизуется обратный внешний праймер, который также ферментативно достраивается, при этом вытесняя ранее синтезированную последовательность. На концах обеих синтезированных последовательностей за счет комплементарных взаимодействий формируются петлеобразные структуры. Таким образом, в результате проведения указанных выше реакций синтезируются две структуры с петлями на обоих концах. Получение таких молекул инициирует последующие циклы амп-



**Рис. 1.** Схемы изотермических методов амплификации нуклеиновых кислот с применением полимераз: *a* – петлевая изотермическая амплификация ДНК (LAMP); *б* – метод амплификации, основанный на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA); *в* – хеликаза-зависимая амплификация ДНК (HDA); *г* – экспоненциальная реакция амплификации нуклеиновых кислот (EXPAR); *д* – метод амплификации с замещением цепи (SDA); *е* – рекомбиназная полимеразная амплификация (PПА); *ж* – амплификация по принципу катящегося кольца (RCA)

лификации с использованием тех же праймеров [7].

Амплификация LAMP носит экспоненциальный характер и позволяет получить до 10<sup>9</sup> копий ДНК в течение 15–60 мин. Использование нескольких праймеров обеспечивает высокую специфичность копирования. При применении обратной транскрипции LAMP позволяет также амплифицировать молекулы PHK.

Продукты реакции, образующиеся в LAMP, чаще всего регистрируются либо с помощью электрофореза, либо по измерению мутности среды, которая изменяется в результате образования пирофосфата магния [8]. Концентрация образующегося в ходе LAMP пирофосфата может также оцениваться с помощью флуоресцентного красителя кальцеина (флуорексона) [9]. Для детекции образовавшейся ДНК используется интеркалирование различных красителей [10, 11]. Благодаря своей простоте, LAMP прекрасно сочетается с микрофлюидными технологиями, что позволяет автоматизировать метод с одновременным уменьшением времени анализа, а также сократить расход реагентов [11].

LAMP широко используется как скрининговый метод, т.к. он проводится при постоянной температуре, а также является высокоэффективным и специфичным. В литературе описано применение LAMP для выявления палочки Коха, герпеса, тяжелого острого респираторного синдрома, сибирской язвы, а также вирусов гриппа человека, птицы и др. [12, 13]. Метод, разработанный для определения *Leptospira* с применением LAMP, позволил детектировать ДНК данного патогена в концентрации от 200 пг/мл. Специфичность, оценка которой проводилась с использованием 172 бактериальных штаммов, составила 100% [12].

С помощью LAMP диагностируются не только бактериальные патогены и вирусы, но также и заболевания, вызываемые простейшими. Одним из таких патогенов является малярийный плазмодий. В исследовании Poschl et al. [14] в качестве метода сравнения был использован метод ПЦР, специфичность LAMP для Plasmodium falciparum составила 100%. Все ПЦРотрицательные образцы для данного возбудителя также были отрицательными при диагностике с помощью LAMP. При диагностике Plasmodium vivax методом LAMP обнаружены 22 из 23 ПЦР-положительных образцов. Все 82 ПЦР-отрицательных образца также были отрицательными в анализе с использованием LAMP. Таким образом. для диагностики видов Plasmodium применение метода LAMP так же оправданно, как и ПЦР. К сожалению, при использовании LAMP в некоторых случаях были зарегистрированы ложноположительные результаты [15]. LAMP также был успешно применен для выявления *in situ Salmonella* в пищевых продуктах и *stxA*<sub>2</sub> в *Escherichia coli* O157:H7 [15a, 156].

Недавно при исследовании штаммов Burkholderia mallei и Burkholderia pseudomallei было показано, что с помощью LAMP праймеры выявляли ДНК не всех анализируемых штаммов, к генам-мишеням которых они были смоделированы, но были способны направлять синтез фрагментов генов гетерологичных штаммов [16]. По мнению авторов, неудовлетворительные результаты, полученные при проведении LAMP, могут быть обусловлены наличием GC-богатых областей в геноме исследованных бактерий и формированием вторичных структур при температуре проведения LAMP.

Следует отметить, что LAMP проявляет более высокую специфичность относительно ПЦР за счет использования как минимум шести участков связывания праймера с анализируемой последовательностью. Утверждается, что чувствительность LAMP выше чувствительности ПЦР на порядок. Более того, LAMP менее чувствительна к ингибиторам, присутствующим в биологических образцах [17]. Серьезным недостатком данного метода является высокий риск контаминации, часто приводящий к получению ложноположительных результатов в отрицательных контролях [18].

Другим изотермическим методом амплификации нуклеиновых кислот, приводящим к повышению концентрации аналита, является метод амплификации, основанный на последовательности нуклеиновых кислот\* (NASBA). В этом методе, разработанном Дж. Комптоном в 1991 г., амплификация молекул РНК проводится при участии трех ферментов, таких как обратная транскриптаза вируса миелобластоза птиц, РНКаза H и T7 PHK-полимераза [19]. NASBA включает в себя две стадии: ацикличную и цикличную (рис. 1,  $\delta$ ).

На первой стадии денатурированная при 65 °С РНК взаимодействует со специфическим праймером, содержащим промоторную последовательность Т7 РНК-полимеразы. В присутствии обратной транскриптазы фермент синтезирует последовательность ДНК по одноцепочечной РНК, формируя гибрид РНК/ДНК. Данная реакция, как и все последующие, проводится обычно при 41 °С. Полученный гибрид

<sup>\*</sup> Хотя, по мнению авторов, название данного метода является чрезвычайно неинформативным, именно оно используется в научной англоязычной литературе. Более верно, с нашей точки зрения, было бы назвать его методом изотермической амплификации РНК, основанным на последовательности нуклеиновых кислот.

подвергается расшеплению РНКазой Н, а образующаяся однонитевая ДНК реагирует со вторым праймером, который достраивается с образованием двухцепочечной ДНК. Далее при участии Т7 РНК-полимеразы на матрице ДНК синтезируются РНК, комплементарные анализируемой ДНК. Образующиеся молекулы РНК взаимодействуют со вторым праймером, в процессе достраивания он образует гибрид РНК/ДНК, который, в свою очередь, расщепляется РНКазой Н. На этом этапе образующаяся одноцепочечная ДНК реагирует с первым праймером, который удлиняется в присутствии обратной транскриптазы, а Т7 РНК-полимераза синтезирует копии исходной РНК, благодаря чему происходит запуск следующего цикла амплификации.

Преимуществом NASBA относительно ПЦР с обратной транскрипцией является использование одной и той же реакционной среды для реакции обратной транскрипции и последующей реакции амплификации. Показано, что NASBA обладает большей чувствительностью и является менее затратным по времени, чем ПЦР. Эффективность этого экспоненциального метода составляет 10<sup>9</sup> копий аналита. Следует отметить, что, несмотря на высокую эффективность экспоненциальных амплификационных методов, для них характерна неспецифическая амплификация, которая приводит к получению ложноположительных результатов.

Сразу после разработки NASBA был применен для диагностики ВИЧ-инфекции в сыворотке крови пациентов [20]. В настоящее время данный метод широко используется при выявлении бактерий рода *Salmonella*, вирусов гепатита и папилломы, энтеровирусов человека. NASBA был также применен для определения мРНК и микроРНК [21, 22].

Обычно продукты NASBA регистрируются методом электрофореза с использованием этидия бромида. Также применяются микрофлюидные системы и биочипы с использованием зондов, меченных флуоресцентными красителями или пероксидазой [11, 21]. С использованием в качестве метки пероксидаза-подобного ДНКзима NASBA был применен для детекции и дифференциации штаммов вируса чумы свиней [23]. NASBA используется и в сочетании с методом планшетного олигонуклеотидного анализа. Такой подход был успешно применен для определения реовируса белого амура [24]. Разработанный метод способен специфически детектировать 14 копий/мкл в течение 5 ч.

Следует отметить, что в случае применения NASBA довольно часто регистрируются ложноположительные и ложноотрицательные результаты. В то же время NASBA менее чувствителен к ингибиторам, присутствующим в биологических образцах, чем ПЦР [25].

Хеликаза-зависимая амплификация (HDA) является аналогом ПЦР, расплетение цепей ДНК проводится не за счет повышения температуры, а под действием хеликазы (рис. 1, в) [26]. В этом методе используются хеликаза, ДНК-полимераза и белки, связывающие одноцепочечные ДНК. На первом этапе амплификационного цикла к обоим концам двухцепочечной ДНК присоединяются молекулы хеликазы, что приводит к расплетению дуплекса. С высвобожденной из дуплекса однонитевой ДНК, стабилизированной ДНК-связывающими белками, гибридизуются прямой и обратный праймеры, после чего в присутствии ДНК-полимеразы осуществляется их элонгация. Таким образом, при завершении первого цикла HDA из одной молекулы ДНК образуется две. В дальнейшем этот процесс многократно повторяется, приводя к увеличению концентрации исследуемого аналита. Данный метод характеризуется экспоненциальной кинетикой амплификации, его эффективность достигает 10<sup>7</sup> копий аналита [27]. Следует отметить, что HDA обычно проводится при двух температурах: при 37 °С или в интервале между 60 и 65 °С. При пониженной температуре применяется репаративный белок MutL, в то время как при более высоких температурах использование данного белка не требуется. Следует отметить, что понижение температуры проведения амплификации повышает концентрацию неспецифических продуктов амплификации, что, в свою очередь, может приводить к появлению ложноположительных результатов [28].

Важно отметить, что степень фоновой амплификации в HDA выше, чем в ПЦР [29]. Для минимизации взаимодействия праймеров между собой описаны способы их модификации [30]. Другой подход для минимизации фоновой амплификации – использование таких соединений, как диметилсульфоксид, бетаин, сорбитол, которые, к сожалению, также могут ингибировать и полимеразу. Для той же цели используются высокомолекулярные краудинг-агенты, такие как, например, полиэтиленгликоль. Они повышают эффективность полимеразы, одновременно уменьшая степень взаимодействия праймеров между собой [28].

При сравнении методов HDA с флуоресцентной детекцией и ПЦР-РВ было показано, что при использовании ПЦР-РВ наблюдаются меньшие значения предела обнаружения аналита, а полученные концентрационные зависимости лучше линеаризуются. Так, при анализе ДНК *Mycobacterium tuberculosis* методом HDA предел обнаружения составил 1 фМ, в то время как для ПЦР-РВ – 100 аМ [28].

Описано применение метода HDA в клиническом анализе для выявления различных бактериальных и вирусных инфекций, а также патогенов в воде и пище. Обычно продукты HDA регистрируются методом электрофореза с применением этидия бромида. Кроме того, применяются латеральные проточные методы, биочипы и электрохимические биосенсоры. Так, в работе Tang et al. [31] метод HDA был использован в сочетании с латеральным проточным методом для определения *Salmonella typhimurium* в воде, предел обнаружения составил 100 KOE/мл.

Метод HDA с электрохимической детекцией сигнала был использован для количественного определения бактерий рода *Salmonella* [32]. Молекулы захватывающей ДНК иммобилизовали на поверхности электрода, а один из праймеров модифицировали флуоресцеином. В качестве детектирующей системы использовали конъюгат антител против флуоресцеина с пероксидазой хрена. Предел обнаружения составил 10 копий ДНК.

Данный метод был применен также для детекции патогена *Phytophthora kernoviae* в листьях растений с использованием ДНК-чипов [33]. В этом случае предел обнаружения составил 10 нг/мл. Объединение HDA и планшетного олигоферментного анализа позволило разработать колориметрический метод для идентификации и количественного определения *Karlodinium veneficum* и *Karlodinium armiger* [34]. Предел обнаружения данного метода составил 50 КОЕ/мл. Разработанный метод был применен для выявления *Karlodinium* spp. в морской воде.

Кроме детекции патогенов HDA был успешно использован при разработке метода анализа микроРНК, перспективных онкомаркеров. Так, Ma et al. [35] описали чувствительный флуоресцентный метод определения микроРНК miR-21. Предел обнаружения этого метода составил 12,8 фМ, линейный диапазон — от 100 фМ до 10 нМ.

В методе, получившем название экспоненциальная реакция амплификации нуклеиновых кислот (EXPAR) [36], используется зонд, который представляет собой две одинаковые последовательности, комплементарные анализируемой нуклеиновой кислоте и соединенные между собой через сайт рестрикции никазы (рис. 1, *г*). В процессе определения аналит гибридизуется с одной из копий зонда с образованием дуплексов двух типов. Один из дуплексов, в котором аналит присоединен к 5'-концу зонда, не может быть элонгирован полимеразой и достаточно быстро диссоциирует при температуре проведения EXPAR (60 °C). В другом дуплексе аналит присоединен к 3'-концу зонда, что позволяет ДНК-полимеразе элонгировать анализируемую последовательность. При образовании дуплекса завершается формирование специфического сайта расщепления никазы. Последующий ферментативный гидролиз дуплекса никазой приводит к его диссоциации с появлением дополнительной копии аналита. В EXPAR широко используются никазы Nt.BbvCI, Nb.BbvCI, AlwI, Nt.AlwI, Nb.BssSI, Nt.BsmAI и Nb.BtsI.

В следующем цикле повторно происходит элонгация аналита ДНК-полимеразой и расщепление синтезированной последовательности никазой. В EXPAR используются такие коммерчески доступные ферменты, как полимераза phi 29, фрагмент Кленова, полимеразы Vent и Bst, у которых отсутствует 3'-5' экзонуклеазная активность. Хотя оптимальным температурным интервалом для проведения EXPAR является 55-60 °C, эта реакция может проводиться и при 37 °C. В последнем случае предпочтительно использовать фрагмент Кленова [36]. Более высокая температура амплификации повышает эффективность и специфичность EXPAR.

Таким образом, EXPAR осуществляет экспоненциальное накопление молекул аналита. Следует отметить, что данный метод амплификации может использоваться исключительно для амплификации коротких олигонуклеотидов и позволяет достигать эффективности 10<sup>8</sup> копий аналита [27].

В отличие от других методов амплификации, в которых короткие праймеры используются в высокой концентрации, в данном методе в высокой концентрации применяется зонд, по длине превосходящий анализируемую последовательность в 2 раза. В связи с этим возможна димеризация зонда с последующим образованием неспецифических продуктов амплификации. Степень фоновой амплификации зависит от строения используемых зондов. Так, наличие в зонде фрагментов, обогащенных нуклеотидами G и A, может усугублять фоновую амплификацию в силу связывания полимераз с пуриновыми основаниями. Отмечается, что фоновая амплификация может быть также следствием формирования зондом структуры шпильки. На сегодняшний день не разработан эффективный способ подавления фоновой амплификации в EXPAR [36].

Впервые использование EXPAR для детекции ДНК-олигонуклеотидов было описано в 2003 г. [37]. Впоследствии EXPAR был применен для повышения чувствительности флуоресцентного метода количественного определения фрагмента мРНК гена *p53*. Предел обнаружения при его детекции в реальном времени составил

10 фМ, рабочий диапазон — от 10 фМ до 10 нМ [38]. В работе Li et al. [39] сочетание колориметрического метода детекции с использованием золотых наночастиц и EXPAR было применено для анализа микроРНК. Достигнутый предел обнаружения составил 46 фМ, линейный диапазон — от 50 фМ до 10 нМ. Кроме того, EXPAR был успешно применен для детекции метилирования ДНК и мутаций РНК.

EXPAR с использованием аптамеров был применен для определения белковых молекул, а именно тромбина, тромбоцитарного фактора роста и муцина 1 [36, 40]. Этот метод также использовался для определения катионов ртути, предел обнаружения которых составил 100 пМ [41].

Метод EXPAR позволяет повысить чувствительность методов определения некоторых ферментов. Описаны методы определения активности теломеразы (в клетках HeLa) [42], метилтрансферазы и урацил-ДНК-гликозидазы [36, 43].

Механизм метода амплификации с замещением цепи (SDA), впервые описанного в 1992 г., основан на циклической реакции, включающей в себя стадии полимеризации, расщепления и замещения [44]. Схема SDA представлена на рис. 1, д. На первой стадии осуществляется термическая денатурация двухцепочечной ДНК при 95 °С (остальные этапы SDA проводятся при 37 °C). Это позволяет праймерам сформировать комплексы с каждой из дочерних цепей. Следует отметить, что фрагменты 5'-концов используемых праймеров, не взаимодействующие с ДНК-аналитом, содержат сайт расщепления никазы. Фрагмент Кленова (без экзонуклеазной активности) катализирует удлинение 3'-концов последовательностей ДНК, приводя к образованию дуплексов с активным сайтом расщепления никазы. В результате ферментативного гидролиза никазой образуются новые 3'-концевые последовательности, что инициирует реакцию полимеризации с одновременным замещением дочерней анализируемой цепи. Данный процесс повторяется многократно. Таким образом, в ходе SDA происходит экспоненциальная аккумуляция анализируемых последовательностей. При использовании в рамках данного метода одного праймера вместо двух происходит линейная амплификация. SDA позволяет достигать эффективности, равной 10<sup>7</sup> копий аналита [27].

Как и другие методы амплификации, SDA применяется для детекции геномной ДНК. Анализ таких сложных образцов, содержащих бактерии и вирусы, как кровь человека, успешно проводится с помощью SDA, что указывает на перспективность его использования в медикобиологических исследованиях.

За счет своей высокой специфичности данный метод амплификации был успешно применен для выявления однонуклеотидных полиморфизмов. Так, в работе Shi et al. [45] описан хемилюминесцентный метод детекции точечных мутаций. Использование в данном методе магнитных частиц позволило значительно понизить величину предела обнаружения (0,1 фМ).

SDA может применяться для определения высокомолекулярных PHK, состоящих из сотен и даже тысяч нуклеотидов, таких как вирусная PHK, мPHK и pPHK. Zhao et al. предложили двухэтапные колориметрический и флуоресцентный методы, в которых сначала проводится расщепление PHK ДНКзимом, а затем амплификация с помощью SDA [46]. Этот метод был также применен для количественного определения микроPHK и раковых клеток [47, 48]. При детекции микроPHK предел обнаружения составил 16 фМ, линейный диапазон – от 16 фМ до 100 нМ. Предел обнаружения клеток Рамоса был равен 45 клеток/мл, а линейный диапазон данного метода – 45–1000 клеток/мл.

На основе SDA Ding et al. [49] разработали чувствительный метод определения активности теломеразы. Этот флуоресцентный метод с использованием молекулярного маяка позволил измерить активность теломеразы, содержащейся в четырех клетках HeLa.

В последние годы для аналитических целей активно применяются аптамеры. В связи с тем, что аптамеры по своей химической природе являются ДНК/РНК-олигонуклеотидами, такие методы анализа пытаются комбинировать с методами амплификации нуклеиновых кислот. Описаны методы, основанные на взаимодействии аптамеров с тромбином и кокаином, чувствительность данных методов была существенно повышена за счет применения SDA [50, 51]. Поскольку в настоящее время описано большое число аптамеров к различным молекулам, такой подход представляется достаточно перспективным.

Рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA) – еще один изотермический метод амплификации нуклеиновых кислот [27, 52]. Начиная с 2006 г., когда Найл Армес впервые описал RPA [53], интерес к нему растет год от года. В этом методе на первом этапе амплификационного цикла происходит образование комплекса рекомбиназы с прямым и/или обратным праймером (рис. 1, *e*). В присутствии комплементарной праймеру последовательности фермент расплетает дуплекс, что позволяет праймеру специфически вступать во взаимодействие с аналитом.

Осуществлению этой реакции содействуют ДНК-связывающие белки. В присутствии ДНКполимеразы со способностью к замещению цепи происходит разрушение рекомбиназного комплекса, а полимераза связывается с двухцепочечной ДНК и элонгирует праймер с 3'-конца. Вновь синтезированный дуплекс служит матрицей для следующего цикла. При использовании двух праймеров (прямого и обратного) по окончании реакции образуются два полуконсервативных дуплекса. Таким образом, RPA характеризуется экспоненциальным типом амплификации. Следует отметить, что при использовании одного праймера наблюдается линейный тип амплификации.

RPA может проводиться при 22–45 °С, но оптимальное значение температуры лежит в интервале 37–42 °С [52]. Для амплификации используются как одноцепочечные, так и двухцепочечные ДНК, а также метилированные ДНК. Как было продемонстрировано, RPA может проводиться в присутствии ингибиторов ПЦР, таких как гепарин, этанол и гемоглобин [53]. Это, в отличие от ПЦР, позволяет проводить амплификацию непосредственно в биологических образцах (таких как молоко, моча, кал, плевральная жидкость) после предварительного термического лизиса [54]. В то же время RPA ингибируется такими детергентами, как SDS и СТАВ.

RPA проводится как в гомогенной, так и в гетерогенной средах. В случае гетерогенной амплификации один или оба праймера иммобилизуются на твердой поверхности. Несмотря на высокую скорость гомогенной амплификации, гетерогенный подход активно развивается, т.к. в большинстве случаев он позволяет предотвращать матричный эффект и развивать более чувствительные методы анализа. Также отмечается, что применение RPA в гетерогенном формате позволяет уменьшить степень неспецифической амплификации [55].

Хотя RPA — метод быстрый и чувствительный, высокое значение фонового сигнала часто является проблемой при его использовании. Для устранения этого негативного эффекта используется праймер, который содержит сайт расщепления для специфической эндонуклеазы *E. coli* IV (Nfo), которая распознает и расщепляет этот участок в дуплексах [52]. Этот праймер может быть использован на стадии удлинения ДНК-полимеразой только после того, как он был расщеплен эндонуклеазой с появлением гидроксильной группы на 3'-конце. Праймер может быть конъюгирован с флуорофором и тушителем, так что реакция его расщепления сопровождается усилением флуоресценции. Этап расщепления с помощью эндонуклеазы в RPA служит дополнительным этапом, позволяющим уменьшить фоновый сигнал. Отмечается, что RPA и ПЦР сопоставимы по эффективности. Метод позиционируется как наиболее быстрый среди прочих методов амплификации [54].

Описано использование RPA в сочетании с различными методами детекции для определения различных патогенов. Так, в работе Мауboroda et al. [55] данный метод был использован для определения ДНК *Y. pestis*. При этом прямой праймер был иммобилизован в лунках планшета для иммуноферментного анализа, а обратный праймер модифицирован биотином, который впоследствии использовался для присоединения конъюгата пероксидазы со стрептавидином. С использованием колориметрического субстрата пероксидазы (3,3',5,5'-тетраметилбензидина) достигнут предел обнаружения 0,3 фМ. Линейный диапазон при этом составлял от 10 фМ до 10 нМ.

Следует отметить, что метод RPA часто сочетается с электрохимическим методом детекции. С помощью такого подхода Ng et al. [56] смогли разработать амперометрический биосенсор, позволяющий определять 1 КОЕ ДНК *Мусоbacterium tuberculosis*. В другом электрохимическом методе в качестве медиатора использовали комплекс рутения  $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ , который был интеркалирован в двухцепочечную ДНК [57]. Предел обнаружения аналита предложенным методом составил 11 КОЕ/мл.

Альтернативными электрохимическому методу детекции являются хемилюминесценция, флуоресценция и поверхностное комбинационное рассеяние. Недавно с применением RPA был сконструирован флуоресцентный сенсор в виде браслета, который способен определять специфическую ДНК вируса Зика в условиях реального времени [58].

Достаточно распространенным амплификационным методом, направленным на повышение концентрации детектируемой последовательности, является **метод катящегося кольца** (**RCA**), разработанный в 1995 г. [59]. Как видно на рис. 1,  $\mathcal{K}$ , в основе этого метода лежит использование кольцевой ДНК. Кольцевая ДНК (С-проба) формируется при взаимодействии анализируемой последовательности с одноцепочечным ДНК-зондом, содержащим на своих концах последовательности, комплементарные аналиту. При формировании такого комплекса 5'- и 3'-концы соединяются в кольцо. Замыкание кольца происходит в результате лигирования сближенных концов С-пробы.

В дальнейшем кольцевая ДНК гибридизуется с праймером, который в присутствии ДНК-

полимеразы элонгируется, приводя к образованию последовательности, состоящей из многочисленных участков, повторяющих ДНК-аналит.

В RCA наиболее часто используются ДНКполимеразы phi 29 и Bst. Обычно данная реакция проводится при 30–37 °С [60]. Линейная амплификация при постоянной температуре занимает от нескольких часов до нескольких дней, что приводит к синтезу многочисленных копий аналита. Эффективность RCA оценивается в 10<sup>3</sup> копий аналита.

Недавно описана модификация RCA, в которой в реакционную смесь также добавляется второй праймер, гибридизующийся с последовательностью, элонгированной с использованием первого праймера. Введение второго праймера приводит к тому, что амплификация приобретает экспоненциальный характер [60].

Метод RCA широко используется при разработке методов определения бактериальных и вирусных ДНК/РНК и микроРНК. Более того, RCA является высокоспецифическим методом за счет применения ДНК-лигазы, катализирующей лигирование лишь в случае точной координации 3'- и 5'-концевых последовательностей [61, 62], в связи с чем данный метод позволяет выявлять однонуклеотидные полиморфизмы [63].

В работе Schopf et al. [64] описано применение RCA при определении геномной ДНК *Mycobacterium tuberculosis*. На первом этапе ДНК обрабатывали рестриктазами и денатурировали при повышенной температуре. Далее производили иммобилизацию ее фрагментов за счет их гибридизации с захватывающими олигонуклеотидами, ковалентно связанными с частицами сефарозного геля. После проведения амплификации с помощью RCA в систему вносили комплементарные анализируемым фрагментам ДНК с флуоресцентными метками. Предел обнаружения описанного метода составил 4,3 фМ анализируемой ДНК и  $10^4$  КОЕ/мл *M. tuberculosis*. Продукты RCA определялись также за счет интеркалирования в дуплекс ДНК красителя SYBR Green. В случае определения микроРНК miRlet-7а предел обнаружения составил 10 фМ, линейный диапазон – от 25 фМ до 1 пМ аналита [65]. Кроме того, применение RCA позволило визуализировать микроРНК семейства let-7 непосредственно в живых раковых клетках легких A549 [66].

Регистрация процесса полимеризации RCA возможна и по накоплению в реакционной среде пирофосфата. В работе Mashimo et al. [67] с помощью аденилил-трансферазы пирофосфат трансформировали в АТФ, после чего определяли концентрацию АТФ биолюминесцентным методом с помощью люциферазы. Предел обнаружения модельного РНК-аналита, определенный этим методом, составил 2 пМ, его линейный диапазон — от 2 пМ до 1 нМ.

RCA использовался для повышения чувствительности метода определения активности метилтрансферазы [68]. Разработанный метод позволил детектировать фермент с концентрацией  $8,1 \times 10^{-5}$  ед/мл. Линейный диапазон данного метода лежит в диапазоне от  $4 \times 10^{-4}$  до  $1 \times 10^{-2}$  ед/мл. Также RCA успешно был применен для детектирования метилирования ДНК [69].

Следует отметить, что метод RCA может быть направлен на повышение аналитического сигнала как за счет повышения концентрации аналита, так и увеличения количества детектируемых меток.

Во всех методах амплификации, приводящих к повышению аналитического сигнала за счет повышения концентрации аналита, используются ДНК-полимеразы, уязвимые к действию ингибиторов, присутствующих в анализируемых образцах. Часто это может приводить к получению ложноотрицательных результатов. С другой стороны, фоновая амплификация, вызванная димеризацией используемых праймеров/зондов, может быть причиной ложноположительных результатов. Минимизировать указанные недостатки позволяет использование методов детекции, высокоспецифичных к анализируемой последовательности.

Все вышеописанные методы амплификации были основаны на применении специфических последовательностей. Вместе с тем были разработаны и изотермические методы усиления с использованием случайных праймеров. Такие методы полногеномной амплификации (WGA) применяются для увеличения количества ДНК, необходимого для ее секвенирования.

Первый вариант WGA, получивший название амплификации со множественным замещением цепи (MDA), был описан в 2001 г. [70]. Этот метод основан на использовании случайных гексамерных праймеров, взаимодействующих с кольцевыми геномами, что проводит к формированию многочисленных репликационных вилок. В MDA используется ДНК-полимераза Phi 29, которая характеризуется повышенной процессивностью и низкой частотой ошибок. Протекание каскада реакций MDA приводит к экспоненциальному накоплению двухцепочечных ДНК и 10<sup>4</sup>-кратному увеличению концентрации плазмидной ДНК в течение нескольких часов.

В 2002 г. этот метод был адаптирован для амплификации линейных геномов (рис. 2, *a*).



продуктов амплификации

**Рис. 2.** Полногеномный метод амплификации: *a* – амплификация с множественным замещением цепи (MDA); *б* – полногеномный метод амплификации с применением праймазы

С применением данного метода наличие 1–10 копий геномной ДНК человека позволяет получить ~20–30 мкг ДНК со средней длиной ~10 кб, которые могут быть использованы для секвенирования и генотипирования.

Альтернативой WGA является полногеномный метод амплификации с применением праймазы (pWGA), который имитирует репликацию ДНК бактериофага T7 in vivo [71]. В присутствии бифункционального белка Т7 др4, обладающего активностями и хеликазы, и праймазы, геномная ДНК расплетается, после чего синтезируется РНК-праймер, комплементарный одноцепочечной ДНК (рис. 2, б). Синтез ДНК катализируется Т7 ДНК-полимеразой, обладающей высокой процессивностью. Как правило, при использовании pWGA в течение 1 ч при 37 °С образуется 1-10 нг геномной ДНК человека. Кольцевую ДНК также можно использовать в качестве матрицы в pWGA. При введении в анализ всего лишь 100 копий коэффициент амплификации достигает 10<sup>8</sup>. Следует отметить, что при

БИОХИМИЯ том 85 вып. 2 2020

применении pWGA удается избежать тепловой денатурации геномной ДНК, которая проводится в MDA.

### МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЕ ПОВЫШЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКОГО СИГНАЛА БЕЗ УВЕЛИЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ АНАЛИТА

Для изотермических амплификационных методов, позволяющих повысить аналитический сигнал без изменения концентрации аналита, характерна линейная кинетика амплификации. Некоторые из них проводятся с применением ферментов, другие — без их участия, что, естественно, делает последние методы более дешевыми, а также лишает их недостатков, типичных для ферментативных методов. Далее будут рассмотрены и те, и другие методы, т.к. все они имеют свои преимущества и недостатки и используются при разработке аналитических методов.

Одним из изотермических амплификационных методов без изменения концентрации аналита является метод экзонуклеаза III-зависимой циклизации аналита (EASA) [7, 72]. Экзонуклеаза III – фермент семейства нуклеаз, катализирующий поэтапное удаление мононуклеотидов с 3'-гидроксилированных концов двухцепочечной ДНК путем гидролиза фосфодиэфирных связей [73], т.е. экзонуклеаза III обладает неспецифической 3'-5' экзонуклеазной активностью. Подходящими субстратами для проявления активности такого фермента являются ДНК с тупыми или утопленными 3'-концами. Следует отметить, что субстраты с выступающими 3'концами при их удлинении на четыре или более нуклеотидов ферментативному расщеплению экзонуклеазой III не подвергаются.

В 2010 г. Plaxco et al. [74] впервые описали принцип EASA (рис. 3). Суть данного амплификационного метода заключается в том, что исследуемая нуклеиновая кислота гибридизуется с ДНК-зондом с образованием двухцепочечной структуры с тупым 3'-концом, что позволяет экзонуклеазе III катализировать поэтапное удаление мононуклеотидов с 3'-конца используемого зонда. В результате ферментативного гидролиза молекула аналита высвобождается и вступает во взаимодействие с другой молекулой зонда, что инициирует следующий цикл амплификации. Таким образом, одна молекула аналита может привести к образованию большого числа молекул, образующихся при гидролизе зонда. Если используемый зонд содержит в своей структуре некую метку, то регистрируемый аналитический сигнал будет амплифицирован. Амплификация обычно проводится при 25 или 37 °С.

Позднее подобные амплификационные методы были развиты с применением T7 экзонуклеазы и λ-экзонуклеазы [75], которые, в отличие



Рис. 3. Схема количественного анализа ДНК-олигонуклеотида с помощью амплификационного метода экзонуклеаза III-зависимой циклизации аналита (EASA)

от экзонуклеазы III, катализируют отщепление мононуклеотидов не с 3'-конца, а с 5'-конца используемого зонда.

В пионерской работе по EASA данный метод был применен для количественного определения модельного ДНК-олигонуклеотида [74]. В этой работе был использован молекулярный маяк, который содержал флуоресцентный краситель на 5'-конце и тушитель на одном из нуклеотидов, расположенных во внутренней области последовательности маяка. При этом за счет самогибридизации формировалась шпилька с выступающим концом, устойчивым к гидролизу экзонуклеазой III. Более того, закрытая структура шпильки удерживала флуорофор в непосредственной близости от тушителя, что приводило к регистрации лишь слабого сигнала флуоресценции. В присутствии ДНК-аналита шпилечная структура маяка раскрывалась с образованием двухцепочечной структуры с тупым 3'концом, что позволяло экзонуклеазе III катализировать удаление мононуклеотидов с этого конца, что, в свою очередь, приводило к высвобождению флуорофора и повышению интенсивности флуоресценции. Одновременно с этим освобожденный аналит взаимодействовал с другой молекулой молекулярного маяка, инициируя следующий цикл EASA. Таким образом, применение EASA позволило разработать простой флуоресцентный метод обнаружения ДНКаналита.

Позднее было опубликовано большое число работ [76–80], в которых EASA применен для повышения чувствительности анализа нуклеиновых кислот, при этом на стадии детекции использовалась не только флуоресценция, но и электрохимия, колориметрия и хемилюминесценция.

Используя в качестве индикаторной реакции взаимодействие  $Hg^{2+}$  с тиминами, разработан метод с применением EASA для количественного определения ионов ртути, предел обнаружения которого составил 1 пМ  $Hg^{2+}$ , а линейный диапазон — от 10 пМ до 100 нМ [79]. Объединение в одном методе EASA и аптамеров позволило разработать методы для определения AT $\Phi$ , лизоцима и тромбина.

Следует особо отметить, что в некоторых работах по определению нуклеиновых кислот предел обнаружения достигал фемто-, а в каких-то случаях и аттомолярных значений. По-видимому, к указанным для EASA столь низким значениям предела обнаружения следует относиться с некоторой долей осторожности, т.к. уже в пионерской работе [74] авторами было отмечено, что экзонуклеаза III проявляет значительную каталитическую активность по отношению к



поверхность

**Рис. 4.** Схемы методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот с формированием Y-структур: *а* – метод, основанный на формировании и последующем ферментативном расщеплении Y-зонда; *б* – безферментный метод с применением Y-зонда

одноцепочечным последовательностям ДНК, что должно приводить к ферментативному гидролизу анализируемой последовательности. Наличие этой побочной активности отмечалось и другими авторами [80, 81]. Более того, нами было показано, что экзонуклеаза III способна гидролизовать ДНК, имеющую структуру G-квадруплекса (неопубликованные данные). Другие экзонуклеазы также катализируют указанные побочные реакции. Отмеченный факт сущест-

венно ограничивает развитие метода амплификации с использованием таких экзонуклеаз.

EASA применяется также для повышения чувствительности аналитических методов определения активности ряда ферментов, таких как Т4 полинуклеотидкиназа, метилтрансфераза, теломераза [82–84], при этом используются как экзонуклеаза III, так и λ-экзонуклеаза.

Одним из новых изотермических амплификационных методов является метод с формированием **У-структур** [7]. При формировании таких структур используются два частично комплементарных друг другу зонда (обычно 4–6 п.н.), которые из-за ограниченной комплементарности не связываются друг с другом. В то же время в присутствии анализируемой последовательности, которая частично комплементарна обоим зондам, формируются устойчивые Ү-комплексы (рис. 4, *a*). Более того, фрагмент таких комплексов, образованных при взаимодействии зондов между собою, содержит сайт расщепления рестриктазами. Введение в реакционную среду рестриктазы, соответствующей последовательности сайта расщепления, приводит к ферментативному расщеплению дуплекса с последующей диссоциацией Ү-структуры и, соответственно, высвобождением анализируемой последовательности, которая используется для формирования нового У-зонда. Образующийся Y-зонд принимает участие в следующем цикле амплификации, что в конечном счете приводит к образованию многочисленных гидролизованных фрагментов используемых зондов. Наличие большого числа известных рестриктаз (~3500) позволяет смоделировать и получить разнообразные Ү-зонды с различными сайтами расщепления. Sintim et al. показали, что архитектура зондов оказывает существенное влияние на скорость ферментативного гидролиза У-зондов рестриктазами, что необходимо учитывать при моделировании структуры используемых зондов [85]. Следует отметить, что некоторые авторы вместо рестриктаз для гидролиза У-зонда успешно использовали никазы [86]. Температура проведения этого типа амплификации в различных работах варьируется в диапазоне 25–37 °С.

Как следует из схемы данного анализа (рис. 4, *a*), метод амплификации с применением Y-зондов может быть использован для определения как ДНК, так и РНК, а также аналитов другой химической природы (например, антибиотиков), при этом в качестве распознающих соединений используются аптамеры [87].

С применением Y-зонда ранее был разработан электрохимический метод определения 28членного ДНК-олигонуклеотида, являющегося модельным аналитом [88]. В данном методе для ферментативного расщепления Y-зонда использовалась эндонуклеаза HaeIII. Для регистрации процесса расщепления Y-зонда одна из его последовательностей, иммобилизованная на поверхности электрода, была конъюгирована с метиленовым синим. Данное вещество было пространственно удалено от поверхности электрода и по этой причине электрохимически не окислялось. В результате гидролиза сайта рестрикции Y-зонда данное соединение обретало способность мигрировать к поверхности электрода и там окисляться, что приводило к повышению регистрируемого значения тока, которое было пропорционально концентрации аналита. Предел обнаружения данного метода составил 14 пМ.

Описан также и латеральный проточный метод с колориметрической детекцией для определения микроРНК miR-16 с применением Y-зонда [89]. В данном случае реакцию амплификации проводили в гомогенной среде. Ү-Зонд образовывался как результат взаимодействия молекулярного маяка, вспомогательного ДНКолигонуклеотида и miR-16. В присутствии эндонуклеазы Nt.BbvCI молекулярный маяк в составе полученного У-зонда расщеплялся на два фрагмента. Это приводило к тому, что вспомогательный олигонуклеотид и miR-16 реагировали со следующей молекулой молекулярного маяка, и процесс повторялся вновь. Концентрацию образовавшихся фрагментов маяка определяли латеральным методом. Предел обнаружения miR-16 составил 0,1 пМ, линейный диапазон – от 0,1 пМ ло 10 нМ.

Также был описан модифицированный метод амплификации с применением У-зондов без использования каких-либо ферментов [90]. На первом этапе молекула аналита за счет комплементарного взаимодействия образует комплекс с двумя шпильками (рис. 4,  $\delta$ ), одна из которых содержит присоединенный дигоксин. Надо подчеркнуть, что сами шпильки не способны гибридизоваться между собой в отсутствие аналита. Затем, при добавлении меченной биотином третьей шпильки, которая вытесняет из комплекса молекулу аналита, формируется Ү-зонд. Высвободившийся аналит вновь формирует комплекс со шпильками 1 и 2, инициируя начало следующего цикла амплификации, что в результате позволяет без изменения концентрации аналита получить Ү-зонд, концентрация которого значительно превышает концентрацию аналита. После проведения реакции амплификации концентрацию образовавшегося Узонда, содержащего в своей структуре дигоксин и биотин, определяли электрохимически. Для этого за счет взаимодействия дигоксина с его антителами, сорбированными на поверхности электрода, проводили иммобилизацию Y-зонда, а последовательное добавление конъюгата стрептавидина с пероксидазой и 3,3',5,5'-тетраметилбензидина позволило регистрировать величину тока, пропорциональную концентрации Y-зонда. При использовании ДНК-олигонуклеотида в качестве модельного аналита предел обнаружения составил 10,9 аМ, линейный диапазон — от 100 аМ до 1 мкМ.

Никазы применяются не только в методе изотермической амплификации нуклеиновых кислот с формированием Ү-зонда, но также и в методе, основанном на применении специфических дуплексов [91]. Схема такого метода представлена на рис. 5. Анализируемая последовательность формирует специфический дуплекс с ДНК-зондом, создавая одновременно сайт рестрикции, распознаваемый одной из никаз. На стадии синтеза в последовательность зонда вводится некая метка, с помощью которой впоследствии проводится оценка выхода ферментативного гидролиза зонда. В дальнейшем специфическая никаза расщепляет последовательность зонда, что приводит к диссоциации дуплекса. Высвобожденная анализируемая молекула взаимодействует со следующей молекулой зонда, и этот процесс повторяется многократно. В результате одна молекула аналита позволяет произвести большое число фрагментов используемого зонда, что, в свою очередь, приводит к повышению регистрируемого сигнала. Температура проведения амплификации должна быть достаточно высокой для быстрой диссоциации расщепленного зонда, но при этом она ограничена термостабильностью используемой никазы. При первом описании данного метода, в котором использовалась никаза Nt.AlwI, температурный оптимум составлял 58 °С [91].

В зависимости от типа вводимой в зонд метки возможно использование различных методов регистрации сигнала. Так, в работе Lin et al. [92] ДНК-зонд представлял из себя шпильку, при этом одна из цепей стебля шпильки была аптамером гемина. После реакции зонда с анализируемой последовательностью (19-членным олигонуклеотидом гена *р53*) формировался дуплекс с сайтом рестрикции никазы Nt.BstNBI. После ферментативного гидролиза высвобождался аптамер гемина, и после добавления в реакционную среду гемина происходило формирование каталитически активного пероксидаза-подобного ДНКзима, активность которого определялась при окислении 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоната) в присутствии пероксида водорода. Одновременно происходило высвобождение аналита из дуплекса, что позволяло ему вступать во взаимодействие со следую-



**Рис. 5.** Схема метода с применением никазы, основанного на формировании и последующем ферментативном расщеплении ДНК-дуплекса

щей молекулой зонда. Для данного метода предел обнаружения фрагмента гена p53 составил 1 пМ, рабочий диапазон — 1-100 пМ.

Данный метод амплификации был применен также в комбинации с электрохимическим методом детекции нуклеиновых кислот. Chen et al. [93] описали приготовление ДНК-зонда-шпильки с ковалентно связанным ферроценом, который был иммобилизован на поверхность золотого электрода. После ферментативного расщепления сайта рестрикции, образованного при его взаимодействии с аналитом, фрагменты зонда, модифицированные ферроценом, отдалялись от поверхности электрода. Предел обнаружения модельного ДНК-аналита, измеренный с помощью электрохимического биосенсора, составил 68 aM, а линейный диапазон – от 0,1 до 100 фМ.

Недавно была опубликована работа, в которой метод амплификации с использованием никазы Nt. Alwl применили в количественном анализе катионов ртути [94]. Используя образование комплекса тимин—Hg<sup>2+</sup>—тимин как индикаторную реакцию, Vijayan et al. разработали метод анализа с пределом обнаружения 0,14 нМ. Авторы показали, что разработанный метод может применяться для определения ртути в питьевой воде. На основе амплификации с помощью никазы также были успешно разработаны методы с использованием аптамеров для определения лизоцима, карциноэмбрионального и простатспецифического антигенов, а также муцина-16 в сыворотке крови человека [95].

В работах с применением данного типа амплификации отмечается высокая специфичность разрабатываемых методов анализа. Тем более странно, что число публикаций с упоминанием о применении данного метода амплификации значительно меньше, чем в случае других изотермических амплификационных методов.

В 2009 г. был описан изотермический амплификационный метод с полимеризацией и замещением (ICSDP) [96]. Принцип метода представ-



Рис. 6. Схема метода с использованием амплификации с полимеризацией и замещением (ICSDP)

лен на рис. 6. Этот метод основан на применении ДНК-шпильки (зонда), короткого праймера и ДНК-полимеразы. Структура зонда включает в себя некую метку, позволяющую оценивать концентрацию данной молекулы. Поскольку последовательность, расположенная на 5'конце и формирующая стебель зонда и часть его петли, комплементарна анализируемой последовательности, это позволяет им специфически взаимодействовать друг с другом с образованием дуплекса и раскрытием структуры шпильки. Праймер, обычно представляющий собой последовательность длиной в восемь нуклеотидов, комплементарен 3'-концу стебля зонда. При отсутствии аналита праймер с зондом не взаимодействует, тогда как в присутствии молекулы аналита после образования дуплекса праймер связывается с освободившимся З'-концом зонда.

Связывание праймера инициирует реакцию его элонгации в присутствии ДНК-полимеразы и дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов. В процессе удлинения праймера синтезируемая последовательность вытесняет аналит, переводя его в несвязанное состояние. Это, в свою очередь, позволяет ему гибридизоваться с другой молекулой зонда-шпильки, что запускает следующий цикл полимеризации/вытеснения. Следовательно, молекула аналита выступает в качестве триггера реакции полимеризации. Параллельно с расходованием зонда происходит накопление дуплекса, состоящего из зонда и синтезированной последовательности, концентрация которого может быть измерена различными физико-химическими методами. Таким образом, изотермический ICSDP, который проводится обычно при 37 °C, позволяет амплифицировать сигнал при постоянной концентрации аналита.

Guo et al. [96] в качестве зонда использовали молекулярный маяк, у которого на концах шпильки находились флуоресцеин как флуоресцентная метка и DABCYL как тушитель флуоресценции. Реакция полимеризации катализировалась фрагментом Кленова. Для определения модельного 26-членного ДНК-олигонуклеотида был развит флуоресцентный гомогенный метод с ICSDP, предел обнаружения которого составил 6,4 фМ.

Аналогичный принцип был использован при разработке метода определения микроРНК miR-210 [97]. Предел обнаружения описанного метода составил 50 пМ. Следует отметить, что линейный диапазон определения микроРНК для данного метода оказался достаточно узким (от 330 пМ до 1,66 нМ). С помощью разработанного метода был проведен анализ miR-210 в трансфицированных клетках K562.

ICSDP был также использован при разработке гетерогенных методов определения нуклеиновых кислот. Так, Gao et al. [98] на поверхности золотого электрода иммобилизовали шпильку, модифицированную ферроценом. В присутствии аналита происходило ее раскрытие и высвобождение комплементарного праймеру фрагмента, модифицированного метиленовым голубым. После гибридизации праймера происходила его элонгация в присутствии ДНК-полимеразы со способностью к замещению цепи. Предел обнаружения электрохимического биосенсора, разработанного для определения модельного ДНК-аналита (31 нуклеотид), составил 28 фМ. Рабочий диапазон метода находился в диапазоне от 100 фМ до 10 нМ. Аналогичный подход был применен для определения гена mecA в метициллин-резистентных штаммах Staphylococcus aureus [99].

Следует отметить, что поскольку в ICSDP используется ДНК-полимераза, данный метод может быть чувствителен к компонентам, ингибирующим ДНК-полимеразу, что может приводить к получению ложноотрицательных результатов. К тому же фоновая амплификация, вызванная неспецифической гибридизацией, в свою очередь, может приводить к ложноположительным результатам.

В отличие от описанных выше изотермических методов амплификации нуклеиновых кислот, в **реакции цепной гибридизации** (HCR) не используются какие-либо ферменты. Данный метод был разработан Дирксом и Пирсом в 2004 г. [100]. В основе метода HCR лежит реакция образования двухцепочечной ДНК в результате взаимодействия двух шпилек, которая инициируется ДНК/РНК-аналитом (рис. 7). Следует отметить, что структура шпилек 1 и 2 выбирается таким образом, чтобы их комплементарные взаимодействия между собою были кинетически затруднены. В присутствии аналита образование дуплекса между шпилькой 1 и анализируемой последовательностью приводит к высво-


Рис. 7. Схема безферментного изотермического метода амплификации с применением реакции цепной гибридизации (HCR)

бождению не вступающей в это взаимодействие последовательности стебля шпильки 1, что, в свою очередь, позволяет этому одноцепочечному фрагменту вступить в реакцию со шпилькой 2. Последняя реакция приводит к образованию дуплекса между используемыми шпильками и одновременному высвобождению непрореагировавшей последовательности стебля шпильки 2, которая затем вступает в реакцию с другой молекулой шпильки 1. Введение детектирующих меток в структуру шпилек или интеркалирование красителей в структуру дуплекса позволяет зарегистрировать образующуюся ДНК. Таким образом, в результате проведения HCR формируется двухцепочечная ДНК с разрывами в каждой цепи, при этом длина молекулы определяется количеством шпилек в реакционном растворе. Обычно амплификация проводится при 25 или 37 °C.

Для усиления эффекта амплификации были разработаны методы с использованием шпильки с двумя и большим количеством петель, что позволяло получать разветвленную структуру двуцепочечной ДНК [101]. С использованием четырех шпилек и двух дополнительных одноцепочечных ДНК описана модификация метода НСR, названная гиперразветленной НСR (hyperbranched HCR). Кинетика амплификации данной модификации экспоненциальная, а продуктом амплификации является разветвленная двухцепочечная ДНК [102]. Таким образом, в случае HCR аналит может инициировать формирование дуплексов ДНК с наличием разрывов в обеих цепях, и увеличение интенсивности аналитического сигнала происходит из-за того, что сформировавшаяся ДНК содержит в своей структуре большое число введенных меток.

При использовании НСК в биоанализе часто применяются шпильки (одна или две), содержащие биотин. Так, в работе Yang et al. [103] исследуемая ДНК (модельный аналит) инициировала проведение HCR с формированием дуплексной цепочки, содержащей биотин, т.к. одна из исходных шпилек была модифицирована данным соединением. За счет присутствия в дуплексе биотиновых остатков он способен взаимодействовать со стрептавидином, сорбированным на магнитных частицах. Поскольку не все биотины дуплекса были задействованы в процессе иммобилизации на частицах, другая часть остатков биотина была использована для взаимодействия с конъюгатом авидина и глюкозооксидазы. В присутствии глюкозооксидазы глюкоза окислялась, что приводило к образованию пероксида водорода. В его присутствии происходило травление поверхности наночастиц серебра, что регистрировалось методом поверхностного плазмонного резонанса. Предел обнаружения аналита в этом случае составил 6 фМ, линейный диапазон – от 10 фМ до 100 пМ.



Рис. 8. Схема безферментного изотермического метода амплификации с применением метода каталитической сборки шпилек (СНА)

НСК была применена при конструировании электрохимического биосенсора, предназначенного для определения микроРНК в лизате клеток HUVEC, HK-2, HeLa и MCF-7 [104]. Достигнутый с помощью вольтамперометрической детекции предел обнаружения микроРНК Hsa-miR-17-5p составил 2 aM, линейный диапазон — от 100 aM до 100 пМ.

Более того, было показано, что HCR может быть эффективна как метод для внутриклеточной визуализации PHK. Так, в работе Wu et al. [105] описан флуоресцентный метод для оценки экспрессии мPHK в пикомолярном интервале концентраций. Следует также отметить, что использование данного метода не требует применения реакции обратной транскрипции.

Помимо анализа нуклеиновых кислот, описано применение метода HCR в анализе ионов ртути, ATФ, а также белков. Guo et al. [106] в качестве модельных белковых биомаркеров использовали  $\alpha$ -фетопротеин и простат-специфический антиген. В присутствии аналитов на поверхности электрода происходило формирование иммунных комплексов. Вторичные антитела были ковалентно связаны с ДНК-олигонуклеотидом, запускающим HCR. Предел обнаружения, полученный при вольтамперометрической детекции, для  $\alpha$ -фетопротеина составил 0,25 пг/мл, для простат-специфического антигена — 0,17 пг/мл.

С помощью HCR успешно проводилась идентификация опухолевых клеток [107]. Методы данного направления основаны на специфическом взаимодействии аптамеров с маркерами, расположенными на поверхности исследуемых клеток.

Как и HCR, метод каталитической сборки шпилек (CHA) не требует применения каких-либо ферментов. Как видно на рис. 8, в основе СНА лежит использование двух олигонуклеотидов-шпилек [108]. За счет комплементарности первая шпилька может взаимодействовать с аналитом, что приводит к образованию дуплекса. При этом домен шпильки 1, комплементарный последовательности хвоста шпильки 2, становится доступен для такого взаимодействия. Следует отметить, что структура используемых шпилек-зондов моделируется с учетом того, что они должны быть комплементарны друг другу, но их взаимодействие между собой должно быть кинетически затруднено.

Доступность освободившегося домена приводит к осуществлению его реакции со шпилькой 2. Такая реакция сопровождается вытеснением аналита из первичного дуплекса, что инициирует начало следующего цикла амплификации. Таким образом, одна молекула аналита способна инициировать образование большего числа дуплексов. При использовании СНА чрезвычайно важно уделять серьезное внимание предотвращению взаимодействия шпилек между собою в отсутствие аналита, т.к. протекание такой реакции будет повышать фоновый сигнал анализа и тем самым понижать его чувствительность. Таким образом, в отличие от HCR, которая, как и СНА, протекает без использования какого-либо фермента, в случае СНА повышение интенсивности аналитического сигнала происходит из-за того, что молекула аналита многократно участвует в проведении индикаторной реакции.

На сегодняшний день большая часть исследований с использованием СНА нацелена на разработку методов анализа микроРНК, которые считаются перспективными биомаркерами для диагностики онкологических заболеваний [109]. Продукты СНА могут быть зарегистрированы различными физико-химическими методами. Так, в работе Zhang et al. [110] для детекции микроРНК miR-21 с применением СНА использовали электрофорез. Для данного метода предел обнаружения микроРНК составил 10 пМ. Электрохимический метод анализа с применением СНА использован в работе Shuai et al. [111], в которой шпилька 1 была иммобилизована на поверхности электрода, а шпилька 2

была модифицирована биотином/конъюгатом щелочной фосфатазы со стрептавидином. Предел детекции miR-21 составил 50 aM, линейный диапазон — от 0,1 фМ до 100 пМ.

Флуоресцентный гомогенный метод определения микроРНК miR-let-7a с применением молекулярного маяка и СНА для амплификации регистрируемого сигнала был описан в работе Jiang et al. [112]. Данный метод позволил определить анализируемую микроРНК с концентрацией, равной 1 пМ. Линейный диапазон метода находился в интервале от 1 пМ до 2 нМ.

Следует заметить, что некоторые авторы, стремясь дополнительно повысить чувствительность аналитических методов, используют не один метод, а комбинацию двух разных амплификационных методов. Данные комбинации получили название каскадных методов амплификации [24]. Так, в работах Dong et al. [113] и Xu et al. [114] были объединены, соответственно, СНА и RCA с методом амплификации с использованием никазы. Сочетание RCA и EASA было использовано для идентификации ДНК генетически модифицированной сои MON89788. Предел обнаружения этого метода составил 45 aM [115]. Для повышения чувствительности анализа RCA использовалось также его сопряжение с СНА [116]. Однако предел обнаружения в этом случае был достаточно высок (100 фМ).

Флуоресцентный биосенсор был разработан для определения бисфенола A с использованием сочетания метода с формированием Y-структур и EASA [117]. Предел обнаружения бисфенола A составил 5 фM, линейный диапазон — от 10 фM до 10 нМ. Метод определения аденозина с применением HCR и EASA был опубликован Sun et al. [118]. В некоторых случаях применялся другой подход, когда один и тот же метод использовался несколько раз для амплификации различных промежуточных соединений [119].

Таким образом, в данном обзоре представлены данные по изотермическим методам амплификации нуклеиновых кислот, которые были разработаны как альтернатива ПЦР. В настоящее время эти методы активно и успешно применяются в биоанализе для повышения детектируемости и чувствительности количественного определения анализируемых соединений как нуклеиновых кислот, так и веществ другой химической природы (белков, ферментов, антибиотиков, наркотиков и т.д.), определение которых построено на применении ДНК/РНК-аптамеров. Большинство методов с использованием изотермической амплификации нуклеиновых кислот обладают высокой чувствительностью. Благодаря этому многие аналиты могут определяться в фемто- и пикомолярных концентрациях. Описаны также методы, позволяющие детектировать исследуемые вещества в аттомолярных концентрациях. Такая чувствительность методов позволяет детектировать практически все значимые аналиты в реальных образцах.

В то же время существует достаточное количество вопросов, которые должны быть разрешены в будущем. В первую очередь это касается ложноположительных и ложноотрицательных сигналов, получаемых в некоторых случаях при работе с реальными образцами. Другой важный вопрос, ожидающий своего разрешения, заключается в том, что исследователи из различных научных групп, используя идентичные методы амплификации и детекции, разрабатывают методы количественного определения аналитов с пределами обнаружения, которые часто отличаются между собой на несколько порядков. Причины таких расхождений должны быть обязательно выяснены в ближайшее время. Следует отметить, что многие описанные методы с низкими значениями предела обнаружения имеют невысокую чувствительность, что не позволяет их использовать для определения аналитов, концентрация которых при патологии не сильно отличается от их концентрации в норме, например, микроРНК miR-21 [120]. Нужно также заметить, что количество опубликованных работ по применению аналитических методов, сопряженных с методами амплификации, для количественного определения биомаркерованалитов в реальных образцах невысоко, а большинство работ проводилось по их определению лишь в буферных растворах. Все вышеперечисленное указывает на необходимость продолжения интенсивных научных исследований по оценке применимости в биоанализе и усовершенствованию изотермических методов амплификации, а также разработке на их основе высокочувствительных и высокоселективных методов анализа с высокой точностью измерений, которые так необходимы для практического применения.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 17-14-01042).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

191

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Manzanares-Palenzuela, C.L., de-los-Santos-Alvarez, N., Lobo-Castanon, M.J., and Lopez-Ruiz, B. (2015) Multiplex electrochemical DNA platform for femtomolarlevel quantification of genetically modified soybean, *Biosens. Bioelectron.*, 68, 259–265, doi: 10.1016/j.bios. 2015.01.007.
- Cavanaugh, S.E., and Bathrick, A.S. (2018) Direct PCR amplification of forensic touch and other challenging DNA samples: a review, *Foressic Sci. Int. Genet.*, **32**, 40–49, doi: 10.1016/j.fsigen.2017.10.005.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences, *Biotechnology (NY)*, 10, 413–417.
- Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А., Коновалов С.В., Курочкин В.Е., Маракушин Н.Ф., Петров А.И., Петряков А.О., Румянцев Д.А., Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Фесенко В.А., Чернышев А.В. (2006) Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), *Научное приборостроение*, 16, 132–136.
- Borst, A., Box, A.T.A., and Fluit, A.C. (2004) False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 23, 289–299, doi: 10.1007/s10096-004-1100-1.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. (2000) Loopmediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Res.*, 28, E63, doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
- Yan, L., Zhou, J., Zheng, Y., Gamson, A.S., Roembke, B.T., Nakayama, S., and Sintim, H.O. (2014) Isothermal amplified detection of DNA and RNA, *Mol. Biosyst.*, 10, 970–1003, doi: 10.1039/c3mb70304e.
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., and Notomi, T. (2004) Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 59, 145–157, doi: 10.1016/j.jbbm.2003.12.005.
- 9. Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., and Notomi, T. (2008) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products, *Nat. Protoc.*, **3**, 877–882, doi: 10.1038/nprot.2008.57.
- Pang, B., Yao, S., Xu, K., Wang, J., Song, X.L., Mu, Y., Zhao, C., and Li, J. (2019) A novel visual-mixed-dye for LAMP and its application in the detection of foodborne pathogens, *Anal. Biochem.*, **574**, 1–6, doi: 10.1016/j.ab. 2019.03.002.
- Troger, V., Niemann, K., Gartig, C., and Kuhlmeier, D. (2015) Isothermal amplification and quantification of nucleic acids and its use in microsystems, *J. Nanomed. Nanotechnol.*, 6, 282–298, doi: 10.4172/2157-7439.1000282.
- Najian, A.B.N., Foo, P.C., Ismail, N., Kim-Fatt, L., and Yean, C.Y. (2019) Probe-specific loop-mediated isothermal amplification magnetogenosensor assay for rapid and specific detection of pathogenic *Leptospira*, *Mol. Cell. Probes*, 44, 63–68, doi: 10.1016/j.mcp.2019.03.001.
- Shchit, I.Yu., Ignatov, K.B., Kudryavtseva, T.Yu., Shishkova, N.A., Mironova, R.I., Marinin, L.I., Mokrievich, A.N., Kramarov, V.M., Biketov, S.F., and Dyatlov, I.A. (2017) The use of loop-mediated isothermal DNA amplification for the detection and identification of the anthrax pathogen, *Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, 32, 100–108, doi: 10.3103/S0891416817020094.
- Poschl, B., Waneesorn, J., Thekisoe, O., Chutipongvivate, S., and Panagiotis, K. (2010) Comparative diagnosis of malaria infections by microscopy, nested PCR, and LAMP in

northern Thailand, *Am. J. Tropical Med. Hygiene*, **83**, 56–60, doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0630.

- Gao, X., Sun, B., and Guan, Y. (2019) Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 1211–1218, doi: 10.1007/s00216-018-1552-2.
- 15a. Yang, Q., Domesle, K.J., and Ge, B. (2018) Loop-mediated isothermal amplification for Salmonella detection in food and feed: current applications and future directions, *Foodborne Pathogens and Disease*, **15**, 309–331, doi: 10.1089/fpd.2018.2445.
- 156. Maruyama, F., Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K., and Nasu, M. (2003) Detection of bacteria carrying the *stx*<sub>2</sub> gene by *in situ* loop-mediated isothermal amplification, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5023–5028, doi: 10.1128/ aem.69.8.5023-5028.2003.
- Щит И.Ю., Игнатов К.Б., Бикетов С.Ф. (2018) Сравнительный анализ методов LAMP и ПЦР-РВ для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза, Клинич. лаб. диагностика, 63.
- Макарова Ю.А., Зотиков А.А., Белякова Г.А., Алексеев Б.Я., Шкурников М.Ю. (2018) Изотермическая петлевая амплификация: эффективный метод экспресс-диагностики в онкологии, Онкоурология, 14, 88–99, doi: 10.17650/1726-9776-2018-14-2-88-99.
- Wong, Y.P., Othman, S., Lau, Y.L., Radu, S., and Chee, H.Y. (2018) Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of microorganisms, *J. Appl. Microbiol.*, **124**, 626–643, doi: 10.1111/jam.13647.
   Compton, J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplifi-
- Compton, J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification, *Nature*, **350**, 91–92, doi: 10.1038/350091a0.
- Kievits, T., van Gemen, B., van Strijp, D., Schukkink, R., Dircks, M., Adriaanse, H., Malek, L., Sooknanan, R., and Lens, P. (1991) NASBA isothermal enzymatic *in vitro* nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection, *J. Virol. Methods*, 35, 273–286.
- Mader, A., Riehle, U., Brandstetter, T., Stickeler, E., and Ruehe, J. (2012) Universal nucleic acid sequence-based amplification for simultaneous amplification of messengerRNAs and microRNAs, *Anal. Chim. Acta*, **754**, 1–7, doi: 10.1016/j.aca.2012.09.045.
- Ma, Y., Dai, X., Hong, T., Munk, G.B., and Libera, M. (2017) A NASBA on microgel-tethered molecular-beacon microarray for real-time microbial molecular diagnostics, *Analyst*, 142, 147–155, doi: 10.1039/c6an02192a.
- 23. Lu, X., Shi, X., Wu, G., Wu, T., Qin, R., and Wang, Y. (2017) Visual detection and differentiation of Classic Swine Fever Virus strains using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and G-quadruplex DNAzyme assay, *Scientific Reports*, 7, 44211, doi: 10.1038/srep44211.
- Zeng, W., Yao, W., Wang, Y., Li, Y., Bermann, S.M., Ren, Y., Shi, C., Song, X., Huang, Q., Zheng, S., and Wang, Q. (2017) Molecular detection of genotype II grass carp reovirus based on nucleic acid sequence-based amplification combined with enzyme-linked immunosorbent assay (NASBA-ELISA), J. Virol. Methods, 243, 92–97, doi: 10.1016/j.jviromet.2017.02.001.
- Honsvall, B.K., and Robertson, L.J. (2017) From research lab to standard environmental analysis tool: will NASBA make the leap? *Water Res.*, **109**, 389–397, doi: 10.1016/ j.watres.2016.11.052.
   Vincent, M., Xu, Y., and Kong, H. (2004) Helicase-depen-
- 26. Vincent, M., Xu, Y., and Kong, H. (2004) Helicase-dependent isothermal DNA amplification, *EMBO Reports*, 5, 795–800, doi: 10.1038/sj.embor.7400200.
- Zhao, Y., Chen, F., Li, Q., Wang, L., and Fan, C. (2015) Isothermal amplification of nucleic acids, *Chem. Rev.*, 115, 12491–12545, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00428.

- Barreda-Garcia, S., Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Alvarez, N., Miranda-Ordieres, A.J., and Lobo-Castanon, M.J. (2018) Helicase-dependent isothermal amplification: a novel tool in the development of molecular-based analytical systems for rapid pathogen detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, 410, 679–693, doi: 10.1007/s00216-017-0620-3.
- Mahalanabis, M., Do, J., ALMuayad, H., Zhang, J.Y., and Klapperich, C.M. (2011) An integrated disposable device for DNA extraction and helicase dependent amplification, *Biomed. Microdevices*, 13, 353–359, doi: 10.1007/s10544-009-9391-8.
- Ao, W., Aldous, S., Woodruff, E., Hicke, B., Rea, L., Kreiswirth, B., and Jenison, R. (2012) Rapid detection of *rpoB* gene mutations conferring rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, J. Clin. Microbiol., 50, 2433–2440, doi: 10.1128/JCM.00208-12.
- Tang, R., Yang, H., Gong, Y., You, M., Liu, Z., Choi, J.R., Wen, T., Qu, Z., Mei, Q., and Xu, F. (2017) A fully disposable and integrated paper-based device for nucleic acid extraction, amplification and detection, *Lab on a Chip*, 17, 1270–1279, doi: 10.1039/c6lc01586g.
- Barreda-Garcia, S., Miranda-Castro, R., de-Los-Santos-Alvarez, N., Miranda-Ordieres, A.J., and Lobo-Castanon, M.J. (2017) Solid-phase helicase dependent amplification and electrochemical detection of *Salmonella* on highly stable oligonucleotide-modified ITO electrodes, *Chem. Commun.*, 53, 9721–9724, doi: 10.1039/c7cc05128j.
- Schwenkbier, L., Pollok, S., Rudloff, A., Sailer, S., Cialla-May, D., Weber, K., and Popp, J. (2015) Non-instrumented DNA isolation, amplification and microarray-based hybridization for a rapid on-site detection of devastating *Phytophthora kernoviae*, *Analyst*, **140**, 6610–6618, doi: 10.1039/c5an00855g.
- Toldra, A., Jauset-Rubio, M., Andree, K.B., Fernandez-Tejedor, M., Diogene, J., Katakis, I., O'Sullivan, C.K., and Campas, M. (2018) Detection and quantification of the toxic marine microalgae *Karlodinium veneficum* and *Karlodinium armiger* using recombinase polymerase amplification and enzyme-linked oligonucleotide assay, *Anal. Chim. Acta*, **1039**, 140–148, doi: 10.1016/j.aca.2018.07.057.
- Ma, F., Liu, M., Tang, B., and Zhang, C.Y. (2017) Sensitive quantification of microRNAs by isothermal helicasedependent amplification, *Anal. Chem.*, **89**, 6183–6188, doi: 10.1021/acs.analchem.7b01113.
- Reid, M.S., Le, X.C., and Zhang, H. (2018) Exponential isothermal amplification of nucleic acids and assays for proteins, cells, small molecules, and enzyme activities: an EXPAR example, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 11856–11866, doi: 10.1002/anie.201712217.
- Van Ness, J., Van Ness, L.K., and Galas, D.J. (2003) Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4504–4509, doi: 10.1073/pnas.0730811100.
- Wang, H., Wang, H., Duan, X., Wang, X., Sun, Y., and Li, Z. (2017) Sensitive detection of mRNA by using specific cleavage-mediated isothermal exponential amplification reaction, *Sens. Actuat. B: Chemical*, **252**, 215–221, doi: 10.1016/j.snb.2017.06.008.
- Li, R.D., Yin, B.C., and Ye, B.C. (2016) Ultrasensitive, colorimetric detection of microRNAs based on isothermal exponential amplification reaction-assisted gold nanoparticle amplification, *Biosens. Bioelectron.*, 15, 1011–1016, doi: 10.1016/j.bios.2016.07.042.
- Liu, H., Zhang, L., Xu, Y., Chen, J., Wang, Y., Huang, Q., Che, X., Liu, Y., Da, Z., Zou, X., and Li, Z. (2019) Sandwich immunoassay coupled with isothermal exponential amplification reaction: an ultrasensitive approach for determination of tumor marker MUC1, *Talanta*, **204**, 248–254, doi: 10.1016/j.talanta.2019.06.001.

- Jia, H., Wang, Z., Wang, C., Chang, L., and Li, Z. (2014) Real-time fluorescence detection of Hg<sup>2+</sup> ions with high sensitivity by exponentially isothermal oligonucleotide amplification, *RSC Adv.*, 4, 9439–9444, doi: 10.1039/ C3RA45986A.
- Tian, L., and Weizmann, Y. (2013) Real-time detection of telomerase activity using the exponential isothermal amplification of telomere repeat assay, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 1661–1664, doi: 10.1021/ja309198j.
- Wang, L., Ren, M., Zhang, Q., Tang, B., and Zhang, C. (2017) Excision repair-initiated enzyme-assisted bicyclic cascade signal amplification for ultrasensitive detection of uracil-DNA glycosylase, *Anal. Chem.*, **89**, 4488–4494, doi: 10.1021/acs.analchem.6b04673.
- Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G., and Malinowski, D.P. (1992) Strand displacement amplification – an isothermal, *in vitro* DNA amplification technique, *Nucleic Acids Res.*, 20, 1691–1696, doi: 10.1093/nar/20.7.1691.
- Shi, C., Ge, Y., Gu, H., and Ma, C. (2011) Highly sensitive chemiluminescent point mutation detection by circular strand-displacement amplification reaction, *Biosens. Bioelectron.*, 26, 4697–4701, doi: 10.1016/j.bios.2011.05.017.
- Zhao, Y., Zhou, L., and Tang, Z. (2013) Cleavage-based signal amplification of RNA, *Nat. Commun.*, 4, 1493, doi: 10.1038/ncomms2492.
- Shi, C., Liu, Q., Ma, C., and Zhong, W. (2014) Exponential strand-displacement amplification for detection of microRNAs, *Anal. Chem.*, 86, 336–339, doi: 10.1021/ac4038043.
- Ren, R., Leng, C., and Zhang, S. (2010) Detection of DNA and indirect detection of tumor cells based on circular strand-replacement DNA polymerization on electrode, *Chem. Commun.*, 46, 5758–5760, doi: 10.1039/C002466J.
- Ding, C., Li, X., Ge, Y., and Zhang, S. (2010) Fluorescence detection of telomerase activity in cancer cells based on isothermal circular strand-displacement polymerization reaction, *Anal. Chem.*, 82, 2850–2855, doi: 10.1021/ ac902818w.
- Zhu, C., Wen, Y., Li, D., Wang, L., Song, S., Fan, C., and Willner, I. (2009) Inhibition of the *in vitro* replication of DNA by an aptamer-protein complex in an autonomous DNA machine, *Chemistry*, **15**, 11898–11903, doi: 10.1002/ chem.200901275.
- Li, Y., Zeng, Y., Mao, Y., Lei, C., and Zhang, S. (2014) Proximity-dependent isothermal cycle amplification for small-molecule detection based on surface enhanced Raman scattering, *Biosens. Bioelectron.*, **51**, 304–309, doi: 10.3390/bios9020057.
- Li, J., Macdonald, J., and von Stetten, F. (2019) Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification, *Analyst*, 144, 31–67, doi: 10.1039/c8an01621f.
- 53. Kersting, S., Rausch, V., Bier, F.F., and von Nickisch-Rosenegk, M. (2014) Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis, *Malar. J.*, **13**, 99, doi: 10.1186/1475-2875-13-99.
- Lobato, I.M., and O'Sullivan, C.K. (2018) Recombinase polymerase amplification: basics, applications and recent advances, *Trends Anal. Chem.*, 98, 19–35, doi: 10.1016/j.trac.2017.10.015.
- Mayboroda, O., Gonzalez Benito, A., Sabate del Rio, J., Svobodova, M., Julich, S., Tomaso, H., O'Sullivan, C.K., and Katakis, I. (2016) Isothermal solid-phase amplification system for detection of *Yersinia pestis*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 408, 671–676, doi: 10.1007/s00216-015-9177-1.
- Ng, B.Y., Xiao, W., West, N.P., Wee, E.J., Wang, Y., and Trau, M. (2015) Rapid, single-cell electrochemical detec-

tion of *Mycobacterium tuberculosis* using colloidal gold nanoparticles, *Anal. Chem.*, **87**, 10613–10618, doi: 10.1021/acs.analchem.5b03121.

- Tsaloglou, M.N., Nemiroski, A., Camci-Unal, G., Christodouleas, D.C., Murray, L.P., Connelly, J.T., and Whitesides, G.M. (2017) Handheld isothermal amplification and electrochemical detection of DNA in resourcelimited settings, *Anal. Biochem.*, 543, 116–121, doi: 10.1016/j.ab.2017.11.025.
- Yang, B., Kong, J., and Fang, X. (2019) Bandage-like wearable flexible microfluidic recombinase polymerase amplification sensor for the rapid visual detection of nucleic acids, *Talanta*, **204**, 685–692, doi: 10.1016/j.talanta.2019.06.031.
- Fire, A., and Xu, S.Q. (1995) Rolling replication of short DNA circles, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 92, 4641–4645, doi: 10.1073/pnas.92.10.4641.
- Goo, N.-I., and Kim, D.-E. (2016) Rolling circle amplification as isothermal gene amplification in molecular diagnostics, *BioChip J.*, **10**, 262–271, doi: 10.1007/s13206-016-0402-6.
- Nilsson, M., Barbany, G., Antson, D.O., Gertow, K., and Landegren, U. (2000) Enhanced detection and distinction of RNA by enzymatic probe ligation, *Nat. Biotechnol.*, 18, 791–793, doi: 10.1038/77367.
- 62. Marciniak, J., Kummel, A.C., Esener, S.C., Heller, M.J., and Messmer, B.T. (2008) Coupled rolling circle amplification loop-mediated amplification for rapid detection of short DNA sequences, *Biotechniques*, **45**, 275–280, doi: 10.2144/000112910.
- 63. Li, X.H., Zhang, X.L., Wu, J., Lin, N., Sun, W.M., Chen, M., Ou, Q.S., and Lin, Z.Y. (2019) Hyperbranched rolling circle amplification (HRCA)-based fluorescence biosensor for ultrasensitive and specific detection of singlenucleotide polymorphism genotyping associated with the therapy of chronic hepatitis B virus infection, *Talanta*, **191**, 277–282, doi: 10.1016/j.talanta.2018.08.064.
- Schopf, E., Liu, Y., Deng, J.C., Yang, S., Cheng, G., and Chen, Y. (2011) *Mycobacterium tuberculosis* detection via rolling circle amplification, *Anal. Methods*, 3, 267–273, doi: 10.1039/C0AY00529K.
- Cheng, Y., Zhang, X., Li, Z., Jiao, X., Wang, Y., and Zhang, Y. (2009) Highly sensitive determination of microRNA using target-primed and branched rolling-circle amplification, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 48, 3268–3272, doi: 10.1002/anie.200805665.
- Deng, R., Tang, L., Tian, Q., Wang, Y., Lin, L., and Li, J. (2014) Toehold-initiated rolling circle amplification for visualizing individual microRNAs *in situ* in single cells, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 53, 2389–2393, doi: 10.1002/anie.201309388.
- Mashimo, Y., Mie, M., Suzuki, S., and Kobatake, E. (2017) Detection of small RNA molecules by a combination of branched rolling circle amplification and bioluminescent pyrophosphate assay, *Anal. Bioanal. Chem.*, 401, 221–227, doi: 10.1007/s00216-011-5083-3.
- Cui, W., Wang, L., Xu, X., Wang, Y., and Jiang, W. (2017) A loop-mediated cascade amplification strategy for highly sensitive detection of DNA methyltransferase activity, *Sens. Actuat. B: Chemical*, 244, 599–605, doi: 10.1016/j.snb.2017.01.013.
- Qing, T., He, D., He, X., Wang, K., Xu, F., Wen, L., Shangguan, J., Mao, Z., and Lei, Y. (2016) Nucleic acid tool enzymes-aided signal amplification strategy for biochemical analysis: status and challenges, *Anal. Bioanal. Chem.*, 408, 2793–2811, doi: 10.1007/s00216-015-9240-y.
- 70. Dean, F.B., Nelson, J.R., Giesler, T.L., and Lasken, R.S. (2001) Rapid amplification of plasmid and phage DNA

using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification, *Genome Res.*, **11**, 1095–1099, doi: 10.1101/gr.180501.

- Li, Y., Kim, H.J., Zheng, C., Chow, W.H.A., Lim, J., Keenan, B., Pan, X., Lemieux, B., and Kong, H. (2008) Primase-based whole genome amplification, *Nucleic Acids Res.*, 36, e79, doi: 10.1093/nar/gkn377.
- Miao, P., Tang, Y., Wang, B., Yin, J., and Ning, L. (2015) Signal amplification by enzymatic tools for nucleic acids, *Trends Anal. Chem.*, 67, 1–15, doi: 10.1016/j.trac.2014. 12.006.
- Mol, C.D., Kuo, C.F., Thayer, M.M., Cunningham, R.P., and Tainer, J.A. (1995) Structure and function of the multifunctional DNA-repair enzyme exonuclease III, *Nature*, 374, 381–386, doi: 10.1038/374381a0.
- Zuo, X., Xia, F., Xiao, Y., and Plaxco, K.W. (2010) Sensitive and selective amplified fluorescence DNA detection based on exonuclease III-aided target recycling, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 1816–1818, doi: 10.1021/ja909551b.
- Yan, M., Bai, W., Zhu, C., Huang, Y., Yan, J., and Chen, A. (2016) Design of nuclease-based target recycling signal amplification in aptasensors, *Biosens. Bioelectron.*, 77, 613–623, doi: 10.1016/j.bios.2015.10.015.
   Yang, W., Tian, J., Ma, Y., Wang, L., Zhao, Y., and Zhao, S.
- Yang, W., Tian, J., Ma, Y., Wang, L., Zhao, Y., and Zhao, S. (2015) A label-free fluorescent probe based on DNA-templated silver nanoclusters and exonuclease III-assisted recycling amplification detection of nucleic acid, *Anal. Chim. Acta*, **900**, 90–96, doi: 10.1016/j.aca.2015.10.015.
- Xu, L., Shen, X., Li, B., Zhu, C., and Zhou, X. (2017) G-Quadruplex based Exo III-assisted signal amplification aptasensor for the colorimetric detection of adenosine, *Anal. Chim. Acta*, **980**, 58–64, doi: 10.1016/j.aca. 2017.05.015.
- Gao, Y., and Li, B. (2013) G-Quadruplex DNAzymebased chemiluminescence biosensing strategy for ultrasensitive DNA detection: combination of exonuclease IIIassisted signal amplification and carbon nanotubes-assisted background reducing, *Anal. Chem.*, **85**, 11494–11500, doi: 10.1021/ac402728d.
- Gan, X., Zhao, H., Chen, S., and Quan, X. (2015) Electrochemical DNA sensor for specific detection of picomolar Hg (II) based on exonuclease III-assisted recycling signal amplification, *Analyst*, 140, 2029–2036, doi: 10.1039/C5AN00082C.
- Yang, Z., Sismour, A.M., and Benner, S.A. (2007) Nucleoside α-thiotriphosphates, polymerases and the exonuclease III analysis of oligonucleotides containing phosphorothioate linkages, *Nucleic Acids Res.*, 35, 3118–3127, doi: 10.1093/nar/gkm168.
- Xu, Q., Cao, A., Zhang, L.-F., and Zhang, C.-Y. (2012) Rapid and label-free monitoring of exonuclease III-assisted target recycling amplification, *Anal. Chem.*, 84, 10845–10851, doi: 10.1021/ac303095z.
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Zhou, B., and Wu, S. (2015) A sensitive immobilization-free electrochemical assay for T4PNK activity based on exonuclease III-assisted recycling, *RSC Adv.*, 5, 75348–75353, doi: 10.1039/ C5RA12849H.
- Li, W., Liu, X., Hou, T., Li, H., and Li, F. (2015) Ultrasensitive homogeneous electrochemical strategy for DNA methyltransferase activity assay based on autonomous exonuclease III-assisted isothermal cycling signal amplification, *Biosens. Bioelectron.*, **70**, 304–309, doi: 10.1016/j.bios.2015.03.060.
- Min, X., Xia, L., Zhuang, Y., Wang, X., Du, J., Zhang, X., Lou, X., and Xia, F. (2017) An AlEgens and exonuclease III aided quadratic amplification assay for detecting and cellular imaging of telomerase activity, *Sci. Bull.*, 62, 997–1003, doi: 10.1016/j.scib.2017.06.008.

- Yan, L., Nakayama, S., and Sintim, H.O. (2013) Probe design rules and effective enzymes for endonuclease-based detection of nucleic acids, *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 6181–6185, doi: 10.1016/j.bmc.2013.04.009.
- Liu, S., Zhang, C., Ming, J., Wang, C., Liu, T., and Li, F. (2013) Amplified detection of DNA by an analyte-induced Y-shaped junction probe assembly followed with a nicking endonuclease-mediated autocatalytic recycling process, *Chem. Commun.*, 49, 7947–7949, doi: 10.1039/c3cc45211e.
- Chen, M., Gan, N., Li, T., Wang, Y., Xu, Q., and Chen, Y. (2017) An electrochemical aptasensor for multiplex antibiotics detection using Y-shaped DNA-based metal ions encoded probes with NMOF substrate and CSRP targettriggered amplification strategy, *Anal. Chim. Acta*, **968**, 30–39, doi: 10.1016/j.aca.2017.03.024.
- Wang, Q., Yang, L., Yang, X., Wang, K., He, L., Zhu, J., and Su, T. (2012) An electrochemical DNA biosensor based on the "Y" junction structure and restriction endonuclease-aided target recycling strategy, *Chem. Commun.*, 48, 2982–2984, doi: 10.1039/c2cc17679c.
   Huang, Y., Wang, W., Wu, T., Xu, L.-P., Wen, Y., and
- Huang, Y., Wang, W., Wu, T., Xu, L.-P., Wen, Y., and Zhang, X. (2016) A three-line lateral flow biosensor for logic detection of microRNA based on Y-shaped junction DNA and target recycling amplification, *Anal. Bioanal. Chem.*, 408, 8195–8202, doi: 10.1007/s00216-016-9925-x.
- Zhao, Z., Chen, S., Wang, J., Su, J., Xu, J., Mathur, S., Fan, C., and Song, S. (2017) Nuclease-free target recycling signal amplification for ultrasensitive multiplexing DNA biosensing, *Biosens. Bioelectron.*, 94, 605–608, doi: 10.1016/j.bios.2017.03.051.
- Kiesling, T., Cox, K., Davidson, E.A., Dretchen, K., Grater, G., Hibbard, S., and Danielsen, M. (2007) Sequence specific detection of DNA using nicking endonuclease signal amplification (NESA), *Nucleic Acids Res.*, 35, e117, doi: 10.1093/nar/gkm654.
   Lin, Z., Yang, W., Zhang, G., Liu, Q., Qiu, B., Cai, Z., and
- Lin, Z., Yang, W., Zhang, G., Liu, Q., Qiu, B., Cai, Z., and Chen, G. (2011) An ultrasensitive colorimeter assay strategy for p53 mutation assisted by nicking endonuclease signal amplification, *Chem. Commun.*, **47**, 9069–9071, doi: 10.1039/C1CC13146J.
- Chen, J., Zhang, J., Li, J., Fu, F., Yang, H.H., and Chen, G. (2010) An ultrahighly sensitive and selective electrochemical DNA sensor via nicking endonuclease assisted current change amplification, *Chem. Commun.*, 46, 5939–5941, doi: 10.1039/c0cc00748j.
- doi: 10.1039/c0cc00748j.
  94. Vijayan, A.N., Liu, Z., Zhao, H., and Zhang, P. (2019) Nicking enzyme-assisted signal-amplifiable Hg<sup>2+</sup> detection using upconversion nanoparticles, *Anal. Chim. Acta*, 1072, 75–80, doi: 10.1016/j.aca.2019.05.001.
- Xie, L.S., Li, T.H., Hu, F.T., Jiang, Q.L., Wang, Q.Q., and Gan, N. (2019) A novel microfluidic chip and antibodyaptamer based multianalysis method for simultaneous determination of several tumor markers with polymerization nicking reactions for homogenous signal amplification, *Microchem. J.*, **147**, 454–462, doi: 10.1016/ j.microc.2019.03.028.
- Guo, Q., Yang, X., Wang, K., Tan, W., Li, W., Tang, H., and Li, H. (2009) Sensitive fluorescence detection of nucleic acids based on isothermal circular strand-displacement polymerization reaction, *Nucleic Acids Res.*, 37, e20, doi: 10.1093/nar/gkn1024.
- 97. Giuffrida, M.C., Zanoli, L.M., D'Agata, R., Finotti, A., Gambari, R., and Spoto, G. (2015) Isothermal circularstrand-displacement polymerization of DNA and microRNA in digital microfluidic devices, *Anal. Bioanal. Chem.*, 407, 1533–1543, doi: 10.1007/s00216-014-8405-4.
- Gao, F., Du, L., Zhang, Y., Tang, D., and Du, Y. (2015) Molecular beacon mediated circular strand displacement strategy for constructing a ratiometric electrochemical

deoxyribonucleic acid sensor, Anal. Chim. Acta, 883, 67-73, doi: 10.1016/j.aca.2015.04.058.

- 99. Wang, T., Zhang, Z., Li, Y., and Xie, G. (2015) Amplified electrochemical detection of *mecA* gene in methicillinresistant *Staphylococcus aureus* based on target recycling amplification and isothermal strand-displacement polymerization reaction, *Sens. Actuat. B: Chemical*, 221, 148–154, doi: 10.1016/j.snb.2015.06.057.
- Dirks, R.M., and Pierce, N.A. (2004) Triggered amplification by hybridization chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 101, 15275–15278, doi: 10.1073/pnas.0407024101.
- 101. Xuan, F., and Hsing, I.M. (2014) Triggering hairpin-free chain-branching growth of fluorescent DNA dendrimers for nonlinear hybridization chain reaction, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 9810–9813, doi: 10.1021/ja502904s.
- 102. Bi, S., Chen, M., Jia, X., Dong, Y., and Wang, Z. (2015) Hyperbranched hybridization chain reaction for triggered signal amplification and concatenated logic circuits, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 8144–8148, doi: 10.1002/ anie.201501457.
- 103. Yang, X., Yuebo, Yu, Y., and Gao, Z. (2014) A highly sensitive plasmonic DNA assay based on triangular silver nanoprism etching, ACS Nano, 85, 4902–4907, doi: 10.1021/nn5008786.
- 104. Miao, P., Tang, Y., and Yin, J. (2015) MicroRNA detection based on analyte triggered nanoparticle localization on a tetrahedral DNA modified electrode followed by hybridization chain reaction dual amplification, *Chem. Commun.*, **51**, 15629–15632, doi: 10.1039/C5CC05499K.
- 105. Wu, Z., Liu, G.-Q., Yang, X.-L., and Jiang, J.-H. (2015) Electrostatic nucleic acid nanoassembly enables hybridization chain reaction in living cells for ultrasensitive mRNA imaging, J. Am. Chem. Soc., 137, 6829–6836, doi: 10.1021/ jacs.5b01778.
- 106. Guo, J., Wang, J., Zhao, J., Guo, Z., and Zhang, Y. (2016) Ultrasensitive multiplexed immunoassay for tumor biomarkers based on DNA hybridization chain reaction amplifying signal, ACS Appl. Materials Interfaces, 8, 6898–6904, doi: 10.1021/acsami.6b00756.
- 107. Jie, G., and Jie, G. (2016) Sensitive electrochemiluminescence detection of cancer cells based on a CdSe/ZnS quantum dot nanocluster by multibranched hybridization chain reaction on gold nanoparticles, *RSC Adv.*, 6, 24780–24785, doi: 10.1039/C6RA00750C.
- 108. Choi, H.M.T., Chang, J.Y., Trinh, L.A., Padilla, J.E., Fraser, S.E., and Pierce, N.F. (2010) Programmable *in situ* amplification for multiplexed imaging of mRNA expression, *Nat. Biotechnol.*, 28, 1208–1214, doi: 10.1038/nbt.1692.
- 109. Bertoli, G., Cava, C., and Castiglioni, I. (2015) MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer, *Theranostics*, **5**, 1122–1143, doi: 10.7150/thno.11543.
- 110. Zhang, J., Zhang, W., and Gu, Y. (2018) Enzyme-free isothermal target-recycled amplification combined with PAGE for direct detection of microRNA-21, *Anal. Biochem.*, **550**, 117–122, doi: 10.1016/j.ab.2018.04.024.
- 111. Shuai, H.-L., Huang, K.-J., Xing, L.-L., and Chen, Y.-X. (2016) Ultrasensitive electrochemical sensing platform for microRNA based on tungsten oxide-graphene composites coupling with catalyzed hairpin assembly target recycling and enzyme signal amplification, *Biosens. Bioelectron.*, 86, 337–345, doi: 10.1016/j.bios.2016.06.057.
- 112. Jiang, Z., Wang, H., Zhang, X., Liu, C., and Li, Z. (2014) An enzyme-free signal amplification strategy for sensitive detection of microRNA via catalyzed hairpin assembly, *Anal. Methods*, 6, 9477–9482, doi: 10.1039/C4AY02142H.
- 113. Dong, G., Dai, J., Jin, L., Shi, H., Wang, F., Zhou, C., Zheng, B., Guo, Y., and Dan Xiao, D. (2019) A rapid room-temperature DNA amplification and detection strat-

egy based on nicking endonuclease and catalyzed hairpin assembly, *Anal. Methods*, **11**, 2537–2541, doi: 10.1039/C9AY00507B.

- 114. Xu, J., Guo, J., Maina, S.W., Yang, Y., Hu, Y., Li, X., Qiu, J., and Xin, Z. (2018) An aptasensor for *Staphylococcus aureus* based on nicking enzyme amplification reaction and rolling circle amplification, *Anal. Biochem.*, **549**, 136–142, doi: 10.1016/j.ab.2018.03.013.
- 115. Chen, D., Zhang, M., Ma, M., Hai, H., Li, J., and Shan, Y. (2019) A novel electrochemical DNA biosensor for transgenic soybean detection based on triple signal amplification, *Anal. Chim. Acta*, **1078**, 24–31, doi: 10.1016/j.aca.2019.05.074.
- 116. Song, H., Yang, Z., Jiang, M., Zhang, G., Gao, Y., and Shen, Z., Wu, Z.-S., and Lou, Y. (2019) Target-catalyzed hairpin structure-mediated padlock cyclization for ultrasensitive rolling circle amplification, *Talanta*, **204**, 29–35, doi: 10.1016/j.talanta.2019.05.057.
- 117. Chen, J., and Zhou, S. (2016) Label-free DNA Y junction for bisphenol A monitoring using exonuclease III-based signal protection strategy, *Biosens. Bioelectron.*, 77, 277–283, doi: 10.1016/j.bios.2015.09.042.
- 118. Sun, J., Jiang, W., Zhu, J., Li, W., and Wang, L. (2015) Label-free fluorescence dual-amplified detection of adenosine based on exonuclease III-assisted DNA cycling and hybridization chain reaction, *Biosens. Bioelectron.*, 70, 15–20, doi: 10.1016/j.bios.2015.03.014.
- 119. Bi, S., Li, L., and Cui, Y. (2012) Exonuclease-assisted cascaded recycling amplification for label-free detection of DNA, *Chem. Commun.*, **48**, 1018–1020, doi: 10.1039/ c1cc16684k.
- 120. D'Agata, R., and Spoto, G. (2019) Advanced methods for microRNA biosensing: a problem-solving perspective, *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 4425–4444, doi: 10.1007/ s00216-019-01621-8.

# ISOTHERMAL AMPLIFICATION METHODS OF NUCLEIC ACIDS AND THEIR APPLICATION IN BIOANALYSIS

### Review

### O. L. Bodulev and I. Yu. Sakharov\*

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119991 Moscow, Russia; E-mail: sakharovivan@gmail.com

Received August 13, 2019 Revised November 1, 2019 Accepted November 1, 2019

In recent years, isothermal amplification methods of nucleic acids are intensely developed as an alternative of polymerase chain reaction (PCR). The advantage of these methods is that the amplification of nucleic acids is carried out at a constant temperature, in contrast to PCR, which requires a cyclic change in temperature. In addition, isothermal amplification of nucleic acids can be carried out directly in living cells. This review presents the principles of the isothermal amplification methods and demonstrates their high efficiency in the construction of new highly sensitive methods for the analysis of both nucleic acids and enzymes responsible for their modification. Moreover, data are presented on their successful application in bioanalysis of cells and biomolecules with the use of DNA/RNA aptamers.

Keywords: nucleic acids, amplification, isothermal, bioanalysis, aptamers

УДК 577.1

# ТИМОХИНОН КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ НЕЙРОПРОТЕКТОР ПРИ ОСТРЫХ И ХРОНИЧЕСКИХ ФОРМАХ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ

## Обзор

© 2020 Н.К. Исаев<sup>1,2\*</sup>, Н.С. Четвериков<sup>2</sup>, Е.В. Стельмашук<sup>1</sup>, Е.Е. Генрихс<sup>1</sup>, Л.Г. Хаспеков<sup>1\*</sup>, С.Н. Иллариошкин<sup>1</sup>

 Научный центр неврологии, 125367 Москва, Россия; электронная почта: nisaev61@mail.ru, khaspekleon@mail.ru
 Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия

> Поступила в редакцию 16.07.2019 После доработки 12.11.2019 Принята к публикации 28.11.2019

Тимохинон является одним из основных биологически активных компонентов эфирного масла, получаемого из семян растения черного тмина (*Nigella sativa*). По современным данным, это вещество обладает широким спектром фармакологической активности, в том числе, и нейропротекторным действием, которое было продемонстрировано при экспериментальном моделировании ишемии/реперфузии головного мозга, болезней Альцгеймера и Паркинсона, черепно-мозговой травмы. Нейропротекторное действие тимохинона опосредуется ингибированием перекисного окисления липидов, снижением уровня провоспалительных цитокинов, поддержанием мембранного потенциала митохондрий, а также предотвращением апоптоза за счёт ингибирования каспаз 3, 8 и 9. Митохондриально-адресованные антиоксиданты, созданные на основе тимохинона, способны накапливаться в митохондриях и проявлять нейропротекторные свойства в наномолярных концентрациях. Имеющиеся в настоящее время данные показывают, что тимохинон является эффективным средством для снижения негативных последствий острых и хронических форм церебральной патологии. Поэтому необходимо более детальное исследование механизмов фармакологического действия тимохинона и его химических производных. В данной работе описана возможность использования для терапии целого ряда нейродегенеративных заболеваний как самого тимохинона, так и создаваемых на его основе препаратов направленного действия.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** тимохинон, ишемия, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, черепно-мозговая травма, митохондриально-адресованные антиоксиданты, нейропротекция.

DOI: 10.31857/S0320972520020049

Тимохинон (TQ; 2-изопропил-5-метил-1,4бензохинон, рис. 1) является фармакологически активным хиноном растительного происхождения, который обнаружен в семенах чернушки посевной или чёрного тмина (*Nigella sativa*, Ranunculaceae), где его содержание составляет от 30 до 48% [1], а также в ряде растений семейства Яснотковые (Lamiaceae), в посконнике коноплёвом (*Eupatoriim cannabium*, Asteraceae) и можжевельнике обыкновенном (*Juniperus communis*, Cupressaceae) [2]. Чёрный тмин использовали в медицинских целях с древних времён и его применение приобретает все большую актуальность. В чистом виде TQ представляет собой ярко-жёлтое кристаллическое соединение, которое впервые было синтезировано в 1910 г. путём окисления тимола (2-изопропил-5-метилфенола) перекисью водорода [3].

Согласно современным представлениям, TQ и его производным свойственна высокая фармакологическая активность, направленная на терапию заболеваний различных органов и систем. В экспериментальных работах последнего десятилетия *in vitro* и *in vivo* описаны противовоспалительные, антиоксидантные [4], антигипертензивные [5], антиастматические [6], антидиабетические [7], противоопухолевые [8] эффекты TQ. Об этом же свидетельствуют приведенные в недавних обзорных работах сведения о благоприятных терапевтических эффектах соединений на основе TQ при раковых, инфекционных, сердечно-сосудистых, желудоч-

<sup>\*</sup> Адресат для корреспонденции.



**Рис. 1.** Структурные формулы тимохинона (TQ), митохондриально-адресованных антиоксидантов на основе TQ: 10-(6'-толукинонил)децилродамин 19 (SkQTR1), 10-(6'-толукинонил)децилтрифенил фосфоний (SkQT1) и лишенного TQ додецилтрифенил фосфония (C12TPP)

но-кишечных, респираторных заболеваниях, сахарном диабете, гиперлипидемии и других патологических состояниях в клинике и при их экспериментальном моделировании [9, 10]. Авторы на основе анализа литературы указывают на возможные молекулярные механизмы, опосредующие терапевтические эффекты тимохинона при онкологических заболеваниях. В частности, приводятся данные о том, что TQ влияет на экспрессию регуляторов пролиферации и/или активность клеточного цикла, вызывая его торможение, повреждение ДНК и апоптоз как зависимый, так и не зависимый от транскрипционного фактора р53 и других проапоптотических факторов, и препятствуя тем самым неконтролируемому росту и репродукции раковых клеток. Отмечается, что связанный с активацией апоптоза антираковый эффект TQ может быть также обусловлен блокадой антиапоптотических белков и регуляцией каспазного каскада. Избирательно блокируя специфический фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), TQ ингибирует тубулогенез (начальную стадию ангиогенеза) и, как следствие, тормозит разрастание в опухоли кровеносных сосудов, ограничивая доступ к ней кислорода и питательных веществ и препятствуя ее росту и метастазированию. Противовоспалительные эффекты TQ могут быть связаны с его способностью ингибировать экспрессию медиаторов воспаления, таких как COX-2, iNOS, 5-липоксигеназа, TNF-α и активацию сигнальных путей транскрипционного фактора NF-kB, Akt и ERK. Результаты ряда экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что ТО обладает широким спектром нейромодуляторных и нейропротекторных свойств [11]. Так, показана его важная роль в оптимизации процессов обучения и памяти [12, 13]. Обнаружен защитный эффект TQ при эпилепсии [14], нейротоксичности этанола [15], а также воздействии неблагоприятных факторов внешней среды и различных токсинов. В частности, TQ защищал ткань мозга крыс от повреждения, вызванного пероральным введением пищевых консервантов, препятствуя повышению в ней уровней малонового диальдегида (MDA), TGF- $\beta$ , *с*-реактивного белка, NF- $\kappa$ B, ТNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , каспазы-3, которое сопровождалось снижением уровней глутатиона, цитохром с-оксидазы, Nrf2 и IL-10 [16]. Эти данные позволили авторам сделать заключение, что защитный эффект TQ обусловлен, прежде всего, его антиоксидантными свойствами. В других работах при пероральном введении соединений мышьяка TQ препятствовал снижению в ткани коры, мозжечка и ствола мозга крыс активности Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФазы, уровней норадреналина, допамина, ацетилхолинэстеразы, глутатиона, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, супероксиддисмутазы и каталазы, также как и повышению уровней малонового диальдегида, нитритов и нитратов, фактора некроза опухоли [17]. Кроме того, ТО ингибировал вызванную токсичностью мышьяка гиперпродукцию активных форм кислорода (АФК) в гиппокампе крыс и восстанавливал сниженный мембранный потенциал митохондрий, ингибируя индуцируемое АФК открывание митохондриальной транзитной поры [18]. В культивируемых клетках линии SHSY-5Y нейробластомы человека, подвергнутых цитотоксическому действию мышьяка, ТО препятствовал усилению генерации АФК, снижал уровни проапоптотического белка ВАХ, повышал содержание антиапоптотического белка Bcl2, нормализовал трансмембранный потенциал [19]. С антиоксидантной активностью связывают защитный эффект TQ при нейротоксическом действии на кору головного мозга крыс акриламида, введенного внутрибрюшинно [20, 21]. В детальных нейрогистологических и ультраструктурных исследованиях показано нейропротекторное действие TQ, опосредуемое его антиапоптотической активностью, при повреждении гиппокампа и фронтальной коры головного мозга крыс, вызываемом хронической ингаляцией толуола. Так, в присутствии TQ иммунореактивность каспазы-3 в цитоплазме нейронов, повышенная под влиянием толуола, снижалась. Кроме того, ТО предотвращал вызванное толуолом увеличение числа TUNEL-позитивных нейронов [22, 23], то есть предотвращал развитие программированной клеточной гибели.

Особый интерес для неврологической клиники представляют нейропротекторные эффекты TQ при моделировании ишемии головного мозга, черепно-мозговой травмы (ЧМТ), болезней Альцгеймера (БА) и Паркинсона (БП), а также других форм острой и хронической церебральной патологии [24], в патогенезе которых важную роль играют АФК. Следует отметить, что в этом отношении эффективными и перспективными соединениями, оказывающими в наномолярных концентрациях защитный эффект, являются созданные на основе TQ митохондриально-адресованные антиоксиданты, аккумулируемые митохондриями [25] (рис. 1).

Все выше сказанное определяет перспективность использования не только самого тимохинона для терапии ряда заболеваний, но и его применения в качестве основы для разработки препаратов направленного действия.

### НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ТО ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ И ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Черепно-мозговая травма вызывает комплексное повреждение головного мозга и является одной из наиболее распространённых причин смертности в мире. Считается, что от 64 до 79 млн человек ежегодно подвергаются ЧМТ [26]. Проявления последствий ЧМТ зависят от ее тяжести и могут быть незначительными, умеренными или тяжелыми, варьируя от ультраструктурных повреждений до механического разрушения значительных участков головного мозга. Результатом тяжелой травмы может стать смерть, потеря сознания, утрата способности адекватно реагировать на окружающую действительность, тяжелые моторные, речевые нарушения и психические дисфункции. ЧМТ вызывает в головном мозге комплекс нейродеструктивных биохимических процессов, включая воспаление, увеличение продукции свободных радикалов, оксида азота, перекисного окисления липидов, повышение уровня внутриклеточного кальция [27], что, в конечном счете, приводит к неврологическим нарушениям.

Повышение продукции активных форм кислорода митохондриями после ЧМТ является важнейшим патогенетическим механизмом нейродеструкции, приводящим к селективному перекисному окислению митохондриального кардиолипина [28]. АФК также активируют различные молекулярные сигнальные пути, связанные с гибелью клеток [29]. Кроме того, ЧМТ может вызывать развитие длительных нейро-дегенеративных процессов, связанных с увеличением риска возникновения БА [30, 31]. Это, повидимому, обусловлено тем, что при серьезных повреждениях головного мозга, как и при БА, снижается концентрация белков GGA1 и GGA3, ответственных за деградацию фермента β-секретазы (BACE1) в лизосомах. В результате происходит накопление ВАСЕ1, которая вместе с гамма-секретазным комплексом расщепляет белковый предшественник β-амилоидного белка, что приводит к накоплению самого β-амилоида (Аβ) [32]. Логично предположить, что такое соединение как TQ, обладающее противовоспалительными и антиоксидантными свойствами, показанными при моделировании БА (см. ниже), может быть использовано и для лечения нейродегенерации, вызванной ЧМТ.

Действительно, с использованием биохимических и гистологических методов нейропротекторные эффекты TQ были показаны на модели открытой односторонней ЧМТ крыс [33]. В этих экспериментах через 7 дней после ЧМТ плотность нейронов в контралатеральных областях гиппокампа (поля СА1, СА2-3 и СА4), по сравнению с контрольной группой, значительно снижалась, тогда как уровень маркера перекисного окисления липидов, малонового диальдегида в ткани мозга повышался. В то же время TQ в дозе 5 мг/кг, введенный после травматического воздействия, предотвращал снижение плотности нейронов в гиппокампе, уменьшая при этом содержание MDA. Таким образом, одним из механизмов защитного действия TQ при ЧМТ является уменьшение интенсивности окислительного стресса в нейронах. Правда, в настоящее время это единственная работа, демонстрирующая нейропротекторные свойства TQ при ЧМТ. Наряду с этим, показан защитный эффект TQ при моделировании травмы спинного мозга у крыс [34].

Следует отметить, что одним из самых тяжелых последствий ЧМТ является нарушение церебрального сосудистого русла, что ведет к локальной ишемизации отдельных структур головного мозга и вызывает временную дисфункцию или необратимое повреждение нервных клеток в зоне ЧМТ. ТQ является эффективным средством защиты различных органов от ишемического повреждения [35], к которому головной мозг наиболее чувствителен. Острые нарушения мозгового кровообращения (инсульты) вторая, после ишемической болезни сердца, наиболее частая причина смертности населения в мире [36]. В Российской Федерации регистрируется 350–400 случаев инсульта в год на 100 тыс. населения. По данным Научного центра неврологии, двигательные нарушения после инсульта к концу его острого периода наблюдаются у 85% выживших пациентов, а к концу первого года — у 70%, тогда как речевые нарушения (афазия) соответственно у 36 и 18% [37]. Основными факторами, приводящими к гибели нейронов при ишемии, являются гипоксия и гипогликемия, а также связанные с ними окислительный стресс, ацидоз и глутаматная цитотоксичность [38].

TQ при моделировании ишемии, как и при ЧМТ, проявлял выраженные нейропротекторные свойства. При транзиторной ишемии переднего мозга крыс, индуцированной 10-минутной двусторонней окклюзией обеих общих сонных артерий с последующей реперфузией, ТО в дозе 5 мг/кг вводили животным ежедневно в течение 5 дней до ишемического воздействия, а также во время реперфузии, вплоть до вывода животных из эксперимента через 7 дней. Обнаружено, что ТО способствует выживаемости нейронов в поле СА1 гиппокампа, а также снижает уровень MDA и препятствует снижению уровней глутатиона, каталазы и супероксиддисмутазы в ткани мозга [39]. Положительное действие TQ было продемонстрировано и при ишемии головного мозга крыс, вызванной 20минутной четырехсосудистой окклюзией сонных артерий. TQ вводили животным непосредственно до и в последующие 2 дня после ишемии в концентрации 10 мг/кг, что приводило к достоверному снижению уровня MDA по сравнению с ишемической группой [40].

В одной из работ [1] в модели ишемии/реперфузии у крыс в качестве прототипа нейропротекторного препарата была предложена содержащая ТО интраназальная мукоадгезивная наноэмульсия, полученная способом ионного гелеобразования, которая оказалась более эффективной, чем препараты TQ, вводимые внутривенно. В другой работе [41] при том же методе моделирования ишемии исследованы нейропротекторные свойства наночастиц, оптимизированных комплексом поли(лактид-ко-гликолид)+хитозан (PLGA+chitosan) и нагруженных TQ (TQ-PLGA NPs). Интраназальное введение TQ-PLGA NPs крысам, подвергнутым окклюзии средней мозговой артерии, препятствовало увеличению объема ишемического инфаркта у животных, улучшало их локомоторную активность и повышало силу хватки лап. Биохимический анализ выявил значительное снижение перекисного окисления липидов в ткани мозга под влиянием TQ-PLGA NPs, сопутствующее повышению уровня глутатиона, каталазы и супероксиддисмутазы. Фармакокинетический анализ показал, что включение TQ в состав PLGA NPs облегчает его доставку к тканям мозга. Полученные данные позволяют считать TQ-PLGA NPs перспективным прототипом создания средств лечения церебральной ишемии (и других форм церебральной патологии), особенно эффективных при включении TQ в наноносители [42, 43].

При моделировании спинальной ишемии TQ также препятствовал повышению уровня продуктов перекисного окисления липидов в ткани спинного мозга, способствовал нормализации содержания в ней антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, каталазы), и, кроме того, снижал активность провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1) и защищал мотонейроны от апоптоза [44].

### НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ТИМОХИНОНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНЕЙ АЛЬЦГЕЙМЕРА И ПАРКИНСОНА

Болезнь Альцгеймера — нейродегенеративное заболевание, распространённость которого с каждым годом увеличивается. По ориентировочным оценкам, в настоящее время в мире от БА страдают ~ 26 млн человек, причем уже к 2030 г. прогнозируется увеличение числа больных вдвое, а к 2050 г. – вчетверо [45]. Популяционная частота БА неуклонно растет по мере увеличения возраста, что заставляет отнести ее к заболеваниям, накладывающим на общество в развитых странах тяжелейшую финансовую нагрузку [46]. Этиология болезни и механизмы патогенеза изучены недостаточно. В настоящее время предполагается, что основными триггерами нейродегенеративных процессов при БА являются бета-амилоидный пептид и гиперфосфорилированный внутриклеточный белок тау, накопление которых сопровождается дисбалансом вне- и внутриклеточного содержания, и распределения ионов цинка и меди, а, возможно, и железа [47]. Известно, что Аβ в субмикромолярных концентрациях нарушает синаптическую передачу в глутаматергических синапсах, в то время как в микромолярных вызывает нейродегенерацию по апоптотическому типу [48, 49]. Получены данные, указывающие на митохондриальную токсичность Аβ, связанную, в частности, с усилением продукции АФК [50].

На клеточном уровне для БА характерна потеря нейронов и синаптических связей в коре головного мозга и определённых субкортикальных областях, что сопровождается накоплением амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клуб-

ков. У пациентов происходит постепенное ухудшение церебральных функций (нарушаются когнитивные способности, снижается память), и в течение 3–9 лет наступает летальный исход. В настоящий момент не существует лечения, способного прекратить развитие БА, а препараты, применяемые для фармакотерапии (ингибиторы холинэстеразы, мемантин), лишь сглаживают симптомы и являются, по сути, паллиативной мерой. В связи с этим актуальной задачей остается поиск веществ, способных влиять на патогенез БА, важную роль в котором, как указывалось выше, играет окислительный стресс и в развитие которого вовлечен Аβ. Показано, что при БА вызванная Аβ гиперпродукция митохондриями АФК инициирует каскад процессов, которые вызывают гибель нейронов [51]. Высокая антиоксидантная активность и антивоспалительные свойства TQ создали предпосылки для его тестирования в качестве потенциального нейропротектора при моделировании БА как *in vitro*, так и *in vivo*. Авторы одного из недавних обзоров [52] по результатам анализа литературы с использованием системы CAMARADES (Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies) продемонстрировали высокий терапевтический потенциал, которым обладает TQ благодаря его антиоксидантным и противовоспалительным свойствам. В частности, в экспериментах in vitro было показано, что TQ способен снижать токсичность Аβ в культуре линии недифференцированных клеток феохромоцитомы (РС 12), ингибируя окислительный стресс и сохраняя нормальную работу митохондрий путём поддержания физиологических уровней матриксных металлопротеиназ и АФК [53]. Кроме того, ТО защищал клетки нейробластомы человека (SH-SY5Y) от токсичности Аβ путем воздействия на TNF-индуцированный сигнальный каскад, повышая при этом уровень глутатиона и снижая продукцию оксида азота [54]. Положительные результаты были получены и в экспериментах на первичных культурах нейронов коры головного мозга и гиппокампа. Помимо поддержания мембранного потенциала митохондрий и снижения окислительного стресса, TQ уменьшал альфа-синуклеин-индуцированное нарушение рециркуляции синаптических везикул [55, 56]. В культурах клеток-зерен мозжечка TQ не только предотвращал апоптоз, вызываемый Аβ за счёт ингибирования каспаз 3, 8 и 9, но и препятствовал агрегации Аβ, а также способствовал сохранению нормальной морфологии как отдельных клеток, так и нейронной сети в целом [57, 58].

В настоящее время показано позитивное действие TQ при моделировании механизмов

4 БИОХИМИЯ том 85 вып. 2 2020

патогенеза БА на клетках человека, полученных методами генной инженерии [59]. В эксперименте использовали холинергические нейроны человека, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). По данным авторов этой работы, А $\beta$ 1–42 вызывал апоптотическую гибель ИПСК, которая эффективно предотвращалась ТQ. Кроме того, TQ блокировал снижение уровня глутатиона и повышение генерации АФК, вызванных в нейронах обработкой А $\beta$ . Интересно, что TQ смог уменьшить также синаптические нарушения, развивавшиеся в культурах при их инкубации с А $\beta$ .

Несмотря на сильную гидрофобность, затрудняющую применение TQ в экспериментах in vivo, его защитные свойства были продемонстрированы при моделировании БА у животных. Так, при индукции спорадической формы БА путем интрацеребровентрикулярной инъекции стрептозотоцина двухнедельное ежедневное внутрижелудочное введение TQ улучшало память и когнитивные способности крыс [60]. В настоящее время показана тесная взаимосвязь нейровоспаления с нейродегенеративными процессами при БА, причем на ряде моделей нейродегенерации обнаружены противовоспалительные свойства TQ. В частности, он препятствовал нарушениям способности крыс к обучению и запоминанию при нейровоспалении, индуцированном липополисахаридом. Кроме того, эффекты ТО сопровождались снижением уровней провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-6) и маркеров оксидативного повреждения (монооксид азота, MDA) в гиппокампе [61]. В одной из недавних работ использована модель БА, полученная в результате инъекции АВ в гиппокамп крыс, после которой в течение 4-х недель внутрибрюшинно вводили TQ в дозах 5 и 10 мг/кг [62]. Выявлен положительный эффект TQ в поведенческом тесте пассивного избегания, а также обнаружено снижение интенсивности формирования включений Аβ в поле СА1 и повышение выживаемости пирамидных нейронов гиппокампа.

Болезнь Паркинсона – еще одно неизлечимое нейродегенеративное заболевание, для которого характерны патологические процессы в экстрапирамидной моторной системе и прогрессирующая гибель дофаминергических нейронов, прежде всего, в чёрной субстанции (*substantia nigra*). Ключевые роли в развитии этой болезни играют агрегация α-синуклеина с образованием телец Леви, индукция нейровоспаления и окислительный стресс [63, 64]. Характерные для БП симптомы (тремор, гипокинезия, мышечная ригидность, постуральная неустой-

чивость) возникают при гибели 60-80% нейронов черной субстанции [65]. В настоящее время действие препаратов, используемых в терапии БП, приводит лишь к облегчению симптомов. К этой группе медикаментов относятся леводопа, агонисты дофаминовых рецепторов и ингибиторы моноаминоксидазы-Б. Самыми распространенными моделями нейродегенеративных процессов при БП *in vivo* являются введение животным 1-метил-4-фенилпиридиния (МРР+), 6гидроксидофамина или ротенона, a in vitro – обработка клеточных культур дофаминергических нейронов этими соединениями, которые оказывают нейродеструктивный эффект, опосредуемый перекисным окислением липидов и прямым ингибированием дыхательной цепи митохондрий [66].

Используя подобную модель in vitro, было показано, что TQ в концентрациях 0,01-10 мкМ предотвращает (МРР+)-индуцированную гибель мезенцефалических дофаминергических нейронов, уменьшая высвобождение лактатдегидрогеназы и способствуя поддержанию мембранного потенциала митохондрий. В то же время происходит активация процесса аутофагии, что способствует снижению апоптотической гибели клеток [67]. Аутофагия является естественным механизмом клетки, который устраняет ненужные или поврежденные органеллы и молекулы. Этот процесс может индуцироваться окислительным или токсическим стрессом. Нарушение механизма аутофагии может привести к развитию нейродегенеративных заболеваний. Например, при БА в отростках нейронов наблюдается нарушение аутофагии. Следует отметить, что в настоящее время данные о влиянии TQ на аутофагию несколько противоречивы. В работе, выполненной на клетках линий 786-О и ACHN [68], показано индуцирующее аутофагию действие TQ, тогда как на глиобластоме продемонстрировано ингибирование аутофагии под влиянием TQ [69]. Однако в этих исследованиях использовали довольно высокие (более 40 мкМ) концентрации TQ, которые, по нашим данным, могут быть токсичны и для нейронов [70], тогда как нейропротекторное действие TQ проявляется в концентрациях 1 мкМ и ниже [57, 67], именно тогда наиболее вероятно ожидать активации аутофагии при действии TQ.

Защитное действие TQ было продемонстрировано и при моделировании болезни Паркинсона с помощью ротенона. В этой модельной системе TQ (0,01–1 мкМ) предотвращал гибель первичных дофаминергических нейронов [71]. Особенно интересные результаты были получены при исследовании эффектов TQ в условиях α-синуклеин-индуцированной синаптической токсичности в культурах нейронов гиппокампа крыс и дифференцированных из ИПСК человека. Оказалось, что в обоих типах культур TQ в концентрации 0,01 мкМ защищает культивируемые нейроны от повреждений синапсов α-синуклеином, повышает уровень синаптофизина (индикатора синаптической плотности), препятствует вызванному мутировавшим геном β-синуклеина Р123Н ингибированию рециркуляции синаптических пузырьков. Кроме того, используя метод культивирования клеток на мультиэлектродных матрицах, авторам удалось показать, что TQ способствует поддержанию нормальной электрической активности нейронной сети, которая была нарушена действием α-синуклеина [56, 59].

В экспериментах *in vivo* TQ также обнаружил эффекты, способные улучшить течение БП. При моделировании БП на мышах с использованием 1-метил-4-фенил-1,2,3,6 тетрагидропиридина (МРТР), который вызывает развитие окислительного стресса и нейровоспаления в головном мозге, показано, что TQ восстанавливает активность антиоксидантных ферментов, препятствует истощению глутатиона, ингибирует перекисное окисление липидов и снижает уровень провоспалительных цитокинов [72]. В ротенон-индуцированной модели БП TQ предотвращал моторные нарушения, а также изменения содержания белков Parkin и Drp1, падение уровня дофамина в дофаминергических областях черной субстанции и полосатом теле мозга крыс [73]. Положительные данные о нейропротекторном действии TQ были получены и при введении в стриатум 6-гидроксидофамина, приводящем к потере нейронов и нарушению поведения животных [74].

Таким образом, можно заключить, что TQ обладает высоким нейропротекторным потенциалом и может быть в перспективе использован для разработки прототипов терапевтических средств, направленных на снижение риска фатального развития БА и других дегенеративных заболеваний центральной нервной системы.

### МИТОХОНДРИАЛЬНО-АДРЕСОВАННЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ НА ОСНОВЕ ТИМОХИНОНА

Как было показано выше, нейропротекторное действие TQ обусловлено, прежде всего, его антиоксидантными свойствами. В то же время недостатком препарата является отсутствие направленного действия и высокая гидрофобность. Известно, что митохондрии являются одними из главных компартментов генерации сво-

бодных радикалов в клетке и единственными внутриклеточными органеллами, матрикс которых отрицательно заряжен. В связи с этим были созданы митохондриально-адресованные антиоксиданты, способные электрофоретически транспортироваться в митохондрии и накапливаться в их матриксе [75]. Основой для создания этих соединений явились результаты исследований, выполненных в 1960-х-начале 1970-х гг. группой В.П. Скулачева и Е.А. Либермана и показавших, что липофильные ионы с делокализованным зарядом, экранированным объемистыми заместителями, свободно проникают в митохондрии и субмитохондриальные частицы под действием электрического поля внутренней митохондриальной мембраны [76].

Таким образом, SkQ благодаря своей липофильности хорошо проникает через липидный бислой, а наличие положительного заряда в молекуле этого вещества приводит к его движению по электрическому потенциалу, накоплению и удерживанию в митохондриях за счет наличия отрицательного заряда в их матриксе. SkQ1 так располагается в мембране митохондрий, что остаток пластохинона находится точно около С9 или С13 кардиолипина, который наиболее подвержен действию активных форм кислорода. Таким образом, он может быстро и эффективно нейтрализовать пероксильный радикал кардиолипина [77]. В качестве антиоксидантной части молекулы в синтезированных митохондриально-адресованных антиоксидантах были использованы производные пластохинона и TQ, а в качестве транспортной - проникающий катион тетрафенилфосфоний или родамин 19. TQ – производное пластохинона с одним метильным заместителем в ароматическом кольце. Наибольшей антиоксидантной активностью в ряду митохондриально-направленных антиоксидантов обладают соединения с тимохиноном: 10-(6'-толукинонил) децилродамин 19 (SkQTR1) или смеси 10-(6'-толукинонил)- и 10-(5'-толукинонил)децилтрифенил фосфония в пропорции 1,4:1 (SkQT1) [25] (рис. 1). Антиоксидантная активность осуществляется прямой нейтрализацией АФК за счет окисления TQ. Установлено, что тимохиноновый SkQ проявляет выраженную антиоксидантную активность, снижая продукцию перекиси водорода в митохондриях, а также предотвращая прооксидантно-индуцированный окислительный стресс, фрагментацию митохондрий и апоптоз, тем самым повышая жизнеспособность клеток [78]. Однако следует отметить, что нейропротекторное действие митохондриально-адресованных антиоксидантов может осуществляться не только прямым, но и косвенным способом, посредством выделения нейропротекторов другими органами и инактивированием апоптотических ферментов. Например, через 24 ч после введения SkQR1 в головном мозге было обнаружено повышение уровня эритропоэтина и фосфорилированной гликогенсинтазы киназы-3b (GSK-3b) [79]. Особенно переспективно то, что содержащие TQ митохондриально-адресованные соединения показали высокую нейропротекторную активность на различных моделях церебральной патологии, таких как ишемия, ЧМТ, БА [80–83].

При моделировании фокальной открытой односторонней ЧМТ зоны сенсомоторной коры крысы установлено, что внутрибрюшинные инъекции наномолярных концентраций SkQT1 или SkOTR1 значительно снижают неврологический дефицит, вызванный травмой. Кроме того, однократное внутрибрюшинное введение SkQT1 крысам предотвращало вызываемое Аβ ингибирование длительной потенциации в срезах гиппокампа этих животных [80]. В настоящее время считается, что длительная потенциация синаптической передачи в гиппокампе является моделью синаптических изменений, лежащих в основе формирования обучения и памяти. Аналог SkQT1 без антиоксидантной части молекулы, С12ТРР, был неэффективен в таких экспериментах [80]. Механизм вызываемого Аβ ингибирования длительной потенциации в срезах гиппокампа может быть связан с гиперпродукцией митохондриальных АФК, индуцируемой Аβ [84]. Митохондриально-адресованные антиоксиданты, содержащие TQ, оказывали нейропротекторный эффект и при моделировании у крыс церебральной ишемии, полученной путем окклюзии средней мозговой артерии. Показано, что при введении животным SkQT1 или SkQTR1 cpasy после реперфузии снижается неврологический дефицит и отек головного мозга [81].

Таким образом, митохондриально-адресованные антиоксиданты, созданные на основе TQ, являются новой формой нейропротекторов, действие которых направлено на определенные органеллы клетки, а их защитный эффект, показанный на различных моделях нейродегенерации, подтверждает участие митохондриальных АФК в механизмах патологических процессов при ЧМТ, ишемии головного мозга, БА и БП.

Многомерные каскады повреждения нейронов при нейродегенеративных процессах предлагают много потенциальных целей для терапевтических вмешательств, что подразумевает множество точек, на которые могут воздействовать нейропротекторы. Одним из таких веществ, которое можно использовать в мультивалентной терапевтической стратегии, является тимохинон



**Рис. 2.** Потенциальные цели в многомерных каскадах повреждения нейронов при нейродегенеративных процессах для терапевтического вмешательства тимохинона.

С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

(рис. 2). Это заключение подтверждают представленные в настоящее время данные, что нейропротекторное действие тимохинона опосредовано его способностью предотвращать развитие окислительного стресса, а также поддерживать мембранный потенциал митохондрий, активировать процесс аутофагии, понижать уровень провоспалительных цитокинов и в итоге предупреждать апоптотическую гибель клеток.

Вместе с тем, следует признать, что работы, направленные на исследование защитного потенциала как тимохинона, так и модификаций его молекулы, в настоящее время пока немногочисленны. Тем не менее, результаты этих исследований показывают, что тимохинон является эффективным и перспективным нейропротекторным средством при повреждениях, вызванных травмой и ишемией, а также при патологических процессах, характерных для болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона. В дальнейшем необходимо не только более детальное исследование механизмов защитного действия тимохинона и его химических производных, но и оценка стабильности оказанного терапевтического эффекта, так как нейродегенеративные процессы в головном мозге человека могут развиваться довольно длительное время.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В настоящей работе отсутствуют исследования, в которых использовали людей или животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ahmad, N., Ahmad, R., Alam, M.A., Samim, M., Iqbal, Z., and Ahmad, F.J. (2016) Quantification and evaluation of thymoquinone loaded mucoadhesive nanoemulsion for treatment of cerebral ischemia, *Int. J. Biol. Macromol.*, 88, 320–332, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.03.019.
- Goyal, S.N., Prajapati, C.P., Gore, P.R., Patil, C.R., Mahajan, U.B., Sharma, C., Talla, S.P., and Ojha, S.K. (2017) Therapeutic potential and pharmaceutical development of thymoquinone: a multitargeted molecule of natural origin, *Front. Pharmacol.*, 8, 656, doi: 10.3389/fphar.2017.00656.
- Myers, A.L., Zhang, Y.P., Kramer, M.A., Bornmann, W.G., Kaseb, A., Yang, P., and Tran, H.T. (2012) A practical synthesis and X-ray crystallographic analysis of dithymoquinone, a photodimer of thymoquinone, *Lett. Org. Chem.*, 9, 762–766, doi: 10.2174/157017812803901890.
- Ragheb, A., Attia, A., Eldin, W.S., Elbarbry, F., Gazarin, S., and Shoker, A. (2009) The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: a review, *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.*, **20** 741–752.
- Jaarin, K., Foong, W.D., Yeoh, M.H., Kamarul, Z.Y., Qodriyah, H.M., Azman, A., Zuhair, J.S., Juliana, A.H., and Kamisah, Y. (2015) Mechanisms of the antihypertensive effects of *Nigella sativa* oil in L-NAME-induced hypertensive rats, *Clinics (Sao Paulo)*, **70**, 751–757, doi: 10.6061/clinics/2015(11)07.
- Keyhanmanesh, R., Boskabady, M.H., Khamneh, S., and Doostar, Y. (2010) Effect of thymoquinone on the lung pathology and cytokine levels of ovalbumin-sensitized guinea pigs, *Pharmacol. Rep.*, **62**, 910–916.
- Bamosa, A.O., Kaatabi, H., Lebdaa, F.M., Elq, A.M., and Al-Sultanb, A. (2010) Effect of Nigella sativa seeds on the glycemic control of patients with type 2 diabetes mellitus, *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 54, 344–354.

- Kaseb, A.O., Chinnakannu, K., Chen, D., Sivanandam, A., Tejwani, S., Menon, M., Dou, Q.P., and Reddy, G.P. (2007) Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer, *Cancer Res.*, 67, 7782–7788, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1483.
- 9. Darakhshan, S., Bidmeshki Pour, A., Hosseinzadeh Colagar, A., and Sisakhtnezhad, S. (2015) Thymoquinone and its therapeutic potentials, *Pharmacol. Res.*, **95**, 138–158, doi: 10.1016/j.phrs.2015.03.011.
- Gholamnezhad, Z., Havakhah, S., and Boskabady, M.H. (2016) Preclinical and clinical effects of *Nigella sativa* and its constituent, thymoquinone: a review, *J. Ethnopharmacol.*, **190**, 372–386, doi: 10.1016/j.jep. 2016.06.061.
- Farkhondeh, T., Samarghandian, S., Shahri, A.M.P., and Samini, F. (2018) The neuroprotective effects of thymoquinone: a review, *Dose Response*, 16, doi: 10.1177/ 1559325818761455.
- Beheshti, F., Hosseini, M., Vafaee, F., Shafei, M.N., and Soukhtanloo, M. (2015) Feeding of *Nigella sativa* during neonatal and juvenile growth improves learning and memory of rats, *J. Tradit. Complement. Med.*, 6, 146–152, doi: 10.1016/j.jtcme.2014.11.039.
- Sahak, M.K., Kabir, N., Abbas, G., Draman, S., Hashim, N.H., and Hasan Adli, D.S. (2016) The role of *Nigella sativa* and its active constituents in learning and memory, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2016, 6075679, doi: 10.1155/2016/6075679.
- Shao, Y.Y., Li, B., Huang, Y.M., Luo, Q., Xie, Y.M., and Chen, Y.H. (2017) Thymoquinone attenuates brain injury via an anti-oxidative pathway in a status epilepticus rat model, *Transl. Neurosci.*, 8, 9–14, doi: 10.1515/tnsci-2017-0003.

- 15. Ullah, I., Ullah, N., Naseer, M.I., Lee, H.Y., and Kim, M.O. (2012) Neuroprotection with metformin and thymoquinone against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat cortical neurons, *BMC Neurosci.*, **13**, 11, doi: 10.1186/1471-2202-13-11.
- Hamdan, A.M., Al-Gayyar, M.M., Shams, M.E.E., Alshaman, U.S., Prabahar, K., Bagalagel, A., Diri, R., Noor, A.O., and Almasri, D. (2019) Thymoquinone therapy remediates elevated brain tissue inflammatory mediators induced by chronic administration of food preservatives, *Sci. Rep.*, 9, 7026, doi: 10.1038/s41598-019-43568-x.
- Kassab, R.B., and El-Hennamy, R.E. (2017) The role of thymoquinone as a potent antioxidant in ameliorating the neurotoxic effect of sodium arsenate in female rat, *Egypt J. Basic Apl. Neurosci.*, 4, 160–167, doi: 10.1016/j.ejbas.2017. 07.002.
- Firdaus, F., Zafeer, M.F., Waseem, M., Ullah, R., Ahmad, M., and Afzal, M. (2018) Thymoquinone alleviates arsenic induced hippocampal toxicity and mitochondrial dysfunction by modulating mPTP in Wistar rats, *Biomed. Pharmacother.*, **102**, 1152–1160, doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.159.
   Firdaus, F., Zafeer, M.F., Anis, E., Ahmad, F.,
- Firdaus, F., Zafeer, M.F., Anis, E., Ahmad, F., Hossain, M.M., Ali, A., and Afzal, M. (2019) Evaluation of phyto-medicinal efficacy of thymoquinone against arsenic induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in SH-SY5Y cells, *Phytomedicine*, **54**, 224–230, doi: 10.1016/j.phymed.2018.09.197.
- Mehri, S., Shahi, M., Razavi, B.M., Hassani, F.V., and Hosseinzadeh, H. (2014) Neuroprotective effect of thymoquinone in acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rats, *Iran. J. Basic Med. Sci.*, 17, 1007–1011.
- Tabeshpour, J., Mehri, S., Abnous, K., and Hosseinzadeh, H. (2019) Neuroprotective effects of thymoquinone in acrylamide-induced peripheral nervous system toxicity through MAPKinase and apoptosis pathways in rat, *Neurochem. Res.*, 44, 1101–1112, doi: 10.1007/s11064-019-02741-4.
- Kanter, M. (2008) Nigella sativa and derived thymoquinone prevents hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats, *Neurochem. Res.*, 33, 579–588, doi: 10.1007/s11064-007-9481-z.
- Kanter, M. (2011) Protective effects of thymoquinone on the neuronal injury in frontal cortex after chronic toluene exposure, *J. Mol. Hist.*, 42, 39–46, doi: 10.1007/s10735-010-9305-3.
- Samarghandian, S., Farkhondeh, T., and Samini, F. (2018) A review on possible therapeutic effect of *Nigella sativa* and thymoquinone in neurodegenerative diseases, *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets*, **17**, 412–420, doi: 10.2174/ 1871527317666180702101455.
- Severina, I.I., Severin, F.F., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Ilyasova, T.M., Simonyan, R.A., Rogov, A.G., Trendeleva, T.A., Zvyagilskaya, R.A., Dugina, V.B., Domnina, L.V., Fetisova, E.K., Lyamzaev, K.G., Vyssokikh, M.Y., Chernyak, B.V., Skulachev, M.V., Skulachev, V.P., and Sadovnichii, V.A. (2013) In search of novel highly active mitochondria-targeted antioxidants: thymoquinone and its cationic derivatives, *FEBS Lett.*, 587, 2018–2024, doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.043.
- Dewan, M.C., Rattani, A., Gupta, S., Baticulon, R.E., Hung, Y.C., Punchak, M., Agrawal, A., Adeleye, A.O., Shrime, M.G., Rubiano, A.M., Rosenfeld, J.V., and Park, K.B. (2017) Estimating the global incidence of traumatic brain injury, *J. Neurosurg.*, 1, 1–18, doi: 10.3171/ 2017.10.JNS17352.
- Juurlink, B.H., and Paterson, P.G. (1998) Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies, *J. Spinal Cord Med.*, 21, 309–334.
- Pointer, C.B., and Klegeris, A. (2017) Cardiolipin in central nervous system physiology and pathology, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 37, 1161–1172, doi: 10.1007/s10571-016-0458-9.

- Niizuma, K., Yoshioka, H., Chen, H., Kim, G.S., Jung, J.E., Katsu, M., Okami, N., and Chan, P.H. (2010) Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia, *Biochim. Biophys. Acta*, 1802, 92–99, doi: 10.1016/j.bbadis.2009.09.002.
- Gupta, R., and Sen, N. (2016) Traumatic brain injury: a risk factor for neurodegenerative diseases, *Rev. Neurosci.*, 27, 93–100, doi: 10.1515/revneuro-2015-0017.
- 31. Shively, S., Scher, A.I., Perl, D.P., and Diaz-Arrastia, R. (2012) Dementia resulting from traumatic brain injury: what is the pathology? *Arch. Neurol.*, **69**, 1245–1251, doi: 10.1001/archneurol.2011.3747.
- Walker, K.R., Kang, E.L., Whalen, M.J., Shen, Y., and Tesco, G. (2012). Depletion of GGA1 and GGA3 mediates post injury elevation of BACE1, *J. Neurosci.*, 32, 10423–10437, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5491-11.2012.
- Gülşen, İ., Ak, H., Çölçimen, N., Alp, H.H., Akyol, M.E., Demir, İ., Atalay, T., Balahroğlu, R., and Rağbetli, M.Ç. (2016) Neuroprotective effects of thymoquinone on the hippocampus in a rat model of traumatic brain injury, *World Neurosurg.*, 86, 243–249, doi: 10.1016/j.wneu.2015.09.052.
- Üstün, N., Aras, M., Ozgur, T., Bayraktar, H.S., Sefil, F., Ozden, R., and Yagiz, A.E. (2014) Thymoquinone attenuates trauma induced spinal cord damage in an animal model, *Ulus. Travma Acil. Cerrahi Derg.*, 20, 328–332, doi: 10.5505/tjtes.2014.05021.
- Oskouei, Z., Akaberi, M., and Hosseinzadeh, H. (2018) A glance at black cumin (Nigella sativa) and its active constituent, thymoquinone, in ischemia: a review, *Iran. J. Basic. Med. Sci.*, **21**, 1200–1209, doi: 10.22038/ijbms. 2018.31703.7630.
- Donnan, G.A., Fisher, M., Macleod, M., and Davis, S.M. (2008) Stroke, *Lancet*, **371**, 1612–1623, doi: 10.1016/ S0140-6736(08)60694-7.
- Корчагин В.И., Миронов К.О., Дрибноходова О.П., Максимова М.Ю., Иллариошкин С.Н., Танашян М.М., Платонов, А.Е., Шипулин Г.А., Раскуражев А.А., Пирадов М.А. (2016) Роль генетических факторов в формировании индивидуальной предрасположенности к ишемическому инсульту, Анналы клин. эксп. невролоеии, 10, 65–75.
- Стельмашук Е.В. (2012) Механизмы повреждения и защита нейронов головного мозга при экспериментальном моделировании ишемии. Дис. докт. биол. наук, ГУ НИИ морфологии человека РАМН, Москва.
- Al-Majed, A.A., Al-Omar, F.A., and Nagi, M.N. (2006) Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus, *Eur. J. Pharmacol.*, 543, 40–47, doi: 10.1016/j.ejphar.2006.05.046.
- Hosseinzadeh, H., Parvardeh, S., Asl, M.N., Sadeghnia, H.R., and Ziaee, T. (2007) Effect of thymoquinone and *Nigella sativa* seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus, *Phytomedicine*, 14, 621–627, doi: 10.1016/j.phymed.2006. 12.005.
- 41. Xiao, X.Y., Zhu, Y.X., Bu, J.Y., Li, G.W., Zhou, J.H., and Zhou, S.P. (2016) Evaluation of neuroprotective effect of thymoquinone nanoformulation in the rodent cerebral ischemia-reperfusion model, *Biomed. Res. Int.*, **2016**, 2571060, doi: 10.1155/2016/2571060.
- 42. Ramachandran, S., and Thangarajan, S. (2018) Thymoquinone loaded solid lipid nanoparticles counteracts 3-nitropropionic acid induced motor impairments and neuroinflammation in rat model of Huntington's disease, *Metab. Brain Dis.*, **33**, 1459–1470, doi: 10.1007/s11011-018-0252-0.
- Jakaria, M., Cho, D.Y., Ezazul Haque, M., Karthivashan, G., Kim, I.S., Ganesan, P., and Choi, D.K. (2018) Neuropharmacological potential and delivery prospects of thymoquinone for neurological disorders, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2018, 1209801, doi: 10.1155/2018/1209801.

- 44. Gökce, E.C., Kahveci, R., Gökce, A., Cemil, B., Aksoy, N., Sargon, M.F., Kisa, Ü., Erdoğan, B., Güvenç, Y., Alagöz, F., and Kahveci, O. (2016) Neuroprotective effects of thymoquinone against spinal cord ischemia-reperfusion injury by attenuation of inflammation, oxidative stress, and apoptosis, *J. Neurosurg. Spine*, **24**, 949–959, doi: 10.3171/2015. 10.SPINE15612.
- 45. Иллариошкин С.Н., Власенко А.Г., Федотова Е.Ю. (2013) Современные возможности идентификации латентной стадии нейродегенеративного процесса, *Анналы клин. эксп. неврологии*, 7, 39–50.
- Анналы клин. эксп. неврологии, 7, 39–50.
  46. Bonin-Guillaume, S., Zekry, D., Giacobini, E., Gold, G., and Michel, J.P. (2005) The economical impact of dementia, *Presse Med.*, 34, 35–41.
- Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Генрихс Е.Е., Амелькина Г.А., Хаспеков Л.Г., Скребицкий В.Г., Иллариошкин С.Н. (2014) Роль ионов цинка и меди в механизмах патогенеза болезней Альцгеймера и Паркинсона, *Биохимия*, 79, 501–508, doi: 10.1134/S0006297914050022.
- Selkoe, D.J. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure, *Science*, 298, 789–791, doi: 10.1126/science.1074069.
   Kimura, M., Akasofu, S., Ogura, H., and Sawada, K.
- Kimura, M., Akasofu, S., Ogura, H., and Sawada, K. (2005) Protective effect of donepezil against Abeta(1-40) neurotoxicity in rat septal neurons, *Brain Res.*, 1047, 72–84, doi: 10.1016/j.brainres.2005.04.014.
- 50. Капай Н.А., Исаев Н.К., Стельмашук Е.В., Попова О.В., Зоров Д.Б., Скребицкий В.Г., Скулачев В.П. (2011) Митохондриально-адресованное производное пластохинона, антиоксидант SKQR1, введенный *in vivo*, предотвращает нарушение длительной потенциации, вызванное β-амилоидом в срезах гиппокампа, *Биохимия*, **76**, 1695–1699, doi: 10.1134/S0006297911120108.
- Skulachev, V.P., Isaev, N.K., Kapay, N.A., Popova, O.V., Stelmashook, E.V., Lyamzaev, K.G., Scharonova, I.N., Zorov, D.B., and Skrebitsky, V.G. (2014) Mitochondriatargeted antioxidants and Alzheimer's disease, in *Aging. Oxidative Stress and Dietary Antioxidants.* (V. R. Preedy, ed.) Academic Press, N.Y., pp. 195–201, doi: 10.1016/ B978-0-12-405933-7.00019-6.
- 52. Cascella, M., Bimonte, S., Barbieri, A., Del Vecchio, V., Muzio, M.R., Vitale, A., Benincasa, G., Ferriello, A.B., Azzariti, A., Arra, C., and Cuomo, A. (2018) Dissecting the potential roles of *Nigella sativa* and its constituent thymoquinone on the prevention and on the progression of Alzheimer's disease, *Front. Aging Neurosci.*, **10**,16, doi: 10.3389/fnagi.2018.00016.
- Khan, A., Vaibhav, K., Javed, H., Khan, M.M., Tabassum, R., Ahmed, M.E., Srivastava, P., Khuwaja, G., Islam, F., Siddiqui, M.S., and Shafi, M.M. (2012) Attenuation of Aβinduced neurotoxicity by thymoquinone via inhibition of mitochondrial dysfunction and oxidative stress, *Mol. Cell. Biochem.*, **369**, 55–65, doi: 10.1007/s11010-012-1557-7.
- Kennedy, K., Tucci, M.A., and Benghuzzi, H.A. (2014) Comparison of potential preventive therapeutic agents green tea, thymoquinone, and dilinoleoylphosphatidylcholine on human neuroblastoma cells, *Biomed. Sci. Instrum.*, 50, 132–139.
- Alhebshi, A.H., Gotoh, M., and Suzuki, I. (2013) Thymoquinone protects cultured rat primary neurons against amyloid β-induced neurotoxicity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 433, 362–367, doi: 10.1016/j.bbrc. 2012.11.139.
- Alhebshi, A.H., Odawara, A., Gotoh, M., and Suzuki, I. (2014) Thymoquinone protects cultured hippocampal and human induced pluripotent stem cells-derived neurons against α-synuclein-induced synapse damage, *Neurosci. Lett.*, 570, 126–131, doi: 10.1016/j.neulet.2013.09.049.
- Ismail, N., Ismail, M., Mazlan, M., Latiff, L.A., Imam, M.U., Iqbal, S., Azmi, N.H., Ghafar, S.A., and Chan, K.W. (2013) Thymoquinone prevents β-amyloid neurotoxicity in primary cultured cerebellar granule neurons, *Cell. Mol.*

*Neurobiol.*, **33**, 1159–1169, doi: 10.1007/s10571-013-9982-z.

- Ismail, N., Ismail, M., Shahid, I., and Latiff, L.A. (2013) Anti-aggregation effects of thymoquinone against Alzheimer's β-amyloid *in vitro*, *J. Med. Plants Res.*, 7, 2280–2288, doi: 10.5897/JMPR10.852.
- Alhibshi, A.H., Odawara, A., and Suzuki, I. (2019) Neuroprotective efficacy of thymoquinone against amyloid beta-induced neurotoxicity in human induced pluripotent stem cell-derived cholinergic neurons, *Biochem. Biophys. Rep.*, 17, 122–126, doi: 10. 1016/j.bbrep.2018.12.005.
- Dalli, T., Beker, M., Terzioglu-Usak, S., Akbas, F., and Elibol, B. (2018) Thymoquinone activates MAPK pathway in hippocampus of streptozotocin-treated rat model, *Biomed. Pharmacother.*, 99, 391–401, doi: 10.1016/j.biopha. 2018.01.047.
- Bargi, R., Asgharzadeh, F., Beheshti, F., Hosseini, M., Sadeghnia, H.R., and Khazaei, M. (2017) The effects of thymoquinone on hippocampal cytokine level, brain oxidative stress status and memory deficits induced by lipopolysaccharide in rats, *Cytokine*, 96, 173–184, doi: 10.1016/j.cyto.2017.04.015.
- Poorgholam, P., Yaghmaei, P., and Hajebrahimi, Z. (2018) Thymoquinone recovers learning function in a rat model of Alzheimer's disease, *Avicenna J. Phytomed.*, 8, 188–197, doi: 10.22038/ajp.2018.21828.1820.
- Mosley, R.L., Benner, E.J., Kadiu, I., Thomas, M., Boska, M.D., Hasan, K., Laurie, C., and Gendelman, H.E. (2006) Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease, *Clin. Neurosci. Res.*, 6, 261–281, doi: 10.1016/j.cnr.2006.09.006.
- b) 261-281, doi: 10.1016/j.cnr.2006.09.006.
  c) 261-281, doi: 10.1016/j.cnr.2006.09.006.
  c) 4. Venda, L.L., Cragg, S.J., Buchman, V.L., and Wade-Martins, R. (2010) α-Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease, *Trends Neurosci.*, 33, 559-568, doi: 10.1016/j.tins.2010.09.004.
- Davie, C.A. (2008) A review of Parkinson's disease, *British* Med. Bull., 86, 109–127, doi: 10.1093/bmb/ldn013.
- Хаспеков Л.Г. (2018) Клеточные модели заболеваний нервной системы, Анналы клин. эксп. неврологии, 12, 70–78, doi: 10.25692/ACEN.2018.5.9.
- 67. Radad, K.S., Al-Shraim, M.M., Moustafa, M.F., and Rausch, W.D. (2015) Neuroprotective role of thymoquinone against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced dopaminergic cell death in primary mesencephalic cell culture, *Neurosciences (Riyadh)*, **20**, 10–16.
- Zhang, Y., Fan, Y., Huang, S., Wang, G., Han, R., Lei, F., Luo, A., Jing, X., Zhao, L., Gu, S., and Zhao, X. (2018) Thymoquinone inhibits the metastasis of renal cell cancer cells by inducing autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway, *Cancer Sci.*, **109**, 3865–3873, doi: 10.1111/cas.13808.
   Racoma, I.O., Meisen, W.H., Wang, Q.E., Kaur, B., and
- 69. Racoma, I.O., Meisen, W.H., Wang, Q.E., Kaur, B., and Wani, A.A. (2013) Thymoquinone inhibits autophagy and induces cathepsin-mediated, caspase-independent cell death in glioblastoma cells, *PLoS One*, **8**, e72882, doi: 10.1371/journal.pone.0072882.
- Stelmashook, E.V., Chetverikov, N.S., Golyshev, S.A., Genrikhs, E.E., and Isaev, N.K. (2020) Thymoquinone induces mitochondrial impairment and death of cerebellar granule neurons, *Biochemistry (Moscow)*, 85, 239–247, doi: 10.31857/S0320972520020074.
- Radad, K., Moldzio, R., Taha, M., and Rausch, W.D. (2009) Thymoquinone protects dopaminergic neurons against MPP<sup>+</sup> and rotenone, *Phytother. Res.*, 23, 696–700, doi: 10.1002/ptr.2708.
- Ardah, M.T., Merghani, M.M., and Haque, M.E. (2019) Thymoquinone prevents neurodegeneration against MPTP *in vivo* and modulates α-synuclein aggregation *in vitro*, *Neurochem. Int.*, **128**, 115–126, doi: 10.1016/j.neuint. 2019.04.014.
- 73. Ebrahimi, S.S., Oryan, S., Izadpanah, E., and Hassanzadeh, K. (2017) Thymoquinone exerts neuropro-

206

tective effect in animal model of Parkinson's disease, *Toxicol. Lett.*, **276**, 108–114, doi: 10.1016/j.toxlet. 2017.05.018.

- Sedaghat, R., Roghani, M., and Khalili, M. (2014) Neuroprotective effect of thymoquinone, the nigella sativa bioactive compound, in 6-hydroxydopamine-induced hemi-parkinsonian rat model, *Iran. J. Pharm. Res.*, 13, 227–234.
- Коршунова Г.А., Шишкина А.В., Скулачев М.В. (2017) Дизайн, синтез и некоторые аспекты биологической активности митохондриально-направленных антиоксидантов, *Биохимия*, 82, 998–1017, doi: 10.1134/ S0006297917070021.
- Liberman, E.A., Topaly, V.P., Tsofina, L.M., Jasaitis, A.A., and Skulachev, V.P. (1969) Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria, *Nature*, 222, 1076–1078, doi: 10.1038/ 2221076a0.
- 77. Skulachev, V.P., Antonenko, Y.N., Cherepanov, D.A., Chernyak, B.V., Izyumov, D.S., Khailova, L.S., Klishin, S.S., Korshunova, G.A., Lyamzaev, K.G., Pletjushkina, O.Y., Roginsky, V.A., Rokitskaya, T.I., Severin, F.F., Severina, I.I., Simonyan, R.A., Skulachev, M.V., Sumbatyan, N.V., Sukhanova, E.I., Tashlitsky, V.N., Trendeleva, T.A., Vyssokikh, M.Y., and Zvyagilskaya, R.A. (2010) Prevention of cardiolipin oxidation and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs), *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 878–889, doi: 10.1016/j.bbabio.2010.03.015.
- Goleva, T.N., Rogov, A.G., Korshunova, G.A., Trendeleva, T.A., Mamaev, D.V., Aliverdieva, D.A., and Zvyagilskaya, R.A. (2019) SkQThy, a novel and promising mitochondria-targeted antioxidant, *Mitochondrion*, 49, 206–216, doi: 10.1016/j.mito.2019.09.001.
- Silachev, D.N., Isaev, N.K., Pevzner, I.B., Zorova, L.D., Stelmashook, E.V., Novikova, S.V., Plotnikov, E.Y.,

Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (2012) The mitochondria-targeted antioxidants and remote kidney preconditioning ameliorate brain damage through kidney-to-brain cross-talk, *PLoS One*, **7**, 12, e51553, doi: 10.1371/journal. pone.0051553.

- Genrikhs, E.E., Stelmashook, E.V., Popova, O.V., Kapay, N.A., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Skrebitsky, V.G., Skulachev, V.P., and Isaev, N.K. (2015) Mitochondria-targeted antioxidant SkQT1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat and prevents amyloid-β-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices, J. Drug Target., 23, 347–352, doi: 10.3109/1061186X.2014.997736.
- Silachev, D.N., Plotnikov, E.Y., Zorova, L.D., Pevzner, I.B., Sumbatyan, N.V., Korshunova, G.A., Gulyaev, M.V., Pirogov, Y.A., Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (2015) Neuroprotective effects of mitochondria-targeted plastoquinone and thymoquinone in a rat model of brain ischemia/reperfusion injury, *Molecules*, 20, 14487–14503, doi: 10.3390/molecules200814487.
- Isaev, N.K., Stelmashook, E.V., Genrikhs, E.E., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Kapkaeva, M.R., and Skulachev, V.P. (2016) Neuroprotective properties of mitochondria-targeted antioxidants of the SkQ-type, *Rev. Neurosci.*, 27, 849–855, doi: 10.1515/revneuro-2016-0036.
- 83. Stelmashook, E.V., Isaev, N.K., Genrikhs, E.E., and Novikova, S.V. (2019) Mitochondria-targeted antioxidants as potential therapy for the treatment of traumatic brain injury, *Antioxidants (Basel)*, **8**, 5,124, doi: 10.3390/ antiox8050124.
- Ma, T., Hoeffer, C.A., Wong, H., Massaad, C.A., Zhou, P., Iadecola, C., Murphy, M.P., Pautler, R.G., and Klann, E. (2011) Amyloid β-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity are rescued by decreasing mitochondrial superoxide, *J. Neurosci.*, **31**, 5589–5595, doi: 10.1523/ JNEUROSCI.6566-10.2011.

# THYMOQUINONE AS A POTENTIAL NEUROPROTECTIVE DRUG IN ACUTE AND CHRONIC FORMS OF CEREBRAL PATHOLOGY

### Review

N. K. Isaev<sup>1,2\*</sup>, N. S. Chetverikov<sup>2</sup>, E. V. Stelmashook<sup>1</sup>, E. E. Genriks<sup>1</sup>, L. G. Khaspekov<sup>1\*</sup>, and S. N. Illarioshkin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Center of Neurology, 125367 Moscow, Russia; E-mail: nisaev61@mail.ru, khaspekleon@mail.ru <sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia

> Received July 16, 2019 Revised November 12, 2019 Accepted November 28, 2019

Thymoquinone (TQ) is one of the main biologically active components of the essential oil derived from the black cumin plant (*Nigella sativa*) seeds. According to modern data, TQ has a wide range of pharmacological activity, including neuroprotective action, which was demonstrated in experimental modeling of brain ischemia/reperfusion, Alzheimer's and Parkinson's diseases, traumatic brain injury. Neuroprotective effect of TQ is mediated by the inhibition of lipid peroxidation, reduction of proinflammatory cytokines' level, maintenance of membrane potential of mitochondria, as well as prevention of apoptosis by inhibiting caspases 3, 8, and 9. Mitochondria-targeted antioxidants, derived on the basis of TQ, can accumulate in mitochondria and exhibit neuroprotective properties in nanomolar concentrations. Currently available data show that TQ effectively reduces negative effects of acute and chronic forms of cerebral pathology. Therefore, a more detailed study of the mechanisms of pharmacological action of thymoguinone and its chemical derivatives is necessary. Here, we have identified and formulated the prospects of using TQ itself and TQ-based compounds for therapy of a number of neurodegenerative diseases.

*Keywords*: thymoquinone, brain ischemia, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, traumatic brain injury, mitochondria-targeted antioxidants, neuroprotection УДК 576.52, 576.54

# ЛИПИДНЫЕ РАФТЫ В БИОГЕНЕЗЕ ЭКЗОСОМ

## Обзор

### © 2020 Г.О. Скрябин, А.В. Комельков\*, Е.Е. Савельева, Е.М. Чевкина

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478 Москва, Россия; электронная почта: komelkov@gmail.com

> Поступила в редакцию 01.10.2019 После доработки 28.11.2019 Принята к публикации 28.11.2019

Экзосомы, секретируемые экстраклеточные везикулы, формирующиеся в системе внутриклеточного везикулярного транспорта, играют важнейшую роль в дистанционной межклеточной коммуникации. Экзосомы переносят активные формы биомолекул различных классов, причем молекулярный состав их содержимого является результатом направленного отбора и зависит от типа клеток-продуцентов. Механизмы, лежащие в основе формирования экзосом и селекции переносимых биомолекул (экзосомального карго), до сих пор остаются не до конца понятными. Предполагается, что существует несколько путей биогенеза экзосом, хотя вопросы о независимости этих путей и их одновременном сосуществовании в клетке остаются открытыми. Наименее изученным является недавно обнаруженный механизм формирования экзосом, связанный с липидными рафтами или мембранными липидными микродоменами. В данном обзоре приведены современные представления и основные гипотезы о механизмах биогенеза и секреции экзосом и обобщены имеющиеся в настоящее время данные об участии липидных рафтов и составляющих их молекул в этом процессе. Отдельное внимание уделено анализу возможной роли в формировании экзосом рафт-образующих белков семейства SPFH, компонентов плоских рафтов, а также кавеолина, основного компонента кавеол.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** экзосомы, липидные рафты, SPFH-белки, кавеолин. **DOI:** 10.31857/S0320972520020050

Экзосомы относятся к гетерогенной группе экстраклеточных везикул (ЭКВ). Несмотря на то, что открытием экзосом считают работу Johnstone et al. 1987 г. [1], термин «экзосомы» впервые был введен в 1981 г. для обозначения отпочковывающихся мембранных структур с 5'нуклеазной активностью [2]. Эти структуры, включая крупные везикулы размером до 1000 нм, впоследствии получившие название микровезикулы (также известные как микрочастицы, эктосомы или отщепляющиеся везикулы), и мелкие до 150 нм (соответствующие экзосомам) были обнаружены в экспериментах in vitro на клетках глиомы и нейробластомы. В более поздних работах на культивируемых ретикулоцитах был открыт механизм секреции экзосом при слиянии поздних мультивезикулярных эндосом с плазматической мембраной (ПМ) [3]. И наконец, в 1987 г. было показано высвобождение рецептора трансферрина в составе везикул дифференцирующихся ретикулоцитов [1], и термин «Экзосомы» стал использоваться в противоположность эндосомам, – везикулам, формирующимся в процессе различных форм эндоцитоза.

Основным отличием экзосом от других типов ЭКВ (микровезикулы, апоптотические тельца, псевдоретровирусные частицы и др.) является их биогенез — они не являются результатом прямого отпочкования везикул от ПМ родительских клеток, но формируются в системе внутриклеточного везикулярного транспорта и высвобождаются во внеклеточную среду при слиянии мультивезикулярных эндосом (МВЭ) с ПМ.

Экзосомы представляют собой сферические тельца, окруженные билипидной мембраной, что делает эти структуры крайне стабильными и позволяет сохранить активность переносимых в их составе биоактивных молекул, таких как белки, липиды, нуклеиновые кислоты, в том числе, различные виды РНК, а также генетический материал вирусов [4]. На своей поверхности они несут рецепторы, молекулы адгезии, интегрины, тетраспанины и другие трансмембранные и поверхностные белки (рис. 1), которые помогают им адсорбироваться на клетках-реципиентах и/или взаимодействовать с ними. Некоторые тетраспанины, такие как CD9, CD63, CD81, принято считать маркерами экзосом, хотя вопрос их строгой специфичности для данного типа ЭКВ остается открытым.

<sup>\*</sup> Адресат для корреспонденции.



**Рис. 1.** Схема структурной организации экзосом. К биомолекулам, передаваемым в составе карго, относят белки (мутантные и активированные формы сигнальных белков), липиды, мРНК, тРНК и их фрагменты, рРНК, длинные некодирующие РНК, микроРНК и другие малые некодирующие РНК (piRNA, snRNA, snoRNA, scaRNA, Y RNA, siRNA и др.).

С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/ journal/biokhsm/

Результатом прикрепления экзосом к поверхности клетки является передача молекул их содержимого во внутриклеточное пространство клетки-мишени (при слиянии мембран либо с помощью эндоцитоза) или передача сигналов по принципу лиганд-рецепторного взаимодействия с последующим изменением внутриклеточных сигналов. Экзосомы найдены почти во всех жидкостях человека, в том числе в плазме и сыворотке крови, слюне, моче, сперме, грудном молоке, спинномозговой, амниотической и слезной жидкостях.

Биогенез экзосом и отбор экзосомального содержимого. Биогенез экзосом происходит в системе внутриклеточного везикулярного транспорта. Формируемые в процессе эндоцитоза инвагинации на ПМ образуют первичные везикулы, которые при слиянии друг с другом образуют т.н. ранние эндосомы. Ранние эндосомы являются нестабильными и морфологически неоднородными структурами: в процессе т.н. созревания и движения от периферии клетки к ядру в их составе формируются вытянутые тубулярные участки и участки с внутренними инвагинациями мембраны. В ранних эндосомах происходит диссоциация комплексов рецептор-лиганд, захваченных в процессе эндоцитоза, и первичная сортировка их содержимого, или

БИОХИМИЯ том 85 вып. 2 2020

карго. Часть молекул в составе тубулярных отростков возвращается к поверхности клетки (т.н. быстрая или прямая рециклизация). Для более «детальной» сортировки и возвращения молекул на отдельные участки ПМ существует и более продолжительная рециклизация, опосредуемая эндосомальным рециклизационным компартментом. Параллельно с рециклизацией в процессе созревания эндосом происходят многочисленные инвагинации их мембраны и отпочковывание внутрь интралюминальных везикул (ИЛВ) – предшественников экзосом [5]. Таким образом, внутреннее содержимое экзосом имеет цитоплазматическое происхождение. По мере продвижения от ПМ к центру клетки ранние эндосомы превращаются в поздние мультивезикулярные эндосомы или мультивезикулярные тельца. При этом происходят изменения липидного и белкового состава, снижение рН и накопление ИЛВ [6]. Зрелые МВЭ могут сливаться либо с лизосомами, что приводит к деградации карго, либо с ПМ, что приводит к высвобождению экзосом во внеклеточное пространство. До сих пор нет единого мнения о том, чем определяется судьба МВЭ. Есть гипотеза, согласно которой в клетках присутствуют одновременно разные субпопуляции МВЭ, различающиеся по липидному и белковому составу [7].

Процесс образования экзосом неразрывно связан с процессом отбора их содержимого. Различают два основных типа такого отбора (сортировки биомолекул) и, соответственно, два механизма формирования ИЛВ в зависимости от наличия или отсутствия специальных ESCRTкомплексов, включающих в себя более 20 белков, относящихся к четырем классам ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) — ESCRT -0, -I, -II и -III. ESCRT-зависимый тип формирования ИЛВ изучен достаточно подробно. Так, было установлено, что гетеродимер ESCRT-0 узнает убиквитинированные белки и привлекает их к ПМ, формируя тем самым сортировочные микродомены (sorting microdomains) и отвечая за отбор содержимого будущей экзосомы. Помимо этого он рекрутирует комплексы ESCRT-I и -II, которые также могут связывать карго (например, ESCRT-II привлекает различные РНК), но преимущественно они индуцируют инвагинацию участка мембраны с выбранным «грузом». Кроме того, они привлекают белок Alix, который, в свою очередь, рекрутирует комплекс ESCRT-III, в состав которого входят белки, отвечающие за финальные этапы формирования ИЛВ – отделение сформировавшегося пузырька и диссоциацию комплекса от мембраны [5].



Рис. 2. Гипотетическая схема рафт-зависимого пути формирования ИЛВ (адаптировано из Villarroya-Beltri et al.) [9]. Сокращения: DAG – диацилглицерол, DGK – диацилглицерол киназа, LBPA – лизобисфосфатидная кислота, PA – фосфатидная кислота, PC – фосфатидилхолин, PLD – фосфолипаза D, PG – фосфатидилглицерол, S1P-сфингозин-1-фосфат, SMase2 – нейтральная сфингомиелаза 2, SMS2 – сфингомиелин синтаза 2. Подробнее см. в тексте. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

Позднее был показан механизм, который может быть не связан с убиквитинированием и считается ESCRT-независимым, хотя и требует участия белка Alix и, предположительно, комплекса ESCRT-III. Этот путь связан с трансмембранными белками синдеканами и синтенином. Данные белки участвуют в связывании большого количества лигандов, включая различные хемокины, факторы роста, а также молекулы адгезии, интегрины и др. Карго-зависимая олигомеризация синдекана и его связывание с молекулами синтенина приводят, в частности, к рекрутированию тетраспанина CD63 и белка Alix и, в конечном счете, к формированию ИЛВ [8–10].

Наконец, целый ряд данных, накопившихся за последнее время, указывает на существование третьего механизма биогенеза ИЛВ, отличного от ESCRT- и синдекан/синтенин-зависимых путей и связанного с липидными микродоменами на мембранах [5, 10, 11]. Этот тип сортировки карго и формирования ИЛВ изучен менее подробно и связан с изменением липидного состава эндосомальной мембраны, при котором липиды кластеризуются в специфические субдомены (рафты), обусловливающие инвагинацию мембраны и формирование везикул (рис. 2). Эти высокодинамичные и очень гетерогенные структуры (подробнее далее) могут, с одной стороны, служить сборочными платформами для белковых комплексов и рекрутинга белков, с другой — вызывать инвагинацию и отпочковывание мембран с помощью процесса, инициируемого церамидом [12, 13]. Механизм отбора экзосомального содержимого в этом случае остается малоизученным; предполагается, что в нем могут играть роли тетраспанины [14] и флотиллины [15]. Описываемый путь секреции экзосом не зависит от подавления продукции компонентов ESCRT-белков Hrs, Alix или Tsg101 [12], что подтверждает независимость данного процесса от ESCRT-ассоциированного пути формирования ИЛВ.

Как уже было сказано, МВЭ могут сливаться либо с лизосомами, либо с ПМ. Существует гипотеза, согласно которой содержимое ИЛВ при первом варианте отбирается по ESCRT-зависимому пути и ведет к деградации содержимого МВЭ, в то время как второй путь (выход клеточного содержимого в виде экзосом в межклеточное пространство) представляется рафт- и церамид-зависимым [5]. В то же время есть данные, свидетельствующие о том, что, как минимум, некоторые компоненты ESCRT комплексов, такие как Alix и Tsg101, участвуют в продукции и тех ИЛВ, которые впоследствии секретируются в качестве экзосом [10].

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПИДНЫХ РАФТОВ

Понятие липидных микродоменов, или липидных рафтов (ЛР), относят прежде всего к характеристике ПМ, однако сходные структуры обнаруживаются и на мембранах различных внутриклеточных компартментов. Далее мы приведем краткие сведения о структуре и функциональном значении этих доменов.

Строение ПМ до начала 1980-х гг. было описано гипотезой Сингера и Николсона, представляющей ее как «море» липидов, в котором плавают «айсберги» мембранных белков [16]. Однако с накоплением данных о гетерогенности ПМ, в частности, о полярном расположении гликосфинголипидов в мембранах эпителиальных клеток, а также с обнаружением детергентустойчивых участков мембран, обогащенных стеролами и сфинголипидами (которые способны к агрегации за счет образования водородных связей), была выдвинута гипотеза липидных рафтов, или мембранных микродоменов. Согласно этой гипотезе, ПМ представляется не в виде пассивного бислоя липидов, но морфологически гетерогенной структуры, в которой можно разделить текучее «море» фосфолипидов и более плотные «плоты» (рафты), обогащенные сфинголипидами и холестеролом. На заре этой гипотезы взаимодействию между этими липидами отдавали главную роль в формировании ЛР, что необходимо, однако недостаточно. В настоя-

щее время под ЛР понимают динамичные наноучастки мембран (насыщенные стеролами, сфинголипидами, а также определенными белками), которые могут достигать метастабильного состояния за счет липид-липидных, липидбелковых или белок-белковых взаимодействий [17, 18]. Боковые цепи жирных кислот фосфолипидов имеют тенденцию быть длиннее и более насыщенными в ЛР, чем в окружающей мембране, что позволяет им плотнее упаковываться. Присутствие холестерола обусловливает меньшую текучесть образовавшегося домена, что объясняет устойчивость ЛР к действию неионных детергентов [17]. В дополнение к мембранным компонентам активную роль в поддержании и ремоделировании ЛР играет актин. Также на мембранную организацию может дополнительно влиять асимметричное расположение липидов в наружном и внутреннем слое ПМ (рис. 3).

Оценка размеров ЛР крайне затруднена вследствие их высокой динамичности и нестабильности. Также до сих пор остается мало понятным и время существования этих структур, а также площадь поверхности мембран, охватываемая липидными плотами в целом в единый момент времени. Все эти параметры — относительная площадь, размер и время жизни мембранных доменов — могут варьировать в широких пределах: от небольших изолированных короткоживущих доменов до непрерывных рафтов возрастающего размера в зависимости от мно-



**Рис. 3.** Строение липидных рафтов (адаптировано из Levental et al.) [45]. Пояснения в тексте. С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

жества факторов, включая тип клетки и фазу клеточного цикла, а также от активации клеточных процессов, таких как эндоцитоз и экзоцитоз, метаболизм липидов и связывание кластеризующих агентов (антител, токсинов и различных лигандов) с их рецепторами [17]. Например, по разным данным, структуры, устойчивые к действию 1%-го Triton X-100, могут составлять порядка половины всей клеточной поверхности. Однако работы на основе высокоразрешающей электронной микроскопии «отводят под рафты» менее 35% [19] либо даже 13% ПМ [20]. Последние данные указывают на большую степень присутствия упорядоченных рафт-подобных участков мембран с вкраплениями менее упорядоченных (не-рафтовых) доменов. В настоящее время принята гипотеза динамической гетерогенности фазовых участков мембран. Сочетание относительно насыщенных липидов, ненасыщенных липидов и холестерола в модельной мембране приводит к разделению жидкостной фазы и установлению двух различных фаз (которые по-прежнему являются жидкими по своей природе) [21]. Одна из этих фаз является более вязкой, чем другая вследствие более плотной упаковки и более высокого молекулярного порядка составляющих ее липидов. Эта более упорядоченная фаза, как полагают, представляет собой потенциальную физическую модель для липидных рафтов в клеточных мембранах. На начальном этапе образования рафтов существуют наноразмерные агрегаты (nanoscale assemblies) стеролов, сфинголипидов и рафт-образующих белков, поддерживаемые актиновыми филаментами [22]. В ответ на внешний сигнал или события мембранного трафика за счет липидлипидных, липид-белковых или белок-белковых взаимодействий образуются нанометровые рафтовые платформы, которые уже способны участвовать в сигналинге. Дальнейшая кластеризация ведет к появлению микрометровых рафтовых «фаз», плотных структур, способных к равновесному существованию, окруженных более текучей мембраной.

Сходные структуры присутствуют не только на ПМ, но и на мембранах клеточных органелл. При этом градиент концентрации холестерола играет важную роль: в ЭПР новосинтезированные белки с разными по длине *транс*мембранными доменами инкорпорированы в участки, обедненные холестеролом (а значит более текучие), где они остаются смешанными до входа в *цис*-Гольджи. В аппарате Гольджи (АГ) концентрация холестерола возрастает по мере продвижения к его *транс*-домену, обеспечивая тем самым сегрегацию белков с короткими и длинными трансмембранными доменами [23].

Несмотря на крайне гетерогенную природу рафтов, различают два основных морфологических типа ЛР: «планарные», или плоские ЛР, и «инвагинированные» рафты, которые еще называют кавеолярными, или кавеолами, в формировании которых принимают участие белки кавеолины. Некоторыми учеными выделяется рафт-подобный подтип – тетраспанин-обогащенные микродомены (TEMs). Плоские ЛР морфологически неотличимы от ПМ – они лежат в плоскости мембраны, не образуя инвагинаций, а время их жизни варьирует от миллисекунд до секунд, определение их точного размера до сих пор проблематично. Принято считать плоские ЛР структурами, в среднем, от 10 до 200 нм [24]. Анализ рафтовых структур в живых клетках, проведенный с применением комбинации методов флуоресцентной корреляционной спектроскопии (FCS) и микроскопии на основе подавления спонтанного испускания (STEDмикроскопии), выявил существование холестерол-насыщенных доменов размером ~20 нм, концентрирующих белковые молекулы с периодом существования 10-20 мс [25].

Инвагинированные ЛР (или кавеолы) представляют собой морфологически различимую структуру, поэтому размер кавеолярных рафтов может быть определен с помощью электронной микроскопии. В среднем, они имеют диаметр 50–100 нм, однако способны агрегировать в структуру, напоминающую гроздь винограда, достигающую больших размеров [26].

Роль липидных рафтов в биогенезе экзосом. Как уже говорилось, одним из основных свойств ЛР является их обогащенность стеролами и сфинголипидами, причем липиды в этих наноучастках обогащены насыщенными и более длинными углеводородными цепями и гидроксилированными церамидными цепями. Церамид является одним из ключевых липидов, обнаруживаемых в составе ИЛВ и на мембранах МВЭ. Он образуется из сфингомиелина под действием фермента нейтральной сфингомиелазы 2-го типа. Показано, что внутренний слой экзосомальной мембраны обогащен церамидом [27]. Церамиды способны вызывать спонтанное искривление мембраны внутрь и объединять определенные домены, способствуя образованию и поддержанию формы будущих ИЛВ. Помимо церамида, мембраны экзосом также обогащены холестеролом. Более того, накопление в составе мембран холестерола увеличивает секрецию флотиллин-позитивных экзосом [28], а подавление сфингомиелазы приводит к снижению продукции экзосом [29]. Этот эффект показан и в других работах: так, инкубация клеток с ингибитором нейтральной сфингомиелазы GW4869

приводила к уменьшению количества экзосом [30, 31].

Интересно, что подавление образования экзосом сопровождалось увеличением продукции микровезикул, что может свидетельствовать о необходимости клетки компенсировать недостаток экзосом с помощью иных механизмов секреции везикул [32]. Однако снижение активности сфингомиелазы не всегда сопряжено с подавлением экзосом. Например, подавление этого фермента в линии РС-3 не влияло на уровень экзосом [33]. Возможно, это связано с преобладанием ESCRT- или синдекан/синтенин-зависимых механизмов по отношению к рафт-зависимым процессам формирования экзосом в разных типах клеток либо даже в одних и тех же клетках при разных условиях. Важно отметить, что одни и те же клетки могут производить разные субпопуляции везикул, которые отличаются по морфологии [34], молекулярному составу [35] и даже «адресной» доставке, то есть аффинности экзосом к определенным клеткам-реципиентам [36]. Многочисленные эксперименты доказывают гетерогенность состава экзосом, полученных из одних клеточных линий. Например, экзосомы, продуцируемые базальной и апикальной мембранами поляризованных эпителиальных клеток, различаются по составу [37, 38]. Подобная гетерогенность состава предполагает существование специализированных механизмов селективного отбора содержимого в экзосомы. Интересно, что и передача экзосом клеткам-реципиентам также может зависеть от церамида [39].

Еще один метаболит сфингомиелина, сфингозин-1-фосфат, также играет важную роль в формировании МВЭ, а подавление производящего его фермента сфингозин-киназы 2 или его рецепторов приводит к снижению продукции CD63-, CD81-, флотиллин-позитивных ИЛВ и экзосом [40]. Авторы предполагают, что большое значение церамида в продукции экзосом может быть отчасти обусловлено его последующим метаболизмом и превращением в сфингозин-1-фосфат.

Другим липидом, задействованным в рассматриваемом процессе, является диацилглицерол (ДАГ), который обеспечивает формирование секреторных везикул. ДАГ наряду с инозитол-1,4,5-трифосфатом и другими фосфоинозитидами образуют сайты связывания с мембраной для привлечения растворимых белков, в том числе сигнальных молекул, обеспечивают стабилизацию белковых комплексов на мембране и их активацию. Эти липиды необходимы и для взаимодействия белков цитоскелета с мембраной, в том числе при реорганизации мембраны, связанной с различного рода процессами отпочковывания

и слияния мембран при формировании секреторных везикул [41]. Имеются данные о том, что подавление ДАГ-киназы, которая уменьшает концентрацию ДАГ, превращая его в фосфатидную кислоту, усиливает секрецию CD63-позитивных экзосом [42]. Также на секрецию экзосом влияет активность фосфолипазы D (PLD), присутствие которой показано в эндосомальных компартментах и экзосомах [43]. Помимо гидролиза фосфатидилхолина, PLD2 вовлечена в биосинтез лизобисфосфатидной кислоты (LBPA), образуя ее предшественника – фосфатидилглицерол. Мультивезикулярные тельца и ИЛВ обогащены LBPA, которая обусловливает внутреннюю инвагинацию и образование ИЛВ. Интересным представляется тот факт, что LBPA взаимодействует как с Alix, так и с белком теплового шока Hsp70, который часто обнаруживается в составе экзосом и иногда используется в качестве экзосомального маркера [9].

Рафт-образующие белки в биогенезе экзосом. Если о белках, ответственных за формирование ИЛВ и отбор экзосомального карго в случае ESCRТ-зависимого пути биогенеза экзосом, имеется достаточно много информации, то о белках, выполняющих аналогичные функции при рафт-зависимом пути биогенеза экзосом, почти ничего не известно. К белкам, проявляющим высокую аффинность к ЛР (рафтофильным белкам), относятся гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-заякоренные белки (GPI-AP), дважды ацилированные белки (например, киназы семейства Src или а-субъединицы G-белков), пальмитоилированные белки, обладающие сродством к холестеролу, и трансмембранные белки, особенно если они пальмитоилированы [44]. Хотя GPI-заякоренные белки были открыты одними из первых в составе детергентустойчивых участков мембран, их отношения с ЛР остаются неясными, однако можно утверждать, что их взаимодействия с липидами регулируют структуру и функции мембран. К другим часто встречающимся компонентам ЛР относятся малые G-белки, рецепторы факторов роста EGFR, PDGFR, MAP- и Src-киназы, клатрины, галектины и др. В общем случае, белки, которые взаимодействуют с мембраной с помощью липидных якорей, «следуют правилам», установленным липидами: якоря, состоящие из насыщенных жирных кислот и стеролов (таких как GPI или пальмитоилированные фрагменты) обычно предпочитают упорядоченные участки мембран (т.е. рафты), тогда как якоря разветвленных или ненасыщенных жирных кислот (пренильные группы) предпочитают неупорядоченные (не-рафтовые) регионы [45] (рис. 3). При этом важно уточнить, что посттрансляционные модификации, в частности, пальмитоилирование, не являются достаточным условием включения белка в состав ЛР. Существует множество пальмитоилированных белков, не входящих в состав ЛР, включая маркер не-рафтовых мембран, рецептор трансферрина [23]. Более того, есть гипотеза, согласно которой не ЛР привлекают пальмитоилированные белки, а мобилизация пальмитоилированных белков приводит к рекрутингу насыщенных липидов, что влечет за собой образование ЛР [46].

Белки в составе ЛР принимают участие в различных клеточных процессах, включая регуляцию и передачу клеточных сигналов, выпячивание мембран, эндоцитоз, клеточную адгезию и др. [47]. Высокая гетерогенность липидного и белкового состава ЛР приводит к существованию множества классов ЛР, выполняющих различные функции в составе ПМ. Для некоторых белков ЛР показано участие в биогенезе экзосом, другие обнаруживаются в составе экзосомального карго в качестве сигнальных молекул.

Собственно рафт-образующими предположительно можно считать белки, организующие и поддерживающие структуру рафтов, включая белки, заякоренные на внешнем слое мембраны (GPI-AP), белки, прикрепленные к внутреннему слою, к которым относятся представители SPFH-семейства и трансмембранные белки. Среди последних отдельно следует обозначить роль тетраспанинов, некоторые из которых являются наиболее принятыми маркерами экзосом. Эти белки в силу их физических свойств способны объединяться в рафт-подобные тетраспанин-обогащенные субдомены TEMs, о которых говорилось выше. Предполагается, что они могут принимать участие в сортировке карго и взаимодействии с клетками-реципиентами, интегринами и другими трансмембранными и цитозольными белками [48]. При этом возможно, что тетраспанины, многие из которых являются компонентами липидных рафтов, участвуют в привлечении определенного карго в экзосомы по ESCRT-независимому типу. Такой эффект показан для CD63 [14], CD81 [49], а также для CD9, задействованного, например, в убиквитин-независимой селекции МНСІІ в МВЭ [50] или в загрузке экзосом металлопротеиназой CD10 [51]. Однако эти белки участвуют, по-видимому, и в других механизмах биогенеза экзосом, в частности, в отборе карго по синтенин/синдекан-зависимому пути [9].

К микродомен-образующим, или рафт-образующим белкам (РОБ), относят представителей семейства SPFH (преимущественно плоские рафты) и кавеолин (кавеолы, а также не-рафтовые структуры). Эти белки активно участвуют в ключевых процессах реорганизации мембран, происходящих с участием ЛР, в том числе в различных типах клатрин-независимого эндоцитоза (т.н. рафт-зависимый). Этот тип эндоцитоза, в свою очередь, разделяют в зависимости от участия малых G-белков на Arf6- и Rho-зависимые типы, а также в зависимости от участия РОБ — на кавеолин-зависимый [52] и флотиллин-зависимый [53, 54]. Хотя процессы эндоцитоза на ПМ и образования ИЛВ на мембранах эндосом, по-видимому, имеют большое сходство, значение РОБ в биогенезе экзосом до сих пор исследовано очень мало. Далее будут суммированы данные, имеющиеся в настоящее время по данному вопросу.

### БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА SPFH И ИХ ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ В ФОРМИРОВАНИИ ЭКЗОСОМ

К РОБ плоских липидных рафтов относятся белки семейства SPFH (Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflK/C), хотя они также могут встречаться и в составе кавеол. Белковое семейство SPFH представлено у млекопитающих белками стоматином и стоматин-подобными белками, прохибитинами, флотиллинами, подоцином и эрлинами, гены всех представителей этого семейства являются крайне консервативными. Структурно представителей этого семейства объединяет содержащийся в их составе консервативный SPFH(PHB)-домен (или прохибитиновый домен) размером 160 а.к., участвующий в олигомеризации и связывании с холестеролом, как это было показано на примере подоцина [55]. Они проявляют схожие структурно-функциональные особенности, например, образование гомо- и гетеро-олигомеров, сходные типы ко- и пост-трансляционных модификаций (в частности, ацилирование) и участие в привлечении белков. Все представители семейства в зависимости от состава *N*-терминальных аминокислотных последовательностей и их модификаций компартментализуются на внутренних мембранах клетки, включая митохондрии, ПМ и мембраны АГ.

Наиболее изученными представителями этого семейства являются прохибитины, располагающиеся на мембране митохондрий и выполняющие функцию шаперонов для митохондриальных белков [56], в частности, для защиты митохондриальных мембранных белков от m-AAA протеаз [57]. Позднее были открыты белки эрлины-1 и -2 (КЕ04р и C8orf2). Эти два высокогомологичных белка (83% а.к. гомологии) были обнаружены в составе ЛР эндоплазматического ретикулума и названы как белки липидных рафтов ЭПР (endoplasmatic reticulun lipid rafts proteins, erlins). Как и прохибитины, эти белки не встречаются в составе других мембран, в том числе отсутствуют на ПМ. На основании их близкого сходства с прохибитинами, предполагается, что они выполняют схожую функцию защиты мембранных белков ЭПР от протеаз [58]. В связи с тем, что данные белки не обнаруживаются в составе ЛР на ПМ или эндосомальных структурах, в настоящее время о присутствии их в экзосомах практически ничего не известно. Однако эти белки обнаружены в составе митохондриальных ЭКВ, выделенных из тканей меланомы, а также из плазмы крови пациентов с меланомой [59]. Эти данные подтверждают роль ЛР и РОБ в формировании «неканонических» ЭКВ, происходящих из мембран клеточных компартментов, не связанных с «классическими» источниками ЭКВ – эндосомальными мембранами (экзосомы) и ПМ (микровезикулы).

Флотиллины. Флотиллины у млекопитающих представлены двумя белками (flotillin/reggie-1 и -2). Они структурно отличаются от других представителей SPFH-семейства присутствием длинного *C*-концевого альфа-спирального консервативного участка, названного «флотиллиновым доменом» (рис. 4). Именно с помощью этого домена (а не SPFH-домена) происходит образование гомо- и гетеротетрамеров между флотиллинами, что является необходимым условием для нормального функционирования этих белков [60].

Закрепление (заякоривание) флотиллинов на мембране происходит с помощью миристоилированных и пальмитоилированных сайтов, в отличие от стоматина, у которого присутствует трансмембранный домен. Кроме того, в их РНВ-домене присутствуют гидрофобные участки, формирующие шпильки, также участвующие в процессе заякоривания. Флотиллин-содержащие ЛР обнаруживаются не только на ПМ, но и на мембранах эндосом и *транс*-Гольджи сети [61]. Флотиллиновые микродомены играют важную роль в проведении сигналов и регуляции клеточного ответа, главным образом благодаря кластеризации рецепторов, что было продемонстрировано для множества процессов, включая работу инсулинового рецептора, активацию Т-клеток, дегрануляцию тучных клеток и проведение GPCR (G-protein-coupled receptor)зависимых сигналов [62]. Кроме сигнальной функции флотиллины напрямую влияют на формирование клеточных контактов, в частности, кадгериновых комплексов, а также они опосредованно регулируют процессы, связанные с реорганизацией цитоскелета и приобретением клеткой локомоторного фенотипа [63]. Все больше результатов исследований указывают на то, что ЛР, содержащие флотиллины, могут использоваться в качестве платформ для эндоцитоза [62]. Первые свидетельства о том, что флотиллин-1 участвует в эндоцитозе, независимом от клатрина, кавеолина и динамина, были представлены в работе 2006 г. [64]. Годом позже была показана колокализация флотиллинов и GPI-белков, а также обнаружено, что флотиллиновые микродомены совпадают пространственно с местами образования инвагинаций, отличных от кавеол [65]. В то же время недавние открытия поставили под сомнение прямую роль флотиллинов в эндоцитозе некоторых молекул, поскольку было показано, что флотиллины специфически кластеризуют молекулы карго, такие



**Рис. 4.** Доменная организация флотиллинов. Цветами выделены функционально различные домены. С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

как предшественник бета-амилоида, транспортер допамина и рецептор эпидермального фактора роста, на ПМ для клатрин-опосредованного эндоцитоза [53]. Поэтому некоторыми учеными выдвигается новый пересмотренный механизм флотиллин-опосредуемого (а не зависимого) эндоцитоза, что, однако, не исключает существования подобного механизма при формировании ИЛВ.

В контексте исследования ЭКВ известно, что флотиллиновые домены вовлечены в процессы формирования экзосом и отбора их содержимого. Так было продемонстрировано, что подавление флотиллина-2 снижает содержание холестерола в мембране экзосом. Обратное тоже оказалось верным: обработка олигодендроцитов холестеролом приводила к увеличению выхода экзосом, при этом обогащенных флотиллином-2 [28]. В другом исследовании на клетках рака простаты РС-3 подавление флотиллинов хотя и не влияло на общее количество секретируемых экзосом, приводило к качественному изменению их белкового состава, в частности, к снижению уровней кавеолина-1 и аннексина-2 [15]. Таким образом, флотиллины могут участвовать в сортировке специфических белков в ИЛВ, однако детальное понимание механизма этого процесса до сих пор отсутствует.

Присутствие флотиллинов в экзосомах показано многократно, в основном это касается флотиллина-1, который в ряде случаев наряду с тетраспанинами CD9, CD63 и CD81 используется в качестве маркера экзосом [53, 66]. Однако следует учесть, что флотиллин-1 позитивные экзосомы могут представлять собой отдельную популяцию. Так, ряд данных свидетельствует о том, что флотиллин-1 может способствовать ESCRT-независимому пути созревания экзосом [40]. Также флотиллин-позитивные экзосомы могут, по-видимому, формироваться независимо и от синтенин-синдеканового механизма, поскольку «сайленсинг» как синтенина, так и синдекана приводил к резкому снижению количества экзосом, содержащих белки Alix, hsp70 и CD63, однако, никак не влиял на флотиллин-позитивные экзосомы [8]. Эти результаты в сочетании с приведенными выше данными о связи флотиллин-позитивных экзосом с холестеролом делают флотиллин-1 одним из ключевых участников рафт-зависимого пути формирования экзосом.

Наши собственные результаты свидетельствуют о том, что уровни флотиллинов-1 и -2 коррелируют друг с другом в экзосомах различного происхождения [67], что указывает на то, что флотиллин-1 и -2 позитивные везикулы представляют собой единую популяцию, причем эта популяция как минимум не полностью перекрывается с CD9- и стоматин-позитивными везикулами. Полученные данные хорошо согласуются с имеющимися сведениями о том, что флотиллины-1 и -2 распределены на мембране в соотношении 1 : 1 [65], и что их гетероолигомеризация необходима для формирования флотиллин-позитивных микродоменов на ПМ [68] и эндоцитоза [69]. Это может означать, что принцип работы флотиллинов на мембранах МВЭ аналогичен таковому в составе липидных рафтов на ПМ, что свидетельствует о сходстве процессов сборки белковых платформ на мембранах ПМ и МВЭ.

Стоматин. Холестерол-связывающий белок стоматин, а также его гомологи, стоматин-подобные белки, обнаружены практически во всех типах тканей с наибольшим содержанием в эритроцитах, печени, скелетной и сердечной мускулатуре. Стоматин локализуется в ПМ и цитоплазматических везикулах фибробластов, эпителиальных и эндотелиальных клетках, поздних эндосомах и специализированных гранулах гематопоэтических клеток [70], причем он обнаруживается в составе ЛР на ПМ и мембранах эндосомального компартмента, а также предположительно *транс*-Гольджи [58]. На очень высоком уровне стоматин (также известный как erythrocyte band 7 integral membrane protein) представлен в липидных рафтах мембран эритроцитов [71].

Остается неопределенным, участвуют ли SPFH-домены других белков в связывании с холестеролом, а также как оно связано с их обогащением в липидных рафтах. Поскольку ЛР обогащены холестеролом, это связывание вероятно является предпосылкой к их ассоциации с белками SPFH-семейства. Однако в этом отношении важны и дополнительные структурные особенности. В случае со стоматином, три его аминокислоты в 9-аминокислотном гидрофобном С-концевом участке, ответственном за олигомеризацию, представляются необходимыми для ассоциации с ЛР [61]. При этом сама олигомеризация не является необходимым условием для присоединения к рафтам. Таким образом, расположение SPFH-содержащих белков в составе ЛР, по-видимому, определяется связыванием холестерола с помощью SPFH-домена, пальмитоилированием и последовательностью аминокислот в *N*-концевом гидрофобном домене (рис. 5), а также аминокислотами С-концевых последовательностей.

Функции стоматина и стоматин-подобных белков на сегодняшний день мало изучены. В основном, работы, в которых исследовался данный белок, проводились на клетках крови,



**Рис. 5.** Схема доменной организации и вероятной мембранной топологии стоматина. С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

прежде всего эритроцитах, а также нейтрофилах и тромбоцитах. Так, было продемонстрировано, что стоматин является главным компонентом липидных рафтов эритроцитов, где он регулирует активность ионных каналов и транспортеров [71]. В частности, он взаимодействует с транспортером глюкозы GLUT1, контролируя тем самым доступ глюкозы и дегидроаскорбиновой кислоты в эритроциты [70]. Предполагается, что стоматин участвует в регуляции процессов слияния клеток и/или слиянии везикулярных мембран с ПМ клеток [72], проведении остеокластогенеза и, вероятно, в дифференцировке трофобластов в плаценте [70]. Несмотря на сходство с другими белками липидных микродоменов, до настоящего времени наличие стоматина и стоматин-подобных белков в экзосомах практически не исследовалось, за исключением нескольких работ по ЭКВ, секретируемым эритроцитами. Так, было показано, что мембраны секретируемых эритроцитами везикул, соответствующих по размеру микровезикулам и экзосомам, содержат липидные рафты, основным компонентом которых является стоматин. В отличие от стоматина, флотиллин в составе липидных микродоменов на мембране везикул был обнаружен в следовых количествах, хотя он высоко представлен на мембране самих эритроцитов [73]. В другой работе показано присутствие стоматина наряду с флотиллином-1 в рафтовых компонентах экзосом, секретируемых в культуре клетками линии К562 (эритролейкоз), Daudi (В-клеточная лимфома), а также ретикулоцитами из крови пациентов. Авторы предполагают, что данные белки в составе липидных рафтов могут участвовать в селекции других белков, секретируемых в составе экзосом [74]. Помимо экзосом, стоматином обогащены мембраны различного рода везикул, секретируемых эритро-

5 БИОХИМИЯ том 85 вып. 2 2020

цитами и нейтрофилами [75], а также альфагранулы тромбоцитов [76].

Стоматин в составе экзосом, секретируемых клетками эпителиального происхождения, в том числе малигнизированными, ранее не исследовался. Мы обнаружили, что стоматин является постоянным компонентом ЭКВ [77], причем представлен на высоком уровне в составе экзосом самого различного происхождения, включая экзосомы, секретируемые клетками различных линий немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы (РМЖ), рака яичника (РЯ), экзосомы плазмы крови здоровых доноров и больных онкологическими заболеваниями, экзосомы из асцитической жидкости пациентов с РЯ и РМЖ. Важно отметить, что во всех исследуемых образцах ЭКВ, секретируемых клетками в культуре in vitro, уровень стоматина в ЭКВ значительно превышал его уровень в родительских клетках, что позволяет рассматривать стоматин в качестве нового экзосомального маркера. Интересно, что соотношение уровня стоматина в различных образцах ЭКВ (паттерн распределения) в большей степени соответствует таковому для тетраспанина CD9, чем для флотиллина-1.

### КАВЕОЛЯРНЫЕ ЛИПИДНЫЕ РАФТЫ И КАВЕОЛИН В ЭКЗОСОМАХ

Кавеолы представляют собой неклатриновые инвагинации ПМ размером, по разным оценкам, 50–100 нм. Изначально они были выделены как везикулы диаметром 60–80 нм на мембране мышечных клеток, клеток эндотелия, фибробластов и адипоцитов [78]. Биохимически они, как и другие ЛР, характеризуются нерастворимостью неионными детергентами и плаву-

честью в градиенте сахарозы [79]. Кавеолы специализированные функционируют как мембранные микродомены, которые регулируют передачу сигнала внутри клетки, а также многочисленные другие клеточные процессы, включая везикулярный транспорт (трансцитоз, эндоцитоз), гомеостаз холестерина, миграцию клеток и клеточный цикл [26]. В составе кавеол найдены такие сигнальные молекулы, как Gбелки, нерецепторные тирозин-киназы, эндотелиальные NO-синтазы и др., что позволило рассматривать кавеолы в качестве т.н. «сигналосом», обеспечивающих сборку сигнальных молекул и проведение сигналов внутрь клетки. Основным структурным белком кавеол, стабилизирующим их структуру, является кавеолин. Кавеолин участвует в регуляции важнейших процессов, включая эпителиально-мезенхимальный переход, что обусловлено его способностью активировать малую ГТФазу Rho, стимулировать PI3K/Akt — зависимый сигнальный каскад, а также усиливать секрецию ряда матриксных металлопротеиназ [80]. Известно, что изменение уровня фосфорилирования кавеолина-1 приводит к активированию других важнейших сигнальных путей [26].

У млекопитающих имеются три гена, кодирующих три белка: кавеолин-1, -2 и -3. Кавеолин-1 (Cav1) и кавеолин-2 (Cav2) широко экспрессируются в полностью дифференцированных мезенхимальных и эндотелиальных нормальных тканях, а также во многих солидных опухолях, тогда как кавеолин-3 (Cav3) преимущественно экспрессируется в мышечных клетках [81]. Кавеолин-1 связывает холестерол в ЛР, причем для связи достаточно минимальной



Рис. 6. Схема доменной организации и мембранной топологии кавеолина-1.

С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/ journal/biokhsm/ концентрации холестерола [79], его присутствие определяет формирование кавеол, а его нокаут у мышей приводит к потери кавеол на мембране клеток [82, 83].

Кавеолин-1 — интегральный мембранный белок, имеющий две изоформы, которые считываются с одного гена, имеющего два сайта инициации транскрипции. Изоформа  $\alpha$  содержит остатки 1—178, а более легкая  $\beta$ -форма — остатки 32—178. Функционально обе изоформы ассоциированы с кавеолами, формируя олигодимеры. Так, при связывании с мембраной белок димеризуется и образует характерную Y-подобную структуру (рис. 6).

Кавеолины на мембране демонстрируют необычную топологию с N- и C-концами в цитоплазме и длинным внутримембранным шпилечным доменом. Димеризация достигается за счет CSD-домена (caveolin scaffolding domain), который также играет роль во взаимодействии с холестеролом на мембране и широким спектром сигнальных молекул [26]. На одну кавеолу в среднем приходится ~100-200 молекул кавеолина и в 100 раз больше молекул холестерола [84]. Кавеолы также обогащены некоторыми гликосфинголипидами, а также сфингомиелином, а их плотность выше плотности окружающей мембраны, что соответствует критериям ЛР. Считается, что кавеолы представляют собой специализированные, морфологически отличимые микродомены, обогащенные сфинголипидами и холестеролом, стабилизируемые белком кавеолином [85], причем подавление холестерола приводит к нарушению их структуры [86].

Экспрессия кавеолина-1 не является достаточным условием для образования кавеол. Также важным участником формирования кавеол является белок кавин (PTRF), который рекрутируется к участкам ПМ, богатым фосфатидилсерином, холестеролом и кавеолином, и стабилизирует колбообразную форму кавеол. Предполагается, что кавин-1 функционирует как белок оболочки, стабилизирующий кавеолу [87, 88]. Экспрессия кавина-1 стимулирует инкорпорацию кавеолина-1 в состав ЛР, а его нокдаун приводит к снижению уровня кавеолина-1 на мембране [88] и блокирует формирование кавеол [87]. Таким образом, формирование кавеол представляется сложно регулируемым клеточным процессом, для которого кавеолин является необходимым, но не достаточным компонентом. И, наоборот, кавеолин присутствует в клетках, лишенных кавеол, что служит индикатором существования регуляторных функций кавеолина вне кавеол. Некоторые исследователи вводят понятие плоских кавеолин-зависимых сбороч-

ных платформ, или «строительных лесов» (Cav1 scaffolds), которое описывает домены ПМ с олигомерами кавеолина-1, не связанные с инвагинацией мембран [89]. Эти домены участвуют в проведении сигнальных путей за счет способности CSD кавеолина к связыванию с различными классами сигнальных молекул (мембранными рецепторами и нерецепторными киназами (включая рецептор EGFR, киназу Src и др.), eNOS, малыми ГТФазами и др.).

Как уже говорилось, кавеолин в составе кавеол является основным компонентом одной из разновидностей клатрин-независимого эндоцитоза — так называемого кавеолин-зависимого эндоцитоза [90]. Однако есть данные, которые свидетельствуют об участии кавеолина в негативной регуляции рафт-зависимого эндоцитоза. Так, кавеолин в составе плоских рафтов ограничивает эндоцитоз, что было показано на примере холерного токсина [52]. Также гиперэкспрессия кавеолина-1 подавляла захват клеткой аутокринного фактора подвижности клеток [91] и β1-интегрина [92], что обычно осуществляется с помощью рафт-зависимого эндоцитоза.

Похожая функциональная «разнонаправленность» является отличительной чертой кавеолина и в аспекте канцерогенеза. Так, опухольпромоторная функция кавеолина-1 показана при раке почки, раке простаты, плоскоклеточном раке языка, легкого и мочевого пузыря. С другой стороны, кавеолин-1 выполняет опухоль-супрессорную роль при аденокарциноме пищевода, легкого и плоскоклеточном раке кожи [80]. При этом даже в пределах одного и того же гистологического типа злокачественных новообразований экспрессия кавеолина-1 может иметь противоположное функциональное значение на разных этапах опухолевой прогрессии, ранних и поздних стадиях заболевания. Отдельное значение для опухолевой прогрессии имеет экспрессия кавеолина клетками микроокружения опухолей, а также уровень секретируемого кавеолина [93].

По совокупности своих характеристик кавеолин представляется одним из вероятных кандидатов на роль регулятора рафт-зависимого пути биогенеза экзосом, причем эта регуляция может быть как позитивной, так и негативной. Так, локализация в инвагинированных рафтах, участие в эндоцитозе и наличие CSD домена, обусловливающего способность к рекрутированию сигнальных молекул, может способствовать его участию в формировании ИЛВ и отбору экзосомального содержимого. В то же время подавление рафт-зависимого эндоцитоза возможно является одним из механизмов негативной регуляции процесса инвагинации на мембранах МВЭ. Кроме того, негативное влияние кавеолина-1 на образование экзосом может быть обусловлено его негативным воздействием на нейтральную сфингомиелазу. Было показано, что гиперэкспрессия Cav1 приводила к подавлению этого фермента и, как следствие, к снижению уровня церамида, которому, как уже сказано выше, отводится одна из ключевых ролей в биогенезе экзосом, опосредуемом липидными рафтами [94, 95].

Тем не менее, о присутствии кавеолина-1 в составе экзосом известно немного. Он был обнаружен в экзосомах, секретируемых клетками меланомы, а также в экзосомах плазмы крови пациентов с меланомой. При этом его количество в экзосомах плазмы пациентов с меланомой значительно превышало таковое в экзосомах плазмы здоровых доноров, что дало авторам возможность рассматривать экзосомальный кавеолин как потенциальный маркер меланомы [96]. Более позднее исследование показало корреляцию между молекулярным составом экзосом (в частности, присутствием кавеолина-1) и степенью злокачественности меланомы [97]. Есть несколько работ, посвященных раку простаты, в которых показано присутствие Cav-1 на простатосомах – крупных везикулах, секретируемых клетками рака предстательной железы [98]. Присутствие кавеолина-1 было также показано в экзосомах, секретируемых клетками гепатоцеллюлярной карциномы [99] и клетками эндотелия микрососудов легкого, причем секреция экзосом зависела от кавеолин-обогащенных микродоменов [100]. В частности, было показано, что клетки эндотелия капилляров легкого секретируют два разных типа ЭКВ – энларгосомы (крупные частицы, «enlargosomes») и экзосомы — под действием высокомолекулярной и низкомолекулярной гиалуроновой кислоты соответственно. При подавлении образования кавеолин-обогащенных микродоменов с помощью метил-бета-циклодекстрина наблюдалось существенное снижение количества обоих типов ЭКВ. При этом, что интересно, контрольные клетки (без стимуляции гиалуроновой кислотой) после обработки метил-бета-циклодекстрином продолжали синтезировать экзосомы, содержащие кавеолин-1, что говорит об их независимом от кавеолин-обогащенных микродоменов происхождении [100].

Кавеолин-1 способен, по-видимому, влиять и на акцептирование экзосом реципиентными клетками, причем это влияние носит негативный характер [101]. Как уже говорилось, одним из механизмов акцептирования экзосом клетками-реципиентами является клатрин-независимый (предположительно рафт-зависимый) эндоцитоз. При контакте экзосом с поверхностью активируется клетки-мишени сигнальный МАРК-каскад, который включает в себя последовательное фосфорилирование киназы ERK1/2 и белка теплового шока HSP27, что приводит к стимуляции рафт-зависимого эндоцитоза. Нокаут кавеолина-1 приводил к повышению уровня фосфорилирования этих белков и усилению акцептирования экзосом [101]. С этими результатами хорошо согласуются данные приведенной выше работы о негативном влиянии кавеолина на рафт-зависимый эндоцитоз [52].

Недавно было показано присутствие кавеолина в составе ЭКВ, секретируемых высокоагрессивными клетками РМЖ MDA-MB-231, причем ЭКВ, секретируемые клетками дикого типа с экспрессией кавеолина-1, восстанавливали способность к миграции и инвазии клеток с нокдауном этого белка [102]. Таким образом, была показана роль экзосомального кавеолина в усилении злокачественного потенциала клеток. В составе кавеолин-1-позитивных экзосом методом масс-спектрометрии были обнаружены белки Cyr61, тенасцин и S100A9, связанные с клеточной адгезией. Экзосомы, продуцируемые клетками с нокдауном кавеолина, теряли эти белки в своем составе и одновременно утрачивали способность индуцировать метастатический фенотип у клеток-реципиентов. Авторы предполагают, что кавеолин в составе экзосом передается клеткам микроокружения, промотируя их метастатическую активность, и клеткам отдаленных тканей, способствуя формированию преметастатических ниш [102].

Поскольку образование кавеол невозможно без присутствия белков кавинов, то логично ожидать их участие в секреции экзосом. Действительно, в работе прошлого года было показано, что гиперэкспрессия кавина-1 приводила к увеличению секреции экзосом и усилению клеточного роста. Что еще интереснее, исследователи обнаружили способность клеток с гиперэкспрессией кавина-1 вызывать малигнизацию соседних клеток посредством экзосом. При этом анализ клинических образцов выявил положительную корреляцию между стадией заболевания и уровнем экспрессии кавина-1 как в самой опухоли, так и в экзосомах плазмы пациентов с глиомой [103].

В настоящее время участие липидных микродоменов (липидных рафтов) в биогенезе экзосом не вызывает сомнений. Накопленные многочисленные данные свидетельствуют о крайне значимой роли компонентов липидных рафтов в реорганизации мембран мультивезикулярных эндосом и формировании ИЛВ. Более того, подавление активности нейтральной сфингомиелазы 2-го типа и синтеза церамида легли в основу разработки ингибиторов секреции экзосом, которые уже используются, хотя и с разной степенью эффективности, в экспериментальной практике. Множество данных указывает на сходство процессов с участием липидных рафтов на ПМ (структурно-функциональная организация мембраны, кластеризация белков, включая рецепторы, сигнальные молекулы, белки цитоскелета и др., эндоцитоз) с процессом формирования ИЛВ на мембранах МВЭ (связывание белков экзосомального карго, организация структуры и инвагинация мембраны при формировании ИЛВ). Можно предположить, что такие РОБ, как флотиллин, выполняют сходные функции при флотиллин-зависимом эндоцитозе на ПМ и в процессе образования ИЛВ, участвуя в отборе биомолекул для включения в состав содержимого будущих экзосом. В то же время молекулярные механизмы рафт-зависимого пути биогенеза экзосом остаются малопонятными. Есть и более общие вопросы, которые также ждут ответов. Например, насколько в действительности независимы или связаны между собой различные пути формирования ИЛВ (ESCRT-зависимый механизм, путь с участием синдекан-синтениновых комплексов и рафт-зависимый путь)? Могут ли разные формы биогенеза экзосом происходить в одних и тех же клетках одновременно, или механизмы биогенеза экзосом являются отличительной характеристикой различных клеток? Возможно ли «переключение» или сдвиг в сторону того или иного пути образования ИЛВ в клетке в зависимости от внешних условий? Наконец, если экзосомы, образованные посредством различных механизмов, сосуществуют в одной клетке, то происходит ли их формирование в составе разных МВЭ? Иными словами, существуют ли в одной «общей» поздней эндосоме ИЛВ, образованные с помощью различных механизмов, или в клетке присутствуют разные популяции МВЭ, ИЛВ которых образованы с помощью разных механизмов?

Можно предположить, что внутриклеточная «судьба» МВЭ (возвращение в аппарат Гольджи, слияние с лизосомальным компартментом или слияние с ПМ и высвобождение экзосом) может определяться различиями в механизмах биогенеза ИЛВ и их молекулярным составом. Согласно одной из гипотез, МВЭ с везикулами, образованными с помощью ESCRT-зависимого механизма, содержат в своем составе преимущественно убиквитинированные белки и сливаются с лизосомами с последующей деградацией со-

держимого, в то время как МВЭ, ИЛВ которых образованы по ESCRT-независимому механизму, сливаются с ПМ, приводя к секреции экзосом.

Ответы на эти и другие вопросы, несомненно, изменят и существенно пополнят наши представления о происхождении экзосом, об их функциональной роли и о механизмах межклеточной коммуникации в целом. Несомненно также, что активные попытки разработки новых подходов к терапии с использованием экзосом, предпринимаемые в последнее время, не могут быть в полной мере реализованы без понимания

- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., and Turbide, C. (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes), *J. Biol. Chem.*, 262, 9412–9420, doi: 10.1016/j.biocel.2011.10.005.
- Trams, E.G., Lauter, C.J., Norman Salem, J., and Heine, U. (1981) Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, 645, 63–70, doi: 10.1016/0005-2736(81)90512-5.
- 3. Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1983) Receptormediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes, *J. Cell Biol.*, **97**, 329–339, doi: 10.1083/jcb.97.2.329.
- Yu, S., Cao, H., Shen, B., and Feng, J. (2015) Tumorderived exosomes in cancer progression and treatment failure, *Oncotarget*, 6, 37151–37168, doi: 10.18632/oncotarget.6022.
- Soung, Y.H., Nguyen, T., Cao, H., Lee, J., and Chung, J. (2015) Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis, *BMB Rep.*, 49, 18–25 doi: 10.5483/BMBRep. 2016.49.1.239.
- Чевкина Е., Щербаков А., Журавская А., Семина С., Комельков А., Красильников М. (2016) Экзосомы и передача (эпи)генетической информации опухолевыми клетками, *Успехи мол. онкологии*, 2, 8–20.
- Willms, E., Johansson, H.J., Mäger, I., Lee, Y., Blomberg, K.E.M., Sadik, M., Alaarg, A., Smith, C.I.E., Lehtiö, J., El Andaloussi, S., Wood, M.J.A., and Vader, P. (2016) Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties, *Sci. Rep.*, 6, 22519, doi: 10.1038/ srep22519.
- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., and David, G. (2012) mSyndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes, *Nature Cell Biol.*, 14, 677–685, doi: 10.1038/ncb2502.
- Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F., and Mittelbrunn, M. (2014) Sorting it out: regulation of exosome loading, *Semin. Cancer Biol.*, 28, 3–13, doi: 10.1016/j.semcancer.2014.04.009.
- Kowal, J., Tkach, M., and Théry, C. (2014) Biogenesis and secretion of exosomes, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **29**, 116–125, doi: 10.1016/j.ceb.2014.05.004.
- Tan, S.S., Yin, Y., Lee, T., Lai, R.C., Yeo, R.W.Y., Zhang, B., Choo, A., and Lim, S.K. (2013) Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane, *J. Extr. Vesicles*, 2, doi: 10.3402/jev.v2i0.22614.
- 12. Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., and

БИОХИМИЯ том 85 вып. 2 2020

принципов селекции биомолекул и механизмов биогенеза и секреции экзосом.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-04-00038А).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Simons, M. (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes, *Science*, **319**, 1244–1247, doi: 10.1126/science.1153124.

- Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., and Brech, A. (2009) Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs, *Traffic*, **10**, 925–937, doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x.
- Van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., and Raposo, G. (2011) The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis, *Dev. Cell*, **21**, 708–721, doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.019.
- Phuyal, S., Hessvik, N. P., Skotland, T., Sandvig, K., and Llorente, A. (2014) Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins, *FEBS J.*, 281, 2214–2227, doi: 10.1111/febs.12775.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, 175, 720–731, doi: 10.1126/science.175.4023.720.
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., and Eggeling, C. (2017) The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 18, 361–374, doi: 10.1038/nrm.2017.16.
- Lingwood, D., and Simons, K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle, *Science*, **327**, 46–50, doi: 10.1126/science.1174621.
- Prior, I.A., Muncke, C., Parton, R.G., and Hancock, J.F. (2003) Direct visualization of ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains, *J. Cell Biol.*, 160, 165–170, doi: 10.1083/jcb.200209091.
- 20. Pike, L.J. (2003) Lipid rafts, *J. Lipid Res.*, **44**, 655–667, doi: 10.1194/jlr.R200021-JLR200.
- Simons, K., and Vaz, W.L.C. (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33, 269–295, doi: 10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803.
- Neumann, A., Itano, M., and Jacobson, K. (2013) Understanding lipid rafts and other related membrane domains, *F1000 Biol. Rep.*, 2, doi: 10.3410/b2-31.
- Simons, *K.*, and Sampaio, J.L. (2011) Membrane organization and lipid rafts, *Cold Spr. Harb. Perspect. Biol.*, 3, 1–17, doi: 10.1101/cshperspect.a004697.
- Pike, L.J. (2009) The challenge of lipid rafts, *J. Lipid Res.*, 50, 323–328. doi: 10.1194/jlr.R800040-JLR200.
- Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Belov, V.N., Hein, B., Von Middendorff, C., Schönle, A., and Hell, S.W. (2009) Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell, *Nature*, **457**, 1159–1162, doi: 10.1038/nature07596.

- Parton, R.G. (2018) Caveolae: structure, function, and relationship to disease, *Ann. Review Cell. Develop. Biol.*, 34, 111–136, doi: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062737.
- Marsh, M., and Meer, G.V. (2008) Cell biology: no ESCRTs for exosomes, *Science*, **319**, 1191–1192, doi: 10.1126/science.1155750.
- Strauss, K., Goebel, C., Runz, H., Möbius, W., Weiss, S., Feussner, I., Simons, M., and Schneider, A. (2010) Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in niemann-pick type C disease, *J. Biol. Chem.*, 285, 26279–26288, doi: 10.1074/jbc.M110.134775.
- Yuyama, K., Sun, H., Mitsutake, S., and Igarashi, Y. (2012) Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid by microglia, *J. Biol. Chem.*, 287, 10977–10989, doi: 10.1074/jbc.M111.324616.
   Wang, X., Yin, X., and Yang, Y. (2019) Rasal2 suppresses
- Wang, X., Yin, X., and Yang, Y. (2019) Rasal2 suppresses breast cancer cell proliferation modulated by secretory autophagy, *Mol. Cell. Biochem.*, doi: 10.1007/s11010-019-03615-7.
- Li, X.Q., Liu, J.T., Fan, L.L., Liu, Y., Cheng, L., Wang, F., Yu, H.Q., Gao, J., Wei, W., Wang, H., and Sun, G.P. (2016) Exosomes derived from gefitinib-treated EGFRmutant lung cancer cells alter cisplatin sensitivity via upregulating autophagy, *Oncotarget*, doi: 10.18632/oncotarget. 8358.
- Menck, K., Sönmezer, C., Worst, T.S., Schulz, M., Dihazi, G.H., Streit, F., Erdmann, G., Kling, S., Boutros, M., Binder, C., and Gross, J.C. (2017) Neutral sphingomyelinases control extracellular vesicles budding from the plasma membrane, *J. Extracel. Vesicles*, 6, 1378056, doi: 10.1080/20013078.2017.1378056.
- Sonnino, S., and Prinetti, A. (2009) Sphingolipids and membrane environments for caveolin, *FEBS Lett.*, 583, 597–606, doi: 10.1016/j.febslet.2009.01.007.
- Zabeo, D., Cvjetkovic, A., Lässer, C., Schorb, M., Lötvall, J., and Höög, J.L. (2017) Exosomes purified from a single cell type have diverse morphology, *J. Extr. Vesicles*, 6, doi: 10.1080/20013078.2017.1329476.
- 35. Ji, H., Chen, M., Greening, D.W., He, W., Rai, A., Zhang, W., and Simpson, R.J. (2014) Deep sequencing of RNA from three different extracellular vesicle (EV) subtypes released from the human LIM1863 colon cancer cell line uncovers distinct mirna-enrichment signatures, *PLoS One*, 9, doi: 10.1371/journal.pone.0110314.
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplop, N., Uryu, K., Pharmer, L., King, T., Bojmar, L., Lyden, D. (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis, *Nature*, **527**, 329–335, doi: 10.1038/nature15756.
- Sreekumar, P.G., Kannan, R., Kitamura, M., Spee, C., Barron, E., Ryan, S.J., and Hinton, D.R. (2010) αB crystallin is apically secreted within exosomes by polarized human retinal pigment epithelium and provides neuroprotection to adjacent cells, *PLoS One*, 5, doi: 10.1371/journal.pone.0012578.
- Tauro, B.J., Greening, D.W., Mathias, R.A., Mathivanan, S., Ji, H., and Simpson, R.J. (2013) Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids, *Mol. Cell Proteomics*, **12**, 587–598, doi: 10.1074/mcp.M112.021303.
- Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M.Á., Bernad, A., and Sánchez-Madrid, F. (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells, *Nat. Commun.*, 2, 282, doi: 10.1038/ncomms1285.
- Kajimoto, T., Ókada, T., Miya, S., Zhang, L., and Nakamura, S.I. (2013) Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal

multivesicular endosomes, *Nat. Commun.*, **4**, 2712, doi: 10.1038/ncomms3712.

- 41. Sprong, H., Van Der Sluijs, P., and Van Meer, G. (2001) How proteins move lipids and lipids move proteins, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 504–513, doi: 10.1038/35080071.
- 42. Alonso, R., Mazzeo, C., Rodriguez, M.C., Marsh, M., Fraile-Ramos, A., Calvo, V., Avila-Flores, A., Merida, I., and Izquierdo, M. (2011) Diacylglycerol kinase  $\alpha$  regulates the formation and polarisation of mature multivesicular bodies involved in the secretion of Fas ligand-containing exosomes in T lymphocytes, *Cell Death Differ.*, **18**, 1161–1173, doi: 10.1038/cdd.2010.184.
- Laulagnier, K., Grand, D., Dujardin, A., Hamdi, S., Vincent-Schneider, H., Lankar, D., Salles, J.P., Bonnerot, C., Perret, B., and Record, M. (2004) PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes, *FEBS Lett.*, 572, 11–14, doi: 10.1016/j.febslet.2004.06.082.
- 44. Simons, K., and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 31–39, doi: 10.1038/35036052.
- 45. Levental, I., Grzybek, M., and Simons, K. (2010) Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts, *Biochemistry*, **49**, 6305–6316, doi: 10.1021/bi100882y.
- Tulodziecka, K., Diaz-Rohrer, B.B., Farley, M.M., Chan, R.B., Di Paolo, G., Levental, K.R., Waxham, M., and Levental, I. (2016) Remodeling of the postsynaptic plasma membrane during neural development, *Mol. Biol. Cell*, 27, 3480–3489, doi: 10.1091/mbc.E16-06-0420.
- 47. Staubach, S., and Hanisch, F.G. (2011) Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer, *Expert Rev. Prot.*, **8**, 263–277, doi: 10.1586/epr.11.2.
- Yanez-Mo, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdes, M., and Sanchez-Madrid, F. (2009) Tetraspaninenriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes, *Trends Cell Biol.*, **19**, 434–446, doi: 10.1016/ j.tcb.2009.06.004.
- Perez-Hernandez, D., Gutiérrez-Vázquez, C., Jorge, I., López-Martín, S., Ursa, A., Sánchez-Madrid, F., Vázquez, J., and Yañez-Mó, M. (2013) The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes, *J. Biol. Chem.*, 288, 11649–11661, doi: 10.1074/jbc.M112.445304.
- Buschow, S.I., Nolte-'t Hoen, E.N.M., van Niel, G., Pols, M.S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C.J.M., Raposo, G., Wubbolts, R., Wauben, M.H.M., and Stoorvogel, W. (2009) MHC II In dendritic cells is targeted to lysosomes or t cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways, *Traffic*, **10**, 1528–1542, doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x.
- 51. Mazurov, D., Barbashova, L., and Filatov, A. (2013) Tetraspanin protein CD9 interacts with metalloprotease CD10 and enhances its release via exosomes, *FEBS J.*, **280**, 1200–1213, doi: 10.1111/febs.12110.
- Lajoie, P., and Nabi, I.R. (2010) Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis, *Intern. Rev. Cell Mol. Biol.*, 282, 135–163, doi: 10.1016/S1937-6448(10)82003-9.
- Meister, M., and Tikkanen, R. (2014) Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: a flotillin point of view, *Membranes*, 4, 356–371, doi: 10.3390/membranes4030356.
- El-Sayed, A., and Harashima, H. (2013) Endocytosis of gene delivery vectors: From clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis, *Mol. Therapy*, 21, 1118–1130, doi: 10.1038/mt.2013.54.
- 55. Huber, T.B., Schermer, B., Müller, R.U., Höhne, M., Bartram, M., Calixto, A., Hagmann, H., Reinhardt, C., Koos, F., Kunzelmann, K., Shirokova, E., Krautwurst, D., Harteneck, C., Simons, M., Pavenstädt, H., Kerjaschki, D., Thiele, C., Walz, G., Chalfie, M., and Benzing, T. (2006) Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activ-

ity of associated ion channels, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **103**, 17079–17086, doi: 10.1073/pnas.0607465103.

- Nijtmans, L.G.J. (2000) Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins, *EMBO J.*, 19, 2444–2451, doi: 10.1093/emboj/19.11.2444.
- 57. Steglich, G., Neupert, W., and Langer, T. (1999) Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria, *Mol. Cell Biol.*, **19**, 3435–3442, doi: 10.1128/mcb.19.5.3435.
- Browman, D.T., Resek, M.E., Zajchowski, L.D., and Robbins, S.M. (2006) Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipidraft-like domains of the ER, *J. Cell Sci.*, **119**, 3149–3160, doi: 10.1242/jcs.03060.
- Jang, S.C., Crescitelli, R., Cvjetkovic, A., Belgrano, V., Bagge, R.O., Hoog, J.L., Sundfeldt, K., Ochiya, T., Kalluri, R., and Lotvall, J. (2017) A subgroup of mitochondrial extracellular vesicles discovered in human melanoma tissues are detectable in patient blood, *BioRxiv*, doi: 10.1101/174193.
- Solis, G.P., Hoegg, M., Munderloh, C., Schrock, Y., Malaga-Trillo, E., Rivera-Milla, E., and Stuermer, C.A.O. (2007) Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains, *Biochem. J.*, 403, 313–322, doi: 10.1042/BJ20061686.
- 61. Browman, D.T., Hoegg, M.B., and Robbins, S.M. (2007) The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers, *Trends Cell Biol.*, **17**, 394–402, doi: 10.1016/j.tcb.2007.06.005.
- 62. Otto, G.P., and Nichols, B.J. (2011) The roles of flotillin microdomains–endocytosis and beyond, *J. Cell Sci.*, **124**, 3933–3940, doi: 10.1242/jcs.092015.
- Зборовская И.Б., Галецкий С.А., Комельков А.В. (2016) Белки мембранных микродоменов и их участие в онкогенезе, *Успехи мол. онкологии*, **3**, 16–29, doi: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-16-29.
- Glebov, O.O., Bright, N.A., and Nichols, B.J. (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells, *Nat. Cell Biol.*, 8, 46–54, doi: 10.1038/ncb1342.
- Frick, M., Bright, N.A., Riento, K., Bray, A., Merrified, C., and Nichols, B.J. (2007) Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding, *Curr. Biol.*, 17, 1151–1156, doi: 10.1016/j.cub.2007.05.078.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 30, 3.22.1–3.22.29, doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
- 67. Skryabin, G., Komelkov, A., Galetsky, S., Akselrod, M., and Tchevkina, E. (2018) Analysis of SPFH proteins in exosomes produced by non-small cell lung cancer cells, 22 international charles heidelberger symposium on cancer research, Tomsk, Russia, pp. 99–101.
- Langhorst, M.F., Reuter, A., Luxenhofer, G., Boneberg, E.-M., Legler, D.F., Plattner, H., and Stuermer, C.A.O. (2006) Preformed reggie/flotillin caps: stable priming platforms for macrodomain assembly in T cells, *FASEB J.*, 20, 711–713, doi: 10.1096/fj.05-4760fje.
- 69. Babuke, T., Ruonala, M., Meister, M., Amaddii, M., Genzler, C., Esposito, A., and Tikkanen, R. (2009) Heterooligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis, *Cell. Signalling*, **21**, 1287–1297, doi: 10.1016/j.cellsig.2009.03.012.
- Rungaldier, S., Umlauf, E., Mairhofer, M., Salzer, U., Thiele, C., and Prohaska, R. (2017) Structure-function analysis of human stomatin: a mutation study, *PLoS One*, 12, 1–24, doi: 10.1371/journal.pone.0178646.
- Salzer, U., and Prohaska, R. (2001) Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts, *Blood*, 97, 1141–1143.

- Lee, J.H., Hsieh, C.F., Liu, H.W., Chen, C.Y., Wu, S.C., Chen, T.W., Hsu, C.S., Liao, Y.H., Yang, C.Y., Shyu, J.F., Fischer, W.B., and Lin, C.H. (2017) Lipid raft-associated stomatin enhances cell fusion, *FASEB J.*, **31**, 47–59, doi: 10.1096/fj.201600643R.
- Salzer, U., Hinterdorfer, P., Hunger, U., Borken, C., and Prohaska, R. (2002) Ca<sup>++</sup>-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin, *Blood*, **99**, 2569–2577, doi: 10.1182/blood.V99.7.2569.
- De Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., and Vidal, M. (2003) Lipid raft-associated protein sorting in exosomes, *Blood*, **102**, 4336–4344, doi: 10.1182/blood-2003-03-0871.
- Feuk-Lagerstedt, E., Samuelsson, M., Movitz, C., Rosqvist, Å., Karlsson, A., Bergström, J., Larsson, T., Mosgoeller, W., Steiner, M., and Prohaska, R. (2002) The presence of stomatin in detergent-insoluble domains of neutrophil granule membranes, *J. Leukocyte Biol.*, **72**, 970–977, doi: 10.1189/jlb.72.5.970.
- Salzer, U., Zhu, R., Luten, M., Isobe, H., Pastushenko, V., Perkmann, T., Hinterdorfer, P., and Bosman, G.J.C.G.M. (2008) Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin, *Transfusion*, 48, 451–462, doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01549.x.
- 77. Скрябин Г.О., Комельков А.В., Евтушенко Е.Г., Багров Д.В., Галецкий С.А., Аксельрод М.Е., Чевкина Е.М. (2018) Анализ экзосомальных белковых маркеров в различных фракциях экстраклеточных везикул, секретируемых клетками немелкоклеточного рака легкого. *Успехи молекулярной онкологии*, 5, Приложение, с. 57–58.
- Smart, É.J., Graf, G.A., McNiven, M.A., Sessa, W.C., Engelman, J.A., Scherer, P.E., Okamoto, T., and Lisanti, M.P. (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction, *Mol. Cell Biol.*, **19**, 7289–7304, doi: 10.1128/ mcb.19.11.7289.
- Brown, D.A., and Rose, J.K. (1992) Sorting of GPIanchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface, *Cell*, 68, 533–544, doi: 10.1016/0092-8674(92)90189-J.
- Fu, P., Chen, F., Pan, Q., Zhao, X., Zhao, C., Cho, W.C.-S., and Chen, H. (2017) The different functions and clinical significances of caveolin-1 in human adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, *Onco Targets Ther.*, 10, 819–835, doi: 10.2147/OTT.S123912.
- Senetta, R., Stella, G., Pozzi, E., Sturli, N., Massi, D., and Cassoni, P. (2013) Caveolin-1 as a promoter of tumour spreading: when, how, where and why, *J. Cell. Mol. Med.*, 17, 325–336, doi: 10.1111/jcmm.12030.
- Murata, M., Peränen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V., and Simons, K. (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 92, 10339–10343.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F.C., Schedl, A., Hailer, H., and Kurzchalia, T.V. (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice, *Science*, 293, 2449–2452, doi: 10.1126/science.1062688.
- Pelkmans, L., and Zerial, M. (2005) Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae, *Nature*, 436, 128–133, doi: 10.1038/nature03866.
- Parton, R.G., and Simons, K. (2007) The multiple faces of caveolae, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 185–194, doi: 10.1038/nrm2122.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., and Anderson, R.G.W. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats, *Cell*, 68, 673–682, doi: 10.1016/0092-8674(92)90143-Z.
- 87. Hill, M.M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S.J., Walser, P., Abankwa, D.,

Oorschot, V.M.J., Martin, S., Hancock, J.F., and Parton, R.G. (2008) PTRF-cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function, *Cell*, **132**, 113–124, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.042.

- Liu, L., and Pilch, P.F. (2008) A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organizatio, *J. Biol. Chem.*, 283, 4314–4322, doi: 10.1074/jbc.M707890200.
- Lajoie, P., Goetz, J.G., Dennis, J.W., and Nabi, I.R. (2009) Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane, *J. Cell Biol.*, 185, 381–385, doi: 10.1083/jcb.200811059.
- Sandvig, K., Kavaliauskiene, S., and Skotland, T. (2018) Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity, *Histochem. Cell Biol.*, **150**, 107–118, doi: 10.1007/s00418-018-1678-5.
- Kojic, L.D., Joshi, B., Lajoie, P., Le, P.U., Cox, M.E., Turbin, D.A., Wiseman, S.M., and Nabi, I.R. (2007) Raftdependent endocytosis of autocrine motility factor is phosphatidylinositol 3-kinase-dependent in breast carcinoma cells, *J. Biol. Chem.*, 282, 29305–29313, doi: 10.1074/jbc. M704069200.
- Vassilieva, E.V., Gerner-Smidt, K., Ivanov, A.I., and Nusrat, A. (2008) Lipid rafts mediate internalization of β1integrin in migrating intestinal epithelial cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **295**, doi: 10.1152/ ajpgi.00082.2008.
- Nwosu, Z.C., Ebert, M.P., Dooley, S., and Meyer, C. (2016) Caveolin-1 in the regulation of cell metabolism: a cancer perspective, *Mol. Cancer*, 15, doi: 10.1186/s12943-016-0558-7.
- 94. Wu, P., Qi, B., Zhu, H., Zheng, Y., Li, F., and Chen, J. (2007) Suppression of staurosporine-mediated apoptosis in Hs578T breast cells through inhibition of neutral-sphingomyelinase by caveolin-1, *Cancer Lett.*, **256**, 64–72, doi: 10.1016/j.canlet.2007.05.007.
- 95. Veldman, R.J., Maestre, N., Aduib, O.M., Medin, J.A., Salvayre, R., and Levade, T. (2001) A neutral sphingomyelinase resides in sphingolipid-enriched microdomains and is inhibited by the caveolin-scaffolding domain: potential implications in tumour necrosis factor signalling, *Biochem. J.*, 355, 859–868, doi: 10.1042/ bj3550859.
- 96. Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabrò, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M.L.,

Federici, C., and Iessi, E. (2009) High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients, *PLoS One*, **4**, doi: 10.1371/journal.pone. 0005219.

- 97. Lazar, I., Clement, E., Ducoux-Petit, M., Denat, L., Soldan, V., Dauvillier, S., Balor, S., Burlet-Schiltz, O., Larue, L., Muller, C., and Nieto, L. (2015) Proteome characterization of melanoma exosomes reveals a specific signature for metastatic cell lines, *Pigment Cell Melanoma Res.*, 28, 464–475, doi: 10.1111/pcmr.12380.
- Llorente, A., de Marco, M.C., and Alonso, M. (2004) Caveolin-1 and MAL are located on prostasomes secreted by the prostate cancer PC-3 cell line, *J.Cell Sci.*, 117, 5343–5351, doi: 10.1242/jcs.01420.
- 99. He, M., Qin, H., Poon, T.C.W., Sze, S.C., Ding, X., Co, N.N., Ngai, S.M., Chan, T.F., and Wong, N. (2015) Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs, *Carcinogenesis*, 36, 1008–1018, doi: 10.1093/carcin/bgv081.
- 100. Mirzapoiazova, T., Lennon, F.E., Mambetsariev, B., Allen, M., Riehm, J., Poroyko, V.A., and Singleton, P.A. (2015) Extracellular vesicles from caveolin-enriched microdomains regulate hyaluronan-mediated sustained vascular integrity, *Intern. J. Cell Biol.*, 481493, doi: 10.1155/ 2015/481493.
- 101. Svensson, K.J., Christianson, H.C., Wittrup, A., Bourseau-Guilmain, E., Lindqvist, E., Svensson, L.M., Mörgelin, M., and Belting, M. (2013) Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1, J. Biol. Chem., 288, 17713–17724, doi: 10.1074/jbc.M112.445403.
- 102. Campos, A., Šalomon, C., Bustos, R., Díaz, J., Martínez, S., Silva, V., Reyes, C., Díaz-Valdivia, N., Varas-Godoy, M., Lobos-González, L., and Quest, A.F. (2018) Caveolin-1containing extracellular vesicles transport adhesion proteins and promote malignancy in breast cancer cell lines, *Nanomedicine*, **13**, doi: 10.2217/nnm-2018-0094.
- 103. Huang, K., Fang, C., Yi, K., Liu, X., Qi, H., Tan, Y., Zhou, J., Li, Y., Liu, M., Zhang, Y., Yang, J., Zhang, J., Li, M., and Kang, C. (2018) The role of PTRF/Cavin 1 as a biomarker in both glioma and serum exosomes, *Theranostics*, 8, 1540–1557, doi: 10.7150/thno.22952.

### LIPID RAFTS IN EXOSOME BIOGENESIS

### Review

### G. O. Skryabin, A. V. Komelkov\*, E. E. Savelyeva, and E. M. Tchevkina

Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, 115478 Moscow, Russia; E-mail: komelkov@gmail.com

> Received October 1, 2019 Revised November 28, 2019 Accepted November 28, 2019

Exosomes, secreted extracellular vesicles forming in the intracellular vesicular transport system, play a crucial role in distant intercellular communication. Exosomes transfer active forms of biomolecules of various classes, and the molecular composition of exosomal cargo is the result of directed selection and depends on the type of producer cells. The mechanisms underlying the formation of exosomes and selection of exosomal cargo are still not fully understood. Several pathways for exosome biogenesis are assumed, although questions about their independence as well as their simultaneous coexistence in the cell remain open. Recently discovered mechanism of exosome formation, associated with lipid rafts, or membrane lipid microdomains, is the least studied. This review presents the modern views and basic hypotheses regarding the mechanisms of biogenesis and secretion of exosomes and summarizes current data on the participation of lipid rafts and their constituent molecules in this process. Special attention is paid to raft-forming proteins of the SPFH family, components of flat rafts, as well as caveolin, the main component of caveolae.

*Keywords*: exosomes, lipid rafts, SPFH proteins, caveolin
УДК 577.151.4

# КАТАЛИТИЧЕСКИ КОМПЕТЕНТНЫЕ КОНФОРМАЦИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА 8-ОКСОГУАНИН-ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА\*

© 2020 А.В. Попов<sup>1\*\*</sup>, А.В. Юдкина<sup>1,2</sup>, Ю.Н. Воробьев<sup>1</sup>, Д.О. Жарков<sup>1,2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: apopov@niboch.nsc.ru, dzharkov@niboch.nsc.ru

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 15.04.2019 После доработки 09.11.2019 Принята к публикации 09.11.2019

Фермент 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилаза (OGG1) в эукариотических клетках отвечает за удаление из ДНК 8-оксогуанина (охоG) – одного из самых часто встречающихся окисленных азотистых оснований. Фермент последовательно катализирует гидролиз *N*-гликозидной связи (ДНК-гликозилазная активность) и разрыв цепи ДНК с 3'-стороны от повреждения по механизму в-элиминирования (лиазная активность). Также фермент проявляет лиазную активность в отношении субстратов, содержащих апурин-апиримидиновые (АР-) сайты – остатки дезоксирибозы без азотистого основания. Фермент OGG1 высокоспецифичен к основанию напротив повреждения: он удаляет охо G и расщепляет АР-сайты напротив C, но не напротив А. Активность фермента также заметно снижается при аминокислотных заменах, стерически препятствующих связыванию охоG, вывернутого из спирали ДНК в активный центр фермента. Ранее молекулярно-динамическими методами была исследована конформационная динамика таких мутантных вариантов белка OGG1 человека в комплексе с субстратной ДНК, содержащей пару охоG:С, и выдвинуто предположение, что активность фермента зависит от заселенности определенных популяций конформеров каталитических остатков Lys249 и Asp268. В настоящей работе проведено молекулярно-динамическое исследование белка OGG1 человека в комплексе с ДНК, содержащей пару охоG:А, и мутантных вариантов белка OGG1 в комплексе с ДНК, содержащей пару АР:С. Показано, что низкая активность фермента сопровождается сниже-нием заселенности популяций с остатками Lys249 и Asp268, расположенными оптимально для катализа. Для мутантных вариантов белка OGG1 экспериментально измерены константы скорости отдельных стадий реакции и показано, что их относительные значения согласуются с результатами моделирования. Таким образом, заселенность популяций каталитически компетентных конформеров остатков Lys249 и Asp268 в активном центре фермента служит решающим фактором активности фермента OGG1.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** повреждение ДНК, репарация ДНК, 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилаза, субстратная специфичность.

**DOI:** 10.31857/S0320972520020062

Окисление макромолекул в клетках аэробных организмов происходит со значительной частотой под действием активных форм кислорода, возникающих как побочные продукты нормального метаболизма, а также в результате воздействия ионизирующей радиации [1, 2]. Окислительные повреждения митохондриальной и ядерной ДНК напрямую связаны с болезнями и старением. Активные формы кислорода могут вызывать разрывы сахарофосфатного остова, образование апурин-апиримидиновых (АР-) сайтов (остатков дезоксирибозы без азотистого основания) и предмутагенное повреждение гетероциклических оснований [1–3].

Одно из наиболее часто встречающихся в природе поврежденных азотистых оснований – 8-оксогуанин (охоG). Наличие кетогруппы при C8 приводит к тому, что свободный нуклеозид 8-оксо-2'-дезоксигуанозин (охоdG) предпочтительно существует в *син*-конформации, в отличие от канонических пуриновых дезоксирибонуклеозидов [4]. Эта конформация также стабилизируется при образовании хугстеновской пары с A, а в паре с C охоdG принимает *анти*-конформацию, близкую к канонической паре G:C

Принятые сокращения: АР-сайт – апурин-апиримидиновый сайт; ОGG1 – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза; охоG – 8-оксогуанин; охоdG – 8-оксо-2'-дезоксигуанозин; МД – молекулярная динамика; WT – дикий тип.

<sup>\*</sup> Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio. msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM19-116, 06.01.2020.

<sup>\*\*</sup> Адресат для корреспонденции.



**Рис. 1.** Механизм расщепления поврежденной ДНК ферментом OGG1. Депротонированная ε-аминогруппа остатка Lys249 атакует атом C1' с образованием ковалентного интермедиата – основания Шиффа (1). Происходит расшепление остова ДНК по механизму β-элиминирования (2), после чего основание Шиффа гидролизуется с высвобождением фермента и образованием конечного продукта – одноцепочечного разрыва ДНК, содержащего на 3'-конце α,β-ненасыщенный γ-гидроксиальдегид (3)

[5–7]. Формирование устойчивой пары охоG:А объясняет мутагенность этого повреждения с преимущественным образованием трансверсий G  $\rightarrow$ T [8, 9]. Уровень эндогенного охоG в ДНК составляет ~1 охоG на 10<sup>6</sup> G, и показана возможность его повышения в несколько раз при генотоксическом стрессе [10]. Еще более многочисленны в ДНК АР-сайты, которые образуются в результате спонтанного гидролиза *N*-гликозидной связи, а также возникают как интермедиаты в процессе эксцизионной репарации оснований [3]. Число АР-сайтов, присутствующих в любой момент времени в клетках человека, составляет ~1 на 10<sup>5</sup> оснований [11].

За удаление охоG из генома человека и других эукариот отвечает 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (OGG1, КФ 3.2.2.23) – фермент, гидролизующий *N*-гликозидную связь в нуклеозидах охоб в составе ДНК [12–15]. Фермент OGG1 также катализирует β-элиминирование с разрывом связи СЗ'-ОЗ' как после удаления основания охоG, так и в спонтанно возникших АР-сайтах (рис. 1). У бактерий такую же функцию выполняет фермент Fpg, последовательность которого, однако, не гомологична последовательности полипептида OGG1 [16, 17]. Расщепление гликозидной связи ферментом OGG1 проходит по механизму нуклеофильного замещения с образованием ковалентного интермедиата (основания Шиффа) между є-аминогруппой абсолютно консервативного остатка Lys249 и С1' поврежденного нуклеотида [18, 19]. Еще один абсолютно консервативный остаток, Asp268, по всей видимости, участвует в координации или протонировании остатка дезоксирибозы [20, 21] (рис. 1).

Структура OGG1 человека установлена для белка в свободном виде, в комплексе с ДНК, содержащей охоG, AP-сайт или неповрежденное основание G, и в комплексах, моделирующих конформеры, возникающие в ходе реакции [20–29] (PDB-коды: 1EBM, 1FN7, 1HU0, 1KO9, 1LWW, 1LWV, 1LWY, 1M3H, 1M3Q, 1N39, 1N3A, 1N3C, 1YQK, 1YQL, 1YQM, 1YQR, 2I5W, 2NOB, 2NOE, 2NOF, 2NOH, 2NOI, 2NOL, 2NOZ). Однако любые статичные структуры не дают полного понятия о конформационных ансамблях промежуточных ДНК-белковых комплексов в ходе узнавания повреждения. Такую информацию может дать метод молекулярной динамики (МД). Ранее с его помощью был изучен процесс выворачивания поврежденного основания из ДНК ферментом OGG1 [26, 30, 31], поведение основания в активном центре фермента после гидролиза *N*-гликозидной связи [24] и искажения, вносимые в структуру предкаталитического комплекса аминокислотными заменами, стерически блокирующими центр связывания охоG в молекуле фермента [32]. В последнем исследовании было показано, что можно выделить четыре стабильных конформации активного центра, отличающиеся положением и ориентацией каталитических аминокислотных остатков Lys249 и Asp268. Одна из них превалирует в комплексе белка OGG1 дикого типа с ДНК, содержащей пару охоG:С, а остальные преимущественно заселены в неактивных или малоактивных мутантных вариантах белка. В настоящей работе для анализа каталитической компетентности разных конформаций активного центра проведено моделирование фермента OGG1 дикого типа в комплексе с ДНК, содержащей пару охоG:А, из которой охоG удаляется примерно на два порядка хуже по сравнению с оптимальным субстратом охоG:С. Также проведено моделирование фермента дикого типа и мутантных вариантов с заменами, стерически блокирующими центр связывания охоG, в комплексе с ДНК с парой АР:С. Показано, что активность фермента и в этих случаях коррелирует с заселенностью одной из конформаций, которую, таким образом, можно считать каталитически компетентной.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подготовка моделей. Третичная структура комплекса ДНК-гликозилазы OGG1 человека с ДНК (PDB-код 1EBM) включает в себя двуцепочечную ДНК длиной 15 п.н. (рис. 2, а) с парой охоG:С. Основание охоG вывернуто в активный центр фермента и находится в анти-конформации [20]. В исходной структуре отсутствуют восемь *N*-концевых аминокислотных остатков, не включенных в модель, и внутренний участок Gly80-Lys82, который брали из структуры свободного белка OGG1 (PDB-код 1КО9 [23]). Таким образом была получена модель WT-охоG:С. Для получения модели WT-охоG:А атомную структуру нуклеозида dA выравнивали со структурой dC по атомам O4', C1' и N1/N9 с использованием алгоритма Кабша [33] и встраивали в модель вместо dC. Аналогичным образом осуществляли аминокислотные замены: обратную замену Q249К вместо инактивирующей мутации

K249O [20], а также C253I, C253L и O315W. В соответствии с известным механизмом реакции и опубликованными данными моделирования методом QM/MM некоторые аминокислотные остатки моделировали в нестандартных зарядовых состояниях: Cys253 в виде тиолат-аниона, Lys249 с нейтральной є-аминогруппой и Asp268 с нейтральной карбоксильной группой [20, 21, 26]. Замену охо на АР-сайт проводили удалением атомов основания и заменой азота, образующего гликозидную связь, на атом кислорода. Восстановление недостающих атомов водорода и боковых цепей аминокислотных остатков и проверку моделей на отсутствие ошибок построения проводили в автоматическом режиме в программе BioPASED [34].

Молекулярная динамика и анализ траекторий. Точечные заряды и другие параметры силового поля для аминокислотных остатков в нестандартных зарядовых состояниях базировались на соответствующих параметрах из пакета AMBER 99 [35]. Параметры для охо были взяты из работы Perlow-Poehnelt et al. [36], для AP-сайта — предоставлены проф. К. Симмерлингом (Университет штата Нью-Йорк, Стони-Брук, США). Все подготовленные структуры оптимизировали в течение 500 шагов в программе BioPASED методом сопряженных градиентов (алгоритм Флетчера) до достижения значений градиента потенциальной энергии порядка 10<sup>-1</sup> ккал/моль и значений изменения координат порядка 10<sup>-4</sup> Å и затем в течение 150 пс методом МД с постепенным разогревом от 50 до 300 К. Шаг интегрирования составлял 1 фс. Моделирование про-



**Рис.** 2. *а* – Последовательность и нумерация нуклеотидов ДНК-субстрата, использованного для моделирования ( $X^0$  – охоG или AP-сайт);  $\delta$  – критические расстояния и углы в активном центре фермента OGG1, образованные каталитическими остатками Lys249 и Asp268. R – охоG для субстрата, содержащего охоG, или OH для субстрата, содержащего APсайт. Обозначены атомы, между которыми измеряются критические расстояния и углы

водили в рамках канонического NVT-ансамбля. В качестве модели сольватации выбрали модель неявного растворителя, позволяющую реализовать более эффективную выборку в конформационном пространстве благодаря отсутствию динамического трения явных молекул воды [37]. Структуры моделировали В программе BioPASED, использующей силовое поле, производное от ff99SB [34], в течение 10 нс с учетом водородных связей (множитель 2,5) и искусственными ограничениями потенциала силового поля для тяжелых атомов, введенными для стабилизации комплекса белок-ДНК: 0,001 ккал/Å<sup>2</sup> для атомов белка, 0,25 ккал/Å<sup>2</sup> для атомов крайних нуклеотидов ДНК и 0,0025 ккал/Å<sup>2</sup> для остальных атомов ДНК. Для нейтрализации отрицательного заряда системы использовали метод масштабирования зарядов фосфатных групп с множителем 0,2 [38, 39]. Запись координат системы осуществляли каждые 2 пс.

Полученные траектории анализировали с помощью программы MDTRA [40]. Для визуализации траекторий и структур использовали программы VMD [41], RasMol [42] и PyMol («Schrödinger», США). Траектория для модели WT-охоG:С была получена ранее в идентичных условиях [32] и использована для сравнительного анализа без изменений. Анализ времени стабилизации траекторий методом обратного кумулятивного усреднения [43] и кластеризацию моделей проводили при помощи скриптов на языке R, для построения дендрограмм использовали пакет iTOL [44].

Олигонуклеотиды и ферменты. В работе использовали полинуклеотидкиназу фага Т4 («Биосан», Новосибирск) и урацил-ДНК-гликозилазу из E. coli («New England Biolabs», США). Выделение рекомбинантного белка OGG1 дикого типа и его мутантных вариантов и определение концентрации активной формы фермента было описано ранее [32]. Для исследования активности фермента использовали синтезированные в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН олигодезоксирибонуклеотиды: OG23 5'-CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT-3' (X = oxoG);U23 5'-CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT-3' (X = = Ura); C23 5'-AGAGGAAAGGAGCGAAGGGA-GAG-3'. Для получения субстрата в цепи OG23 и U23 вводили радиоактивную метку с использованием у[<sup>32</sup>P]-АТР и полинуклеотидкиназы по стандартной методике [45] и проводили отжиг с двукратным молярным избытком цепи С23. Субстрат с цепью U23 затем обрабатывали в течение 30 мин при 37 °С урацил-ДНК-гликозилазой в буфере, содержавшем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 100 мМ NaCl, 1 мМ этилендиаминтетраацетат натрия и 1 мМ дитиотреитол, и немедленно использовали для проведения реакции.

Определение кинетических параметров реакций, катализируемых ферментом OGG1. Стандартная реакционная смесь содержала 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 100 мМ NaCl, 1 мМ этилендиаминтетраацетат натрия, 1 мМ дитиотреитол, 0,1 мг/мл БСА. Для определения активности фермента OGG1 и его мутантных вариантов использовали 50 нМ субстрат и 1-1000 нМ фермент, реакцию проводили в течение 10 мин при 37 °С. В случае субстрата охоG:С реакцию останавливали добавлением NaOH до концентрации 100 мМ, после чего пробы прогревали в течение 2 мин при 95 °C, нейтрализовали добавлением эквимолярного количества HCl и добавляли равный объем денатурирующего раствора: 80%-ный (v/v) формамид, 20 мМ этилендиаминтетраацетат натрия, 0,1%-ный (w/v) ксиленцианол и 0,1%-ный (w/v) бромфеноловый синий. В случае субстрата АР:С реакцию останавливали добавлением равного объема денатурирующего раствора. Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 20%-ном ПААГ в присутствии 8 М мочевины [45]. Константы скорости реакции  $k_{ex}$  и  $k_{AP}$  определяли в условиях кинетики одного оборота при 13 °С и концентрациях субстрата 10 нМ и фермента 200 нМ, а константу  $k_{\rm cl}$  – в условиях кинетики фазы всплеска при 37 °С и концентрациях субстрата 100 нМ и фермента 5 нМ, как описано ранее [46, 47]. Статистическую достоверность различий между кажущимися константами скорости для разных вариантов оценивали по критерию Стьюдента.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конформационная динамика активного центра фермента OGG1 в комплексе с субстратом охоG:А. В предыдущих работах по моделированию МД комплекса OGG1-ДНК было выявлено, что фермент дикого типа отличается от малоактивных или вовсе неактивных мутантных вариантов C253I, C253L и Q315W по заселенности определенных конформаций активного центра [32] (рис. 2, б). В активном центре фермента OGG1 присутствуют каталитические остатки Lys249, который осуществляет нуклеофильную атаку по атому С1', и Asp268, который удерживает атом О4' поврежденного нуклеотида. Как показывает моделирование методом ОМ/ММ, оба остатка преимущественно существуют в нейтральном зарядовом состоянии [20, 21, 26]. Для активного центра фермента дикого типа характерны значения угла Nζ[Lys249]--C1'[oxoG]-N9[oxoG] в области 75°, оптималь-

ные для нуклеофильной атаки в направлении  $C1' \rightarrow N9$ , а также присутствие протонированной карбоксильной группы Asp268 вблизи О4' и отсутствие ее альтернативной связи с фосфатом с 3'-стороны от поврежденного нуклеотида [32]. Замены C253I, C253L и Q315W уменьшают объем активного центра и вызывают его искажение при связывании охоG. В результате популяция конформеров, характерных для белка дикого типа, значительно снижается (C253I) или полностью исчезает (C253L, Q315W), и преимущественно заселяются конформации с альтернативной связью Asp268 и поворотом Lys249 на ~35° от оптимального угла атаки [32]. Схожие изменения выявляются в статичных структурах и в МД других мутантных вариантов (R46Q, R131Q, R154H, Q315F) со стерически заблокированным активным центром [28, 48], а также в МД при связывании охо G в каталитически неблагоприятной син-конформации [49].

Остается неясным, насколько изменения конформации активного центра, выявленные для трех мутантных вариантов белка, отражают особенности снижения активности фермента OGG1 в других случаях. Для ответа на этот вопрос было проведено исследование МД белка OGG1 дикого типа в комплексе с ДНК, содержащей пару охоG:A (WT-охоG:A), в сравнении с ранее построенной моделью с парой охоG:С (WT-oxoG:C). Фермент OGG1 демонстрирует высокую специфичность к основанию напротив повреждения, предпочитая удалять охоС из пар охоG:C, но не из охоG:A [19, 50]. Нуклеозид dA моделировали в анти-конформации, в которой он существует в паре охоG:А в ДНК [5, 6], поскольку из-за тесного окружения белком основания напротив охоG его вращение вокруг N-гликозидной связи стерически затруднено. Анализ RMSD тяжелых атомов методом обратного кумулятивного усреднения [43] показал, что обе траектории стабилизируются приблизительно к 5 нс, поэтому далее для анализа конформаций в активном центре использовали последние 5 нс.

Модель WT-охоG:А показала низкое отклонение позиций тяжелых атомов, не превышающее 1,6 Å (рис. 3, a,  $\delta$ ). Как и в модели WTохоG:С, основание охоG было вывернуто в карман, образуемый остатками Phe319 и Cys253, и удерживалось водородными связями с Gln315 и Gly42. Модели WT-охоG:А и WT-охоG:С не отличались по своим взаимодействиям с основанием охоG (рис. 4, a).

Контакты аминокислотных остатков Asn149, Arg154 и Arg204 с противоположной цепью ДНК осуществлялись в моделях WT-охоG:С и WTохоG:А похожим образом (рис. 4,  $\delta$ ,  $\theta$ ). В модели WT-охоG:С комплементарный цитозин С<sup>(0)</sup> образовывал водородную связь Об1[Asn149]...N<sup>4</sup>[C<sup>(0)</sup>], a атомы Nn1 и Nn2 остатков Arg154 и Arg204 находились в положениях, позволяющих в разных комбинациях образовывать водородные связи с  $O^2$  и N3  $C^{(0)}$  (рис. 4, б). В модели WT-охоG:А на протяжении всей траектории наблюдалась связь Оδ1[Asn149]...N<sup>6</sup>[A<sup>(0)</sup>], а гуанидиновая группа Arg204 взаимодействовала с N3 и N1 основания А<sup>(0)</sup> либо с образованием водородных связей, либо за счет катион-л-взаимодействий (рис. 4, в). Боковой радикал Arg154 в модели WT-охоG:А отклонялся от А<sup>(0)</sup> и образовывал связи с ДНК с 5'-стороны от него. Однако в целом можно сказать, что белок OGG1 может стабильно взаимодействовать как с С, так и с А напротив охоG. Маловероятно, что дестабилизация взаимодействий с основанием напротив повреждения служит причиной низкой активности фермента OGG1 по отношению к субстратам охоG:А.

Иная картина была выявлена при анализе конформаций каталитических остатков в активном центре (рис. 4, *г*, *д*). Расстояние N $\zeta$ [Lys249]— —C1'[oxoG] в модели WT-охоG:А держалось на ~0,25 Å больше, чем в охоG:С. Угол N $\zeta$ [Lys249]—C1'[oxoG]—N9[oxoG] также стабильно отличался (105° в модели WT-охоG:А против 75° в модели WT-охоG:С). Карбоксильная группа Asp268 в обеих моделях находилась вблизи O4'. Это позволяет сделать вывод, что решающим параметром, снижающим активность фермента OGG1 при наличии А напротив повреждения, служит неблагоприятная ориентация аминогруппы Lys249.

Конформационная динамика активного центра фермента OGG1 в комплексе с субстратами, содержащими АР-сайт. Аминокислотные замены, которые стерически затрудняют связывание охоG в предназначенном для этого кармане в структуре белка OGG1, приводят к искажению активного центра в области каталитических остатков Lys249 и Asp268 и инактивации фермента [28, 32, 48]. Замещение охоG на AP-сайт должно приводить к появлению дополнительного свободного пространства для объемных заместителей, образующих стенки активного центра. Можно ожидать, что активность мутантных вариантов на таком субстрате должна снижаться в меньшей степени. Для проверки этой гипотезы было проведено моделирование МД комплексов такой ДНК с ферментом дикого типа (модель WT-AP) и тех же самых мутантных вариантов (модели C253I-AP, C253L-AP и Q315W-AP). Напротив повреждения во всех случаях находилось основание С. Все модели в целом уравновешивались к 7–7,5 нс (рис. 3, в–к). Среднеквадратичное отклонение позиций тяжелых атомов остова белка и ДНК не превышало 1,8 Å. Одна-

ко из-за отсутствия охоG активный центр фермента был более мобильным (рис. 3,  $\mathcal{m}-\kappa$ ).

В структуре комплекса WT-охоG:С и основанных на ней моделях МД вывернутое из ДНК основание охоG зажато между ароматическим кольцом остатка Phe319 и боковым радикалом остатка Cys253 и стабилизировано водородными связями O[Gly42]...N7[охоG<sup>0</sup>], Oɛ1[Gln315]...N1[охоG<sup>0</sup>] и



**Рис. 3.** Среднеквадратичное отклонение положений атомов в ходе моделирования. Расчет проводили по всем тяжелым атомам (C, N, O и P) полипептидного и нуклеотидного остова (a-e) или по всем тяжелым атомам остатков Lys249, Asp268 и AP<sup>0</sup> ( $\mathcal{K}-\kappa$ ). Названия моделей приведены на графиках. Светлыми линиями показаны графики скользящего среднего по 50 точкам

б

Arg204

Arg154



2 V Vys249 Asp268

NH<sub>2</sub>

Gln315

NH<sub>2</sub>

oxoG:C 2,97 Å oxoG:A 2,98 Å

oxoG:C 3,06 Å oxoG:A 3,03 Å

12

а

oxoG:C 3,08 Å oxoG:A 3,03 Å

0

Gly42

dŔ



**Puc. 4.** Структура и динамика активного центра фермента OGG1 в комплексе с субстратом охоG:A. a – Схема взаимодействия аминокислотных остатков белка OGG1 с основанием охоG. Указаны средние значения расстояний между атомами N и O, образующими водородную связь, в ходе MД;  $\delta$  – взаимодействия белка OGG1 с основанием C напротив повреждения, выявленные методом рентгеноструктурного анализа в структуре 1EBM [20]; e – взаимодействия белка OGG1 с основанием A напротив повреждения, выявленные в ходе MД. Указаны расстояния в ангстремах, соответствующие возможному образованию водородной связи; e – репрезентативные структуры из траекторий WT-охоG:C (атомы углерода показаны черным цветом) и WT-охоG:A (атомы углерода показаны белым), иллюстрирующие взаимное расположение каталитических остатков Lys249 и Asp268 и поврежденного нуклеотида охоG<sup>0</sup>. Стрелкой отмечен поворот ε-аминогруппы остатка Lys249;  $\partial$  – значения расстояния Nζ[Lys249]–C1′[охоG<sup>0</sup>] и угла Nζ[Lys249]–C1′[охоG<sup>0</sup>] для моделей бел-ка OGG1 в комплексе с субстратом охоG:C (черные точки) и охоG:A (серые точки). Линии соответствующих цветов отмеченов моде.

Оє1[Gln315]...N<sup>2</sup>[охоG<sup>0</sup>] (рис. 4, *a*). Во всех моделях, содержащих AP-сайт, эти взаимодействия отсутствуют, и остатки активного центра проявляют значительно бо́льшую подвижность. Остатки Leu253 и Ile253 в моделях C253L-AP и C253I-AP выдвигаются в активный центр, однако, не находя преграды в виде охоG, не приводят к его деформации (рис. 5, *a*). Контакты с противоположной цепью ДНК, не содержащей AP-сайта, в целом соответствовали тем, что наблюдались в модели WT-охоG:C.

Несмотря на отсутствие деформации активного центра, в моделях с АР-сайтом каталитически важные аминокислотные остатки Lys249 и Asp268 фиксировались вблизи поврежденного нуклеотида хуже, чем в модели WT-охоG:С, что согласуется с меньшей активностью фермента в отношении AP-субстратов [19]. Это было в большей степени характерно для мутантных вариантов фермента: в моделях C253I-AP и C253L-AP остаток Asp268 часто взаимодействовал с O1P[dG<sup>-1</sup>], теряя контакт с O4' AP-сайта в



Рис. 5. Структура и динамика активного центра фермента OGG1 в комплексе с субстратом AP:С. *а* – Репрезентативные структуры из траекторий WT-AP (атомы углерода показаны белым цветом) и C253I-AP (атомы углерода показаны черным), иллюстрирующие взаимное расположение каталитических остатков Lys249, Asp268 и AP-сайта;  $\delta$  – кластеризация моделей по значениям расстояний Nζ[Lys249]–C1'[AP<sup>0</sup>], Oδ2[Asp268]–O4'[AP<sup>0</sup>] и Oδ2[Asp268]–O1P[dG<sup>-1</sup>] в пространстве Махаланобиса. Числа соответствуют длинам ветвей дендрограммы

последние 2-2,5 нс. Вариант Q315W-AP демонстрировал более стабильную динамику, в целом соответствующую поведению модели дикого типа. Угол атаки аминогруппы Lys249 в случае АРсайта не играет критической роли, т.к. из-за эпимеризации полуацетальный гидроксил при атоме С1' не имеет однозначной пространственной ориентации. Однако каталитически значимым остается расстояние Nζ[Lys249]-C1'[AP<sup>0</sup>], которое вследствие повышенной мобильности активного центра сильно флуктуировало во всех моделях, содержащих АР-сайт [32]. Таким образом, для анализа были выбраны три каталитически значимых расстояния: N<sub>2</sub>[Lys249]-C1'[AP<sup>0</sup>], Об2[Asp268]-О4'[AP<sup>0</sup>] и Об2[Asp268]-О1Р[dG<sup>-1</sup>]. Для минимизации эффектов избыточной подвижности остатков в отсутствие азотистого основания рассматривались более стабильные последние 2,5 нс динамики. Распределение популяций этих расстояний показало, что благоприятная для катализа конформация складывается главным образом в модели дикого типа (рис. 6, a-e), где расстояние между атомом C1' АР-сайта и аминогруппой Lys249 лежит в области < 3,5 Å. В модели C253I-AP (рис. 6, *г*-*e*) при общем увеличении этого расстояния (~5,5 Å) возникала стабильная водородная связь между Аѕр268 и фосфатной группой dG<sup>-1</sup>, поэтому предположительно активность этого мутанта в отношении субстратов, содержащих AP-сайт, будет снижена в наибольшей степени. Популяция конформаций модели C253L-AP распадалась на два выраженных кластера по ориентации Asp268 (рис. 6,  $\mathcal{m}-u$ ), а в модели Q315W-AP, напротив, была довольно компактной (рис. 6,  $\mathcal{m}-m$ ). Расстояние N $\zeta$ (Lys249)–C1'[AP<sup>0</sup>] в обоих случаях составляло в среднем 4,5 Å. Таким образом, расположение каталитически важной аминогруппы Lys249 в активном центре фермента OGG1 оказывается решающим и в случае субстратов, содержащих AP-сайт.

На основе трех указанных физических расстояний была проведена кластеризация моделей для определения их схожести друг с другом (рис. 5,  $\delta$ ). Для оценки дистанции между моделями использовали расстояние между центрами распределений в евклидовом пространстве, расстояние Махаланобиса (расстояние между центрами распределений с учетом корреляции между переменными) и расстояние Ходжеса–Лемана (медиана попарных расстояний между всеми точками двух выборок). Во всех случаях модели C253L-AP и Q315W-AP были ближе всего друг к другу, а модель C253I-AP отстояла дальше всего

от них и от модели дикого типа. В целом результаты моделирования позволяют предположить, что в отношении субстратов, содержащих АРсайт, активность мутантных вариантов будет выше, чем в отношении субстратов с охоG, а активность вариантов C253L и Q315W – выше, чем активность C253I.

Кинетические параметры реакции, катализируемой мутантными вариантами фермента OGG1. Для оценки влияния замен аминокислотных ос-



**Рис. 6.** Гистограммы распределения значений расстояний Nζ[Lys249]–С1'[AP<sup>0</sup>] (*a*, *ε*, *ж*, *κ*), Oδ2[Asp268]–O4'[AP<sup>0</sup>] (*б*, *d*, *s*, *n*) и Oδ2[Asp268]–O1P[dG<sup>-1</sup>] (*θ*, *e*, *u*, *m*) для моделей WT-AP (*a*–*θ*), C253I-AP (*ε*–*e*), C253L-AP (*ж*–*u*) и Q315W-AP (*κ*–*m*)



**Рис. 7.** Активность вариантов фермента OGG1. *a* – Расщепление субстрата, содержащего пару охоG:C; *б* – расщепление субстрата, содержащего пару AP:C. Графики построены по данным трех независимых экспериментов

татков в активном центре фермента OGG1 на его активность были получены и выделены в чистом виде варианты белка, несущие замены C253I, C253L и Q315W. Как и ожидалось, они обладали заметно сниженной активностью по отношению к удалению охоG из ДНК (рис. 7, *a*; табл. 1).

Фермент OGG1 последовательно катализирует реакцию гидролиза N-гликозидной связи и  $\beta$ -элиминирования, при этом второй этап реакции протекает намного медленнее первого [19, 46, 47, 51]. В связи с этим в литературе кинетический механизм действия фермента OGG1 обычно описывают двухступенчатой схемой, в которой скорость реакции лимитируется последней стадией:

$$E + S \underset{k_{1}}{\stackrel{k_{1}}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{ex}} EP1 \xrightarrow{k_{el}} E + P2.$$

Константа  $k_{ex}$  в данном случае отражает скорость гидролиза N-гликозидной связи, а константа k<sub>cl</sub> представляет собой комбинированный параметр скорости β-элиминирования и распада фермент-субстратного комплекса. Для фермента дикого типа измеренные значения  $k_{ex}$  и  $k_{cl}$ составляли  $(9,7\pm0,9) \times 10^{-2}$  мин<sup>-1</sup> и  $(0,5\pm0,1) \times$  $\times~10^{-2}~{\rm ми}{\rm H}^{-1}$  соответственно, что согласуется с литературными данными. Замены C253I и C253L примерно на порядок снижали значение  $k_{\rm ex}$  (табл. 1), а замена Q315W приводила к полной инактивации фермента. Такие последствия вполне ожидаемы для мутаций, мешающих связыванию охоG в активном центре фермента. Влияние замен на  $k_{cl}$  было менее выраженным, однако эта константа также снижалась примерно в 5 раз (табл. 1). Очевидно, конформационные искажения, возникающие из-за стерических взаимодействий охоG с объемными группами, влияют и на эффективность реакции β-элиминирования. Интересно, что в качестве возможного акцептора для уходящего в реакции βэлиминирования протона при С2' ряд авторов рассматривает само основание охоG, удерживаемое в активном центре фермента в анионной

Таблица 1. Значения кажущихся констант скоростей последовательных стадий реакции расщепления ферментом OGG1 ДНК-субстрата, содержащего пару охоG:С

Варианты фермента	$k_{ m ex}$ , мин $^{-1}$	$k_{\rm ex}$ (мутант) : $k_{\rm ex}$ (WT)	$k_{ m c1}$ , мин $^{-1}$	$k_{c1}$ (мутант) : $k_{c1}$ (WT)
OGG1 WT	$(9,7\pm0,9)  imes 10^{-2}$	1	$(0,5\pm0,1) imes 10^{-2}$	1
C253I	$(0,90\pm0,05) imes10^{-2}$	$0,09\pm0,01$	$(0,11\pm0,06) imes10^{-2}$	$0,2 \pm 0,1$
C253L	$(1,3\pm0,1)  imes 10^{-2}$	$0,13\pm0,01$	$(0,11\pm0,07) imes10^{-2}$	$0,2 \pm 0,1$
Q315W	нет реакции	-	нет реакции	-

форме после первой стадии реакции [24]. В таком случае эффективность  $\beta$ -элиминирования может снижаться не только за счет конформационных искажений дезоксирибозы в активном центре, но и из-за снижения сродства свободного охоG к белку OGG1.

При наличии в ДНК-субстрате АР-сайта активность мутантных вариантов была также снижена, но в меньшей степени, чем в случае субстрата с охоG (рис. 7, б; табл. 2). Реакция в этом случае сводится только к процессу β-элиминирования, причем, очевидно, акцептором протона не может выступать выщепленное основание охоG. Кажущаяся константа  $k_{\rm AP}$ , определенная методом кинетики одного оборота, в этом случае имеет физический смысл константы скорости реакции β-элиминирования, не осложненной высвобождением продукта. Замены C253I, C253L и Q315W оказывали небольшое влияние на значение  $k_{\rm AP}$ , снижая его примерно вдвое (табл. 2), что согласуется с отсутствием необходимости связывания основания в активном центре. Для фермента дикого типа и вариантов C253I и C253L эти значения были в 2,4–5,0 раз выше, чем k<sub>cl</sub> для охоG-субстратов, что свидетельствует о вкладе как β-элиминирования, так и распада фермент-субстратного комплекса в комбинированную константу k<sub>cl</sub> при наличии поврежденного основания в субстрате.

Как видно из рис. 7 и табл. 1 и 2, активность мутантных вариантов фермента OGG1 в отношении АР-субстратов была выше, чем в отношении охоG-субстратов. Это согласуется с данными по активности других бифункциональных ДНК-гликозилаз, для которых замены в активном центре зачастую полностью подавляют ДНК-гликозилазную активность, но практически не затрагивают АР-лиазную активность, несмотря на участие в катализе одних и тех же аминокислотных остатков [52, 53]. Такая разница в последствиях аминокислотных замен обычно объясняется частичным внеспиральным расположением АР-сайта и пластичностью активного центра ферментов. Также можно заметить, что относительная активность разных мутантных вариантов фермента OGG1 в отношении охоG- и AP-субстратов различалась: для охоG-субстратов активность мутантных варипорядке антов можно расположить в C253L ≥ C253I >> Q315W, а для АР-субстратов – в порядке Q315W > C253L ≥ C253I. Для обоих субстратов константы скорости для C253L и C253I достоверно не отличались друг от друга. В случае Q315W с AP-субстратом значение  $k_{AP}$ было достоверно выше, чем для C253I (p < 0,01). Относительная активность достаточно хорошо согласуется с заселенностью популяций конТаблица 2. Значения кажущейся константы скорости реакции расщепления ферментом OGG1 ДНК-субстрата, содержащего пару АР:С

Варианты фермента	$k_{\rm AP}$ , мин <sup>-1</sup>	$k_{\rm AP}$ (мутант): $k_{\rm AP}$ (WT)
OGG1 WT	$(1,2\pm0,1)\times10^{-2}$	1
C253I	$(0,48\pm0,05)\times10^{-2}$	$0,\!40\pm0,\!05$
C253L	$(0,55\pm0,09)\times10^{-2}$	$0,46\pm0,08$
Q315W	$(0,71\pm0,07)\times10^{-2}$	$0,59\pm0,08$

формеров, выгодных для катализа, что можно считать частичным экспериментальным под-тверждением результатов МД.

Таким образом, молекулярно-динамическое исследование белка OGG1 в комплексе с различными субстратными ДНК позволяет предположить, что заселенность популяций каталитически компетентных конформеров остатков Lys249 и Asp268 служит одним из главных факторов, определяющих его ферментативную активность. В этом отношении ДНК-гликозилаза OGG1 человека оказывается схожей с бактериальной 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилазой Fpg, несмотря на отсутствие гомологии этих белков на уровне как первичной, так и третичной структуры. В случае Fpg основными параметрами активного центра, способствующими эффективному катализу, оказываются конформации остатков Pro1 и Glu2, выполняющих те же функции, что и Lys249 и Asp268 у фермента OGG1 [54, 55]. Результаты работы согласуются с сообщениями в литературе о том, что и мутации, препятствующие продуктивному связыванию охо G в кармане внутри белковой глобулы OGG1, и связывание охоG в неблагоприятной ориентации вызывают конформационные изменения, которые распространяются более чем на 10 А и достигают каталитических аминокислотных остатков [48, 49]. Определение критических для катализа расстояний и углов позволяет использовать геометрию активного центра для предсказания активности природных вариантов белка OGG1, что может оказаться важным для предсказания индивидуального риска развития онкологических заболеваний и ответа опухолей на химио- и радиотерапию, повреждающую ДНК. Исследования в этом направлении в данный момент продолжаются.

Финансирование. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 18-74-00052 (моделирование, ферментативная кинети-ка) и частично проектами базового бюджетного

финансирования ПФНИ ГАН 2013–2020 № АА-АА-А17-117020210023-1 (синтез олигонуклеотидов, выделение части белков) и Минобрнауки России (проект 6.5773.2017/ВУ, анализ данных).

Благодарности. Расчеты выполняли на суперкомпьютерном кластере НКС-30Т Сибирского суперкомпьютерного центра СО РАН. Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Von Sonntag, C. (2006) *Free-radical-induced DNA damage and its repair: a chemical perspective*, Springer, Berlin–Heidelberg.
- 2. Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free radicals in biology and medicine*, 4th ed., Oxford University Press, Oxford.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., and Ellenberger, T. (2006) *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington, D.C.
   Culp, S.J., Cho, B.P., Kadlubar, F.F., and Evans, F.E.
- Culp, S.J., Cho, B.P., Kadlubar, F.F., and Evans, F.E. (1989) Structural and conformational analyses of 8hydroxy-2'-deoxyguanosine, *Chem. Res. Toxicol.*, 2, 416–422, doi: 10.1021/tx00012a010.
- Kouchakdjian, M., Bodepudi, V., Shibutani, S., Eisenberg, M., Johnson, F., Grollman, A.P., and Patel, D.J. (1991) NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7*H*-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7*H*-dG(*syn*) • dA(*anti*) alignment at lesion site, *Biochemistry*, **30**, 1403–1412, doi: 10.1021/bi00219a034.
- McAuley-Hecht, K.E., Leonard, G.A., Gibson, N.J., Thomson, J.B., Watson, W.P., Hunter, W.N., and Brown, T. (1994) Crystal structure of a DNA duplex containing 8hydroxydeoxyguanine-adenine base pairs, *Biochemistry*, 33, 10266–10270, doi: 10.1021/bi00200a006.
- Lipscomb, L.A., Peek, M.E., Morningstar, M.L., Verghis, S.M., Miller, E.M., Rich, A., Essigmann, J.M., and Williams, L.D. (1995) X-Ray structure of a DNA decamer containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 719–723, doi: 10.1073/pnas.92.3.719.
- Shibutani, S., Takeshita, M., and Grollman, A.P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature*, **349**, 431–434, doi: 10.1038/349431a0.
- Grollman, A.P., and Moriya, M. (1993) Mutagenesis by 8oxoguanine: an enemy within, *Trends Genet.*, 9, 246–249, doi: 10.1016/0168-9525(93)90089-Z.
- ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage), Gedik, C.M., and Collins, A. (2005) Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study, *FASEB J.*, **19**, 82–84, doi: 10.1096/fj.04-1767fje.
- Atamna, H., Cheung, I., and Ames, B.N. (2000) A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent changes in base excision repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 686–691, doi: 10.1073/pnas.97.2.686.
- Auffret van der Kemp, P., Thomas, D., Barbey, R., de Oliveira, R., and Boiteux, S. (1996) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *OGG1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-*N*-methylformamidopyrimidine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5197–5202, doi: 10.1073/pnas.93.11.5197.
- Rosenquist, T.A., Zharkov, D.O., and Grollman, A.P. (1997) Cloning and characterization of a mammalian 8-

oxoguanine DNA glycosylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7429–7434, doi: 10.1073/pnas.94.14.7429.

- Radicella, J.P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M.S., and Boiteux, S. (1997) Cloning and characterization of *hOGG1*, a human homolog of the *OGG1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8010–8015, doi: 10.1073/pnas.94.15.8010.
- Roldan-Arjona, T., Wei, Y.-F., Carter, K.C., Klungland, A., Anselmino, C., Wang, R.-P., Augustus, M., and Lindahl, T. (1997) Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8016–8020, doi: 10.1073/pnas.94.15.8016.
- Tchou, J., Kasai, H., Shibutani, S., Chung, M.-H., Laval, J., Grollman, A.P., and Nishimura, S. (1991) 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 4690–4694, doi: 10.1073/pnas.88.11.4690.
- Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J., and Dizdaroglu, M. (1992) Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization, *Biochemistry*, **31**, 106–110, doi: 10.1021/bi00116a016.
- Nash, H.M., Lu, R., Lane, W.S., and Verdine, G.L. (1997) The critical active-site amine of the human 8-oxoguanine DNA glycosylase, hOgg1: direct identification, ablation and chemical reconstitution, *Chem. Biol.*, 4, 693–702, doi: 10.1016/S1074-5521(97)90225-8.
- Zharkov, D.O., Rosenquist, T.A., Gerchman, S.E., and Grollman, A.P. (2000) Substrate specificity and reaction mechanism of murine 8-oxoguanine-DNA glycosylase, *J. Biol. Chem.*, 275, 28607–28617, doi: 10.1074/jbc.M002441200.
- Bruner, S.D., Norman, D.P.G., and Verdine, G.L. (2000) Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA, *Nature*, 403, 859–866, doi: 10.1038/35002510.
- 21. Norman, D.P.G., Chung, S.J., and Verdine, G.L. (2003) Structural and biochemical exploration of a critical amino acid in human 8-oxoguanine glycosylase, *Biochemistry*, **42**, 1564–1572, doi: 10.1021/bi026823d.
- 22. Norman, D.P.G., Bruner, S.D., and Verdine, G.L. (2001) Coupling of substrate recognition and catalysis by a human base-excision DNA repair protein, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 359–360, doi: 10.1021/ja003144m.
- Bjoras, M., Seeberg, E., Luna, L., Pearl, L.H., and Barrett, T.E. (2002) Reciprocal "flipping" underlies substrate recognition and catalytic activation by the human 8-oxo-guanine DNA glycosylase, *J. Mol. Biol.*, **317**, 171–177, doi: 10.1006/jmbi.2002.5400.
- Fromme, J.C., Bruner, S.D., Yang, W., Karplus, M., and Verdine, G.L. (2003) Product-assisted catalysis in baseexcision DNA repair, *Nat. Struct. Biol.*, 10, 204–211, doi: 10.1038/nsb902.
- 25. Chung, S.J., and Verdine, G.L. (2004) Structures of end products resulting from lesion processing by a DNA glyco-

sylase/lyase, *Chem. Biol.*, **11**, 1643–1649, doi: 10.1016/j.chembiol.2004.09.014.

- Banerjee, A., Yang, W., Karplus, M., and Verdine, G.L. (2005) Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA, *Nature*, 434, 612–618, doi: 10.1038/nature03458.
- Banerjee, A., and Verdine, G.L. (2006) A nucleobase lesion remodels the interaction of its normal neighbor in a DNA glycosylase complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 15020–15025, doi: 10.1073/pnas.0603644103.
- Radom, C.T., Banerjee, A., and Verdine, G.L. (2007) Structural characterization of human 8-oxoguanine DNA glycosylase variants bearing active site mutations, *J. Biol. Chem.*, 282, 9182–9194, doi: 10.1074/jbc.M608989200.
- 29. Lee, S., Radom, C.T., and Verdine, G.L. (2008) Trapping and structural elucidation of a very advanced intermediate in the lesion-extrusion pathway of hOGG1, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 7784–7785, doi: 10.1021/ja800821t.
- Crenshaw, C.M., Nam, K., Oo, K., Kutchukian, P.S., Bowman, B.R., Karplus, M., and Verdine, G.L. (2012) Enforced presentation of an extrahelical guanine to the lesion recognition pocket of human 8-oxoguanine glycosylase, hOGG1, *J. Biol. Chem.*, 287, 24916–24928, doi: 10.1074/jbc.M111.316497.
- Li, H., Endutkin, A.V., Bergonzo, C., Fu, L., Grollman, A.P., Zharkov, D.O., and Simmerling, C. (2017) DNA deformation-coupled recognition of 8-oxoguanine: conformational kinetic gating in human DNA glycosylase, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 2682–2692, doi: 10.1021/jacs.6b11433.
- Lukina, M.V., Popov, A.V., Koval, V.V., Vorobjev, Y.N., Fedorova, O.S., and Zharkov, D.O. (2013) DNA damage processing by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase mutants with the occluded active site, *J. Biol. Chem.*, 288, 28936–28947, doi: 10.1074/jbc.M113.487322.
- Kabsch, W. (1976) A solution for the best rotation to relate two sets of vectors, *Acta Crystallogr. A*, **32**, 922–923, doi: 10.1107/S0567739476001873.
- 34. Попов А.В., Воробьев Ю.Н. (2010) Программа GUI-ВіоРАЅЕД для моделирования молекулярной динамики биополимеров с графическим пользовательским интерфейсом, *Молекулярная биология*, **44**, 735–742, doi: 10.1134/S0026893310040217.
- Case, D.A., Darden, T.A., Cheatham, T.E., III, Simmerling, C.L., Wang, J., Duke, R.E., Luo, R., Walker, R.C., Zhang, W., Merz, K.M. et al. (2012) *AMBER 12*, University of California, San Francisco.
   Perlow-Poehnelt, R.A., Zharkov, D.O., Grollman, A.P.,
- Perlow-Poehnelt, R.A., Zharkov, D.O., Grollman, A.P., and Broyde, S. (2004) Substrate discrimination by formamidopyrimidine-DNA glycosylase: distinguishing interactions within the active site, *Biochemistry*, 43, 16092–16105, doi: 10.1021/bi048747f.
- Vorobjev, Y.N. (2011) Advances in implicit models of water solvent to compute conformational free energy and molecular dynamics of proteins at constant pH, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, **85**, 281–322, doi: 10.1016/B978-0-12-386485-7.00008-9.
- Manning, G.S. (1978) The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides, *Q. Rev. Biophys.*, **11**, 179–246, doi: 10.1017/s0033583500002031.
- Ravishanker, G., Auffinger, P., Langley, D.R., Jayaram, B., Young, M.A., and Beveridge, D.L. (1997) Treatment of counterions in computer simulations of DNA, *Rev. Comput. Chem.*, **11**, 317–372, doi: 10.1002/ 9780470125885.ch6.
- Popov, A.V., Vorobjev, Y.N., and Zharkov, D.O. (2013) MDTRA: a molecular dynamics trajectory analyzer with a graphical user interface, *J. Comput. Chem.*, 34, 319–325, doi: 10.1002/jcc.23135.

- 41. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, **14**, 33–38, doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- Sayle, R.A., and Milner-White, E.J. (1995) RASMOL: biomolecular graphics for all, *Trends Biochem. Sci.*, 20, 374–376, doi: 10.1016/S0968-0004(00)89080-5.
- Yang, W., Bitetti-Putzer, R., and Karplus, M. (2004) Free energy simulations: use of reverse cumulative averaging to determine the equilibrated region and the time required for convergence, J. Chem. Phys., 120, 2618–2628, doi: 10.1063/1.1638996.
- Letunic, I., and Bork, P. (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees, *Nucleic Acids Res.*, 44, W242–W245, doi: 10.1093/nar/gkw290.
- 45. Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sidorenko, V.S., Nevinsky, G.A., and Zharkov, D.O. (2007) Mechanism of interaction between human 8oxoguanine-DNA glycosylase and AP endonuclease, *DNA Repair*, 6, 317–328, doi: 10.1016/j.dnarep.2006.10.022.
- Sidorenko, V.S., Mechetin, G.V., Nevinsky, G.A., and Zharkov, D.O. (2008) Ionic strength and magnesium affect the specificity of *Escherichia coli* and human 8-oxoguanine-DNA glycosylases, *FEBS J.*, 275, 3747–3760, doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06521.x.
- Anderson, P.C., and Daggett, V. (2009) The R46Q, R131Q and R154H polymorphs of human DNA glycosylase/βlyase hOgg1 severely distort the active site and DNA recognition site but do not cause unfolding, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 9506–9515, doi: 10.1021/ja809726e.
- Sowlati-Hashjin, S., and Wetmore, S.D. (2018) Structural insight into the discrimination between 8-oxoguanine glycosidic conformers by DNA repair enzymes: a molecular dynamics study of human oxoguanine glycosylase 1 and formamidopyrimidine-DNA glycosylase, *Biochemistry*, 57, 1144–1154, doi: 10.1021/acs.biochem.7b01292.
- Bjoras, M., Luna, L., Johnsen, B., Hoff, E., Haug, T., Rognes, T., and Seeberg, E. (1997) Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites, *EMBO J.*, 16, 6314–6322, doi: 10.1093/emboj/16.20.6314.
- Kuznetsov, N.A., Koval, V.V., Zharkov, D.O., Nevinsky, G.A., Douglas, K.T., and Fedorova, O.S. (2005) Kinetics of substrate recognition and cleavage by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase, *Nucleic Acids Res.*, 33, 3919–3931, doi: 10.1093/nar/gki694.
- Zharkov, D.O., Golan, G., Gilboa, R., Fernandes, A.S., Gerchman, S.E., Kycia, J.H., Rieger, R.A., Grollman, A.P., and Shoham, G. (2002) Structural analysis of an *Escherichia coli* endonuclease VIII covalent reaction intermediate, *EMBO J.*, 21, 789–800, doi: 10.1093/emboj/21.4.789.
- Li, H., Endutkin, A.V., Bergonzo, C., Campbell, A.J., de los Santos, C., Grollman, A., Zharkov, D.O., and Simmerling, C. (2016) A dynamic checkpoint in oxidative lesion discrimination by formamidopyrimidine–DNA glycosylase, *Nucleic Acids Res.*, 44, 683–694, doi: 10.1093/ nar/gkv1092.
- 54. Sowlati-Hashjin, S., and Wetmore, S.D. (2014) Computational investigation of glycosylase and  $\beta$ -lyase activity facilitated by proline: applications to FPG and comparisons to hOgg1, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 14566–14577, doi: 10.1021/jp507783d.
- Popov, A.V., Endutkin, A.V., Vorobjev, Y.N., and Zharkov, D.O. (2017) Molecular dynamics simulation of the oppositebase preference and interactions in the active site of formamidopyrimidine-DNA glycosylase, *BMC Struct. Biol.*, 17, 5, doi: 10.1186/s12900-017-0075-y.

## CATALYTICALLY COMPETENT CONFORMATIONS OF THE ACTIVE SITE OF HUMAN 8-OXOGUANINE-DNA GLYCOSYLASE\*

A. V. Popov<sup>1\*\*</sup>, A. V. Yudkina<sup>1,2</sup>, Yu. N. Vorobjev<sup>1</sup>, and D. O. Zharkov<sup>1,2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: apopov@niboch.nsc.ru, dzharkov@niboch.nsc.ru

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia

Received April 15, 2019 Revised November 9, 2019 Accepted November 9, 2019

8-Oxoguanine-DNA *N*-glycosylase (OGG1) is a eukaryotic DNA repair enzyme responsible for the removal of 8-oxoguanine (oxoG), one of the most abundant oxidative DNA lesions. OGG1 catalyzes two consecutive reactions, i.e., *N*-glycosidic bond hydrolysis (DNA glycosylase activity) and DNA strand cleavage 3' to the lesion by  $\beta$ -elimination (lyase activity). The enzyme also possesses the lyase activity on substrates containing apurinic/apyrimidinic (AP) sites (base-free deoxyribose moieties). OGG1 is highly specific to a base opposite the lesion, efficiently excising oxoG and cleaving AP sites located opposite C but not opposite A. The enzyme activity is also profoundly decreased by amino acid substitutions that sterically interfere with binding of oxoG, everted from the DNA helix, in the enzyme active center. Earlier, the molecular dynamics approach was used to study conformational dynamics of such human OGG1 mutants complexed with substrate DNA containing oxoG:C pair. It was suggested that the enzyme activity depends on population density of certain conformers of two OGG1 catalytic residues, Lys249 and Asp268. Here we report the results of the molecular dynamics study of human OGG1 complexed with DNA containing oxoG:A pair and OGG1 mutants complexed with DNA containing AP:C pair. We found that low enzyme activity is associated with a decrease in the populations of certain conformers of Lys249 and Asp268 with optimal configuration for catalysis. The experimentally measured rate constants for OGG1 mutants show a good agreement with the models. We conclude that the population density of catalytically competent conformations of Lys249 and Asp268 in the OGG1 active site is the major determinant of its enzymatic activity.

Keywords: DNA damage, DNA repair, 8-oxoguanine-DNA N-glycosylase, substrate specificity

УДК 577.1

# ТИМОХИНОН ВЫЗЫВАЕТ ПОВРЕЖДЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ И ГИБЕЛЬ ЗЕРНИСТЫХ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА\*

© 2020 Е.В. Стельмашук<sup>1</sup>, Н.С. Четвериков<sup>2</sup>, С.А. Голышев<sup>3</sup>, Е.Е. Генрихс<sup>1</sup>, Н.К. Исаев<sup>1,2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Научный центр неврологии, 125367 Москва, Россия <sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: nisaev61@mail.ru

<sup>3</sup> НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова 119991 Москва, Россия

> Поступила в редакцию 11.07.2019 После доработки 11.11.2019 Принята к публикации 13.11.2019

Тимохинон (TQ) обладает широким спектром биологической активности. Большинство исследований, направленных на изучение нейротоксического действия TQ, проводится на моделях раковых клеточных линий. Данная работа проведена для определения токсических концентраций TQ в первичных культурах нейронов. Показано, что добавление 0,04–0,05 мМ TQ на 24 ч индуцировало дозозависимую гибель культивированных зернистых нейронов мозжечка (K3H). Используя CellROX Green и MitoSOX Red, обнаружено, что гибели клеток предшествует увеличение образования свободных радикалов. Конфокальная и электронная микроскопия показали, что добавление 0,05 мМ TQ в течение 5 ч индуцировало необычное изменение локализации митохондрий в клетке, увеличение размеров этих органелл и набухание клеток. Антиоксидант N-ацетил-L-цистеин (NAC, 2 мМ) значимо защищал K3H от этого токсического действия. В совокупности полученные данные порволяют предположить, что TQ может быть токсичным для нормальных нейронов, а ROS-зависимые процессы изменения митохондрий являются одной из основных причин повреждения и смерти нейронов, вызванной тимохиноном.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** тимохинон, митохондрия, зернистые нейроны мозжечка, *N*-ацетил-L-цистеин. **DOI:** 10.31857/S0320972520020074

Тимохинон (2-метил-5-изопропил-1,4-бензохинон, TQ) был определен как один из основных компонентов и активный ингредиент в масле семян *Nigella sativa* [1]. Этот хинон обладает широким спектром положительной биологической активности, такой как иммуностимулирующая, противовоспалительная и антимутагенная [2–4]. Тимохинон способен инактивировать супероксид, гидроксил радикал и молекулы синглетного кислорода [5]. Показано, что TQ оказывает защитное действие посредством ингибирования процесса перекисного окисления липидов при ишемическом/реперфузионном повреждении гиппокампа крысы [6], а также защищает культивированные первичные нейроны крысы от нейротоксичности, вызванной бетаамилоидом (Абета) [7], путем снижения дисфункции митохондрий, ингибируя окислительный стресс [8]. Обнаружено, что TQ защищает культивированные клетки SH-SY5Y и гиппокампа крысы от цитотоксичности, индуцированной мышьяком, снижая дисфункцию митохондрий [9, 10], а также первичную мезенцефальную клеточную культуру от дофаминергической гибели клеток, вызванной 1-метил-4-фенилпиридинием [11]. Кроме того, митохондриально-направленные антиоксиданты, содержащие тимохинон, обладают нейропротекторными свойствами [12, 13]. Существует растущий интерес к терапевтическому потенциалу ТО в различных областях исследований, особенно в терапии рака. Недавние исследования показали, что TQ проявляет цитотоксичность для нескольких линий раковых клеток [14-16], в том числе полученных из нервной ткани [17-20]. Окислительные или антиоксидантные эффекты TQ зависят от его концентрации. TQ (как хинон) может быть восстановлен различными редуктазами, образуя

Принятые сокращения: TQ – тимохинон; K3H – культивированные зернистые нейроны; NAC – *N*-ацетил-L-цистеин; ROS – активные формы кислорода.

<sup>\*</sup> Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio. msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM19-215, 23.12.2019.

<sup>\*\*</sup> Адресат для корреспонденции.

семихинон или тимогидрохинон. Как сообщалось, последняя молекула обладает антиоксидантным действием, в то же время семихинон действует как прооксидант путем генерации активных форм кислорода (ROS) [14, 21]. Видимо, ТО индуцирует апоптотическую гибель раковых клеток посредством окислительного стресса [14]. Однако следует отметить, что большинство исследований токсического действия TQ сделано на моделях раковых клеточных линий. В настоящее время исследования действия TQ, выполненные на нормальных культивируемых нейронах центральной нервной системы, немногочисленны. Данное исследование было выполнено для тестирования токсического действия TQ в первичных культурах нейронов in vitro.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичные культуры нейронов мозжечка крыс. Первичные культуры получали из мозжечка 7–8-дневных крыс линии Вистар, как описано ранее [22]. Мозжечки отмывали PBS (Дульбекко), не содержащим  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , затем инкубировали в растворе 0,05%-ного трипсина и 0,02%-ной ЭДТА («Invitrogen», UK) 15 мин при 37 °С. После инкубации ткань дважды промывали в PBS и диссоциировали повторным пипетированием в питательной среде следующего состава: фетальная телячья сыворотка (10%), минимальная среда Игла (МЕМ 90%), глутамин (2 мМ) и HEPES (10 мМ). После мягкого центрифугирования клетки ресуспендировали в необходимом объеме питательной среды того же состава, содержащей 25 мМ КСІ. Суспензию клеток добавляли в 96-луночный планшет, в чашки Петри диаметром 35 мм со стеклянным дном или на покровные стекла, покрытые поли-L-лизином (0,1, 0,2 или 0,8 мл соответственно). Клетки культивировали в СО<sub>2</sub>-инкубаторе (5%ная CO<sub>2</sub>,  $36,5 \pm 0,5$  °C) до шести-семи дней *in* vitro (без смены среды).

Фармакологическая обработка. Эксперименты по определению выживаемости культивированных зернистых нейронов мозжечка (K3H) крысы проводили в MEMe с добавлением 1%ного B-27minus AO, 0,5 мМ глутамина, 25 мМ KCl, 10 мМ HEPES и 2 г/л NaHCO<sub>3</sub>, в состав которой в зависимости от эксперимента вносили тимохинон (0,01–0,06 мМ) или другие реагенты. Эксперименты по определению свободных радикалов и визуализации митохондрий с помощью родамина 123 проводили в сбалансированном солевом растворе следующего состава (в мМ): NaCl (154), KCl (25), CaCl<sub>2</sub> (2,3), MgCl<sub>2</sub> (1), NaHCO<sub>3</sub> (3,6), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,35), глюкоза (5,6), HEPES (10), pH 7,3. Уровень хлорида калия в инкубационном растворе был таким же, как и в среде культивирования, чтобы предотвратить снижение уровня внутриклеточного кальция и инициацию апоптоза [23].

Определение выживаемости нейронов. В экспериментах по изучению токсичности TQ или защитного действия NAC выживаемость K3H определяли как описано ранее [22]. После инкубации с TQ (0,01-0,05 мМ, 24 ч) клеточные культуры фиксировали смесью этанол-формальдегид-уксусная кислота (7:2:1) и окрашивали трипановым синим. Для световой микроскопии использовали инвертированный микроскоп Olympus СКХ41 (Япония) с камерой СС12. Процент выживших нейронов оценивали путем подсчета морфологически неповрежденных ядер КЗН в пяти смежных, следующих друг за другом встык последовательных полях зрения по диаметру лунки планшета при объективе ×40, что обеспечивает точную оценку выживаемости необработанных нейронов. Выживаемость контрольных культур принимали за 100%, а выживаемость экспериментальных культур подсчитывали в процентах от контроля.

Определение свободных радикалов. CellROX Green и MitoSOX Red являются флуоресцентными красителями, используемыми для измерения уровня ROS. Эти красители могут проникать в клетку и флуоресцируют только при окислении. Через 5 ч после начала эксперимента культуры окрашивали CellROX Green (0,005 мМ) или MitoSOX Red (0,005 мМ) (30 мин при 36,5 ± ± 0,5°С) и трижды промывали сбалансированным солевым раствором. Краситель добавляли в то время, когда такие же культуры демонстрировали выраженные морфологические изменения в митохондриях, обнаруживаемые с помощью родамина 123. Флуоресценцию CellROX Green возбуждали синим светом с длиной волны 485 нм. Излучение регистрировали при 530 нм с помощью микропланшетного флуоресцентного сканера (SpectraMax M2, Molecular Devices USA). Флуоресценцию MitoSOX Red возбуждали зеленым светом с длиной волны 510 нм. Излучение регистрировали при длине волны 580 нм.

Визуализация митохондрий. После 5-часовой инкубации с TQ (0,05 мМ) клетки загружали 0,005 мМ родамина 123 в течение 15 мин при  $36,5 \pm 0,5$  °C с последующей тройной промыв-кой в сбалансированном солевом растворе. Визуализацию митохондрий проводили с помощью конфокального микроскопа Olympus IX71 (Япония) со встроенными спиннинг-диском, объективом ×100 и лазером OBIS (США) с

длиной волны 488 нм, и управляемого программой Coherent Connection 3. Флуоресцентные изображения клеток для визуализации митохондрий были сделаны с излучением при >500 нм и возбуждением при 488 нм.

Электронная микроскопия. Для исследований с помощью электронного микроскопа были использованы культуры, выращенные на покровных стеклах, покрытых поли-L-лизином и помещенных в чашки Петри диаметром 40 мм [24]. Клетки культивировали в течение 6-7 дней іп vitro. После 4-6-часовой обработки TQ (0,05 мМ) образцы фиксировали в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида («SPI Inc.»), 100 мМ какодилата натрия в течение 48 ч при температуре 4 °C [25]. Фиксированные образцы дважды промывали свежим 100 мМ раствором какодилата натрия и фиксировали в течение 60 мин при температуре 4 °C 1%-ным тетроксидом осмия, растворенным в 100 мМ какодилата натрия. Затем образцы обезвоживали в серии возрастающих концентраций этанола. Дегидратация включала окрашивание 2%-ным уранилацетатом в 70%-ном этаноле в течение 1 ч при температуре 4 °C. За этанолом следовали ацетон и увеличивающаяся серия смесей ацетона и смолы и далее две смены чистой свежеприготовленной смолы. Наконец, покровные стекла помещали в силиконовые формы, заполненные смолой Spi-pon 812 («SPI Inc.», США) и полимеризовали при 70 °С в течение 72 ч. Твердые блоки обрезали бритвенными лезвиями, а ультратонкие срезы (90 нм) готовили с использованием ультрамикротома Ultracut Е («Reichert-Jung», Германия), оснащенного алмазным ножом Ultra 45 («Diatome», Швейцария). Срезы монтировали на покрытых формваром медных сетках и дополнительно контрастировали 2%-ным водным раствором уранилацетата в течение 40 мин и цитратом свинца в течение 3 мин. Образцы исследовали с получением электронных микрофотографий с помощью электронного микроскопа Jeol JEM-1400 («JEOL», Япония), работающего при 100 кВ и оснащенного CCD-камерой Quemesa («Olympus Soft Imaging Solutions»).

Статистика. Все результаты получены на 9-12 отдельных культурах в 3-4 независимых экспериментах. Данные исследуемых параметров имели нормальное распределение и анализировали с помощью *t*-теста или однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с критерием Ньюмена—Кейлса или Бонферрони. Значения p < 0,05 рассматривали как статистически значимые. Результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего (M ± SEM).

**Реагенты.** Все среды и добавки, используемые в эксперименте (если не указано другое),

БИОХИМИЯ том 85 вып. 2 2020

были получены от «Biochrom KG» (Германия); CellROX Green, MitoSOX Red и родамин 123 – от «Invitrogen» (США). Тимохинон и другие реагенты – «Sigma Chemicals» (Германия).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Токсичность тимохинона. Была исследована токсичность тимохинона в диапазоне концентраций 0,01–0,05 мМ. Обнаружено, что добавление TQ (0,04–0,05 мМ, 24 ч) в культуры приводит к появлению пикнотических ядер в зернистых нейронах мозжечка. Их образование достоверно указывает на гибель клеток. Выживаемость клеток оценивали путем подсчета морфологически интактных КЗН (рис. 1). Степень токсичности тимохинона зависела от его концентрации в среде культивирования. Для дальнейшей работы были выбраны концентрации тимохинона, которые по литературным данным проявляли токсичность для раковых клеток.

Определение окислительного стресса. Измерения уровня ROS с помощью флуоресцентных зондов показали, что 5-часовое воздействие 0,05 мМ TQ приводило к увеличению флуоресценции CellROX Green в живых K3H до  $334 \pm 50\%$ , а MitoSOX Red — до  $144 \pm 10\%$  по сравнению с контролем (рис. 2). Реагент MitoSOX Red проникает в живые клетки, где он избирательно накапливается митохондриями. Этот зонд быстро окисляется супероксидом. Окисленный продукт флуоресцирует при связывании с нуклеиновыми кислотами. CellROX Green — это проникающий в клетки краситель, который проявляет после окисления ROS ярко-зеленую фотостабильную флуоресценцию.

Электронная микроскопия. Для исследования морфологических изменений, вызванных обработкой TQ зернистых нейронов мозжечка, использовали электронную микроскопию. Изучение клеточной ультраструктуры показало, что контрольные зернистые нейроны мозжечка, культивируемые в нормальных условиях, имели округлую форму тела, большую часть которого занимало ядро с диффузным хроматином и небольшими скоплениями (глыбками) конденсированного хроматина. Ультраструктура митохондрий была типичной для нормальных клеток: митохондрии не были увеличены и имели овальную или удлиненную форму. Кристы были хорошо видны, а митохондриальный матрикс имел более высокую электронную плотность, чем окружающая цитоплазма (рис. 3). Митохондрии обычно располагались вокруг ядра и в зонах отхождения отростков. В нейронах, обработанных TQ в течение 5 ч, митохондрии выгляде-



**Рис. 1.** Влияние тимохинона (TQ) на жизнеспособность зернистых нейронов мозжечка. a – Культуры фиксировали смесью этанол-формальдегид-уксусная кислота (7 : 2 : 1) и окрашивали трипановым синим. Пикнотические ядра K3H обозначены стрелками. Масштабный отрезок 15 мкм;  $\delta$  – количественная оценка выживаемости нейронов путем подсчета морфологически неповрежденных зернистых нейронов мозжечка. Статистически значимое отличие от контрольных значений (0 мкМ TQ), \*\* p < 0.01.

С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

ли гипертрофированными, но электронная плотность их матрикса существенно не изменялась. Сами митохондрии собирались в группу в цитоплазме. Электронная плотность цитоплазмы и ядер нейронов была заметно ниже, чем в



**Рис. 2.** Увеличение флуоресценции CellROX Green (*a*) и MitoSOX Red (*б*) (продукция свободных радикалов) в зернистых нейронах мозжечка (5-часовая обработка тимохиноном, 0,05 мМ) в среде культивирования. Количественная оценка специфической флуоресценции зонда

контроле, что, по-видимому, было связано с набуханием клеток (рис. 3).

NAC защищает от токсичности тимохинона. Визуализацию митохондрий проводили путем окрашивания родамином 123 с использованием конфокальной микроскопии. В митохондриях нейронов контрольных культур активно накапливался родамин 123, который имел зеленую флуоресценцию при облучении синим светом. Вокруг ядра располагались митохондрии одинаковой толщины в форме палочек (рис. 4). В нейронах, обработанных 0,05 мМ TQ в течение 5 ч, митохондрии были сосредоточены в одной части клетки, и некоторые из них выглядели набухшими. Обработка культур антиоксидантом NAC (2 мМ) предотвращала аномальное изменение положения митохондрий в нейронах и набухание этих органелл (рис. 4).

Подсчет нейронов с нормальной морфологией в гистологических препаратах показал, что после воздействия TQ (0,05 мM, 24 ч) выжило  $24 \pm 5\%$  клеток. В этих же условиях введение 2 мM антиоксиданта NAC защищало нейроны



**Рис. 3.** Трансмиссионная электронная микрофотография культивированных зернистых нейронов мозжечка.  $a-\delta$ ) Контрольную культуру инкубировали в нормальной питательной среде. Митохондрии и другие компартменты выглядят неповрежденными;  $B-\epsilon$ ) клетки после 5-часового воздействия 0,05 мМ TQ в среде культивирования. Отмечается увеличение размеров митохондрий. Сами митохондрии группируются в цитоплазме в непосредственной близости от места отхождения отростка. Наблюдается заметное набухание тела клетки и ядра. Масштабный отрезок 1,5 мкм

от токсического воздействия (рис. 5): выживаемость нейронов увеличивалась до  $82 \pm 2\%$ .

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ТQ проявляет широкий спектр биологической активности, включая антиоксидантный, нейропротекторный, антипролиферативный, антиметастатический, цитотоксический, проапоптотический и связанные с действием натуральных киллеров цитотоксические эффекты [26–30]. Противоопухолевые эффекты TQ, в основном, связаны с индукцией остановки клеточного цикла в G2/M фазах и стимуляции апоптотических путей с ингибированием аутофагии, ангиогенеза, инвазии и миграции, а так-

БИОХИМИЯ том 85 вып. 2 2020

же с повышением эффективности химиотерапевтических препаратов [31]. Несколько исследований показали, что TQ проявляет терапевтический эффект при лечении опухолей центральной нервной системы. Тимохинон ингибирует рост клеток медуллобластомы человека, индуцируя окислительный стресс и каспазозависимый апоптоз, одновременно подавляя сигнализацию NF-kB и экспрессию IL-8 [32]. Он также уменьшает миграцию и инвазию клеток глиобластомы человека [33]. Большинство исследований нейротоксического действия TQ выполнено на моделях раковых клеточных линий. В настоящее время исследования действия TQ, выполненные на нормальных культивируемых нейронах центральной нервной системы, немногочисленны. Данное исследование проводи-

## СТЕЛЬМАШУК и др.



**Рис. 4**. NAC предотвращает вызванное тимохиноном (0,05 мМ, 5 ч) изменение локализации митохондрий в теле нейрона и набухание этих органелл. Живые зернистые нейроны мозжечка в диссоциированной культуре окрашивали родамином 123. Митохондрии указаны стрелками. Треугольники указывают на набухание митохондрий. Масштабный отрезок 15 мкм



**Рис. 5.** Антиоксидант NAC ослабляет токсическое действие TQ в культивируемых зернистых нейронах мозжечка. Культуры фиксировали смесью спирт-формальдегид-уксусная кислота (7 : 2 : 1) и окрашивали трипановым синим. Нормальные ядра КЗН обозначены стрелками. *a* – Контроль; *б* – TQ; *в* – TQ+NAC. Масштабный отрезок 15 мкм; *г* – количественная оценка выживаемости нейронов.

С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

ли на диссоциированных культурах нейронов мозжечка крыс. Большим преимуществом такой культуры клеток является морфологическая и нейрохимическая однородность нейронов, что делает ее хорошей моделью для изучения патологических процессов в нейронах, в том числе, цитотоксичности [22, 25, 34, 35]. Показано, что введение 0,03-0,05 мМ ТО индуцировало дозо-зависимую гибель нейронов в культурах. По-видимому, токсическое действие TQ связано с нарушением ионного баланса в цитоплазме и набуханием клеток, так как при исследовании ультраструктуры нейронов выявлено снижение электронной плотности цитоплазмы и ядер этих клеток. В более ранних работах интервал токсических концентраций TQ был определен на клетках медуллобластомы человека, нейробластомы мыши (Neuro-2a) и глиобластомы человека [18, 32, 33]. Авторы отмечали, что TQ проявлял цитотоксическое действие на клетки глиобластомы в концентрации 0,05 мМ, не оказывая существенного влияния на жизнеспособность нормальных астроцитов или фибробластов [33]. Токсичность TQ в концентрации 0,05 мМ показана и для клеток медуллобластомы. Это вещество приводило к увеличению уровня ROS, который отвечает за индукцию апоптоза в клетках медуллобластомы [32]. Используя CellROX Green и MitoSOX Red в качестве зондов для определения внутриклеточных свободных радикалов, мы показали, что TQ вызывает избыточное образование свободных радикалов в нормальных нейронах в условиях культивирования. Тот факт, что антиоксидант NAC защищает нейроны от гибели, вызванной тимохиноном, также подтверждает участие окислительного стресса в механизме повреждения нейронов при этом токсическом воздействии. MitoSOX Red – это флуоресцентный краситель, специально направленный на митохондрии живых клеток; с помощью этого реагента можно обнаружить продукцию супероксида митохондриями [36, 37]. Митохондрии являются не только важными источниками ROS в клетке, но и одной из главных мишеней для этих химически активных молекул. Продукция свободных радикалов, вызванная тимохиноном, в культурах нейронов сопровождалась изменением локализации митохондрий. Как правило, митохондрии КЗН располагаются вокруг ядра, тогда как ТО вызывал необычное скопление этих органелл в ограниченной области цитоплазмы. Кроме того, TQ приводил к увеличению размеров этих органелл и их набуханию. Присутствие антиоксиданта NAC в среде культивирования предотвращало все изменения митохондрий, вызванные токсическим действием TQ, что может указывать на роль свободных радикалов в повреждении митохондрий, вызванном тимохиноном. Следует отметить, что в клетках рака мочевого пузыря TQ в концентрациях, токсичных для нейронов, может индуцировать цитотоксичность, а также вызывать дисфункцию митохондрий [38]. Интересно, что одним из механизмов защитного действия ТО является его антиоксидантное действие [39]. Однако известно, что многие антиоксиданты в высоких концентрациях проявляют прооксидантную активность, могут вызывать окислительный стресс и гибель клеток. Проявление прооксидантных свойств зависит от химической природы антиоксиданта, наличия металлов переменной валентности используемой концентрации, например, сильным антиоксидантом является SkQ1 (10 (6'пластохинонил) децил-трифенилфосфоний), который в высоких концентрациях проявляет свойства прооксиданта [40].

Таким образом, все эти факты позволяют предположить, что TQ может быть токсичным для нормальных нейронов, а ROS-зависимые процессы деструкции митохондрий могут быть одной из основных причин повреждения и гибели нейронов, вызванной тимохиноном.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводили исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций. Обращение и экспериментальные процедуры с животными выполняли в соответствии с директивами Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Burits, M., and Bucar, F. (2000) Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil, Phytother. Res., 14, 323-328.
- 2. Hajhashemi, V., Ghannadi, A., and Jafarabadi, H. (2004) Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and anti-inflammatory drug, Phytother. Res., 18, 195-199, doi: 10.1002/ptr.1390.
- Ahmed, A.M., Al-Olayan, E.M., Aboul-Soud, M.A., and Al-3. Khedhairy, A.A. (2010) The immune enhancer, thymoquinone, and the hope of utilizing the immune system of Aedes caspius against disease agents, Afr. J. Biotechnol., 9, 3183–3195. Khader, M., Bresgen, N., and Eckl, P.M. (2010) 4.
  - Antimutagenic effects of ethanolic extracts from selected

*Palestinian* medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.*, **127**, 319–324, doi: 10.1016/j.jep.2009.11.001.

- Al-Majed, A.A., Al-Omar, F.A., and Nagi, M.N. (2006) Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus, *Eur. J. Pharmacol.*, 543, 40–47, doi: 10.1016/j.ejphar.2006.05.046.
- Hosseinzadeh, H., Parvardeh, S., Asl, M.N., Sadeghnia, H.R., and Ziaee, T. (2007) Effect of thymoquinone and *Nigella* sativa seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus, *Phytomedicine*, 14, 621–627, doi: 10.1016/j.phymed. 2006.12.005.
- 7. Alhebshi, A.H., Gotoh, M., and Suzuki, I. (2013) Thymoquinone protects cultured rat primary neurons against amyloid  $\beta$ -induced neurotoxicity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **433**, 362–367, doi: 10.1016/j.bbrc. 2012.11.139.
- Khan, A., Vaibhav, K., Javed, H., Khan, M.M., Tabassum, R., Ahmed, M.E., Srivastava, P., Khuwaja, G., Islam, F., Siddiqui, M.S., Safhi, M.M., and Islam, F. (2012) Attenuation of Aβ-induced neurotoxicity by thymoquinone via inhibition of mitochondrial dysfunction and oxidative stress, *Mol. Cell Biochem.*, **369**, 55–65, doi: 10.1007/s11010-012-1368-x.
- Firdaus, F., Zafeer, M.F., Anis, E., Ahmad, F., Hossain, M.M., Ali, A., and Afzal, M. (2019) Evaluation of phyto-medicinal efficacy of thymoquinone against *Arsenic* induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in SH-SY5Y cells, *Phytomedicine*, **54**, 224–230, doi: 10.1016/j.phymed.2018.09.197.
- Firdaus, F., Zafeer, M.F., Waseem, M., Ullah, R., Ahmad, M., and Afzal, M. (2018) Thymoquinone alleviates arsenic induced hippocampal toxicity and mitochondrial dysfunction by modulating mPTP in Wistar rats, *Biomed Pharmacother.*, **102**, 1152–1160, doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.159.
- Radad, K.S., Al-Shraim, M.M., Moustafa, M.F., and Rausch, W.D. (2015) Neuroprotective role of thymoquinone against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced dopaminergic cell death in primary mesencephalic cell culture, *Neurosciences (Riyadh)*, 20.
- Genrikhs, E.E., Stelmashook, E.V., Popova, O.V., Kapay, N.A., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Skrebitsky, V.G., Skulachev, V.P., and Isaev, N.K. (2015) Mitochondria-targeted antioxidant SkQT1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat and prevents amyloid-β-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices, *J. Drug Target.*, 23, 347–352, doi: 10.3109/1061186X.2014.997736.
- Isaev, N.K., Stelmashook, E.V., Genrikhs, E.E., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Kapkaeva, M.R., and Skulachev, V.P. (2016) Neuroprotective properties of mitochondria-targeted antioxidants of the SkQ-type, *Rev. Neurosci.*, 27, 849–855, doi: 10.1515/revneuro-2016-0036.
- El-Najjar, N., Chatila, M., Moukadem, H., Vuorela, H., Ocker, M., Gandesiri, M., Schneider-Stock, R., and Gali-Muhtasib, H. (2010) Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling, *Apoptosis*, **15**, 183–195, doi: 10.1007/s10495-009-0421-z.
- Park, E.J., Chauhan, A.K., Min, K.J., Park, D.C., and Kwon, T.K. (2016) Thymoquinone induces apoptosis through downregulation of c-FLIP and Bcl-2 in renal carcinoma Caki cells, *Oncol. Rep.*, 36, 2261–2267, doi: 10.3892/or.2016.5019.
- Assaf, M.D., Semaan, J., El-Sabban, M., Al-Jaouni, S.K., Azar, R., Kamal, M.A., and Harakeh, S. (2018) Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by thymo-

quinone via modulation of TGF family, p53, p21 and Bcl- $2\alpha$  in leukemic cells, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **18**, 210–215, doi: 10.2174/1871520617666170912133054.

- Gurung, R.L., Lim, S.N., Khaw, A.K., Soon, J.F., Shenoy, K., Mohamed Ali, S., Jayapal, M., Sethu, S., Baskar, R., and Hande, M.P. (2010) Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells, *PLoS One*, 5, e12124, doi: 10.1371/ journal.pone.0012124.
- Paramasivam, A., Sambantham, S., Shabnam, J., Raghunandhakumar, S., Anandan, B., Rajiv, R., Vijayashree Priyadharsini, J., and Jayaraman, G. (2012) Anti-cancer effects of thymoquinone in mouse neuroblastoma (Neuro-2a) cells through caspase-3 activation with down-regulation of XIAP, *Toxicol. Lett.*, **213**, 151–149, doi: 10.1016/j.toxlet.2012.06.011.
- Paramasivam, A., Raghunandhakumar, S., Priyadharsini, J.V., and Jayaraman, G. (2015) *In vitro* anti-neuroblastoma activity of thymoquinone against Neuro-2a cells *via* cellcycle arrest, *Asian. Pac. J. Cancer Prev.*, **16**, 8313-8319, doi: 10.7314/apjcp.2015.16.18.8313.
- Elmaci, I., and Altinoz, M.A. (2016) Thymoquinone: an edible redox-active quinone for the pharmacotherapy of neurodegenerative conditions and glial brain tumors. A short review. *Biomed. Pharmacother.*, 83, 635–640, doi: 10.1016/j.biopha.2016.07.018.
- Mansour, M.A., Nagi, M.N., El-Khatib, A.S., and Al-Bekairi, A.M. (2002) Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action, *Cell. Biochem. Funct.*, **20**, 143–151, doi: 10.1002/cbf.968.
- Isaev, N.K., Genrikhs, E.E., Aleksandrova, O.P., Zelenova, E.A., and Stelmashook, E.V. (2016) Glucose deprivation stimulates Cu<sup>2+</sup> toxicity in cultured cerebellar granule neurons and Cu<sup>2+</sup>-dependent zinc release, *Toxicol. Lett.*, 250–251, 29–34, doi: 10.1016/j.toxlet.2016.04.002.
- 23. Galli, C., Meucci, O., Scorziello, A., Werge, T.M., Calissano, P., and Schettini, G. (1995) Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis, *J. Neurosci.*, **15**, 1172–1179.
- 24. Stelmashook, E.V., Genrikhs, E.E., Mukhaleva, E.V., Kapkaeva, M.R., Kondratenko, R.V., Skrebitsky, V.G., and Isaev, N.K. (2019) Neuroprotective effects of methylene blue *in vivo* and *in vitro*, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 445–455, doi: 10.1007/s10517-019-04548-3.
- Isaev, N.K., Avilkina, A., Golyshev, S.A., Genrikhs, E.E., Alexandrova, O.P., Kapkaeva, M.R., and Stelmashook, E.V. (2018) *N*-acetyl-L-cysteine and Mn<sup>2+</sup> attenuate Cd<sup>2+</sup>induced disturbance of the intracellular free calcium homeostasis in cultured cerebellar granule neurons, *Toxicology*, **393**, 1–8, doi: 10.1016/j.tox.2017.10.017.
- Ebrahimi, S.S., Oryan, S., Izadpanah, E., and Hassanzadeh, K. (2017) Thymoquinone exerts neuroprotective effect in animal model of Parkinson's disease, *Toxicol. Lett.*, **276**, 108–114, doi: 10.1016/j.toxlet. 2017.05.018.
- Majdalawieh, A.F., Fayyad, M.W., and Nasrallah, G.K. (2017) Anti-cancer properties and mechanisms of action of thymoquinone, the major active ingredient of *Nigella sati*va, Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 57, 3911–3928, doi: 10.1080/ 10408398.2016.1277971.
- Ullah, I., Ullah, N., Naseer, M.I., Lee, H.Y., and Kim, M.O. (2012) Neuroprotection with metformin and thymoquinone against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat cortical neurons, *BMC Neurosci.*, 13, 11, doi: 10.1186/1471-2202-13-11.

- Kanter, M. (2011) Protective effects of thymoquinone on the neuronal injury in frontal cortex after chronic toluene exposure, *J. Mol. Histol.*, 42, 39–46, doi: 10.1007/s10735-010-9305-3.
- Kanter, M. (2008) Nigella sativa and derived thymoquinone prevents hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats, Neurochem. Res., 33, 579–588.
- 31. Farkhondeh, T., Samarghandian, S., Hozeifi, S., and Azimi-Nezhad, M. (2017) Therapeutic effects of thymoquinone for the treatment of central nervous system tumors: a review, *Biomed. Pharmacother.*, **96**, 1440–1444, doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.013.
- Ashour, A.E., Ahmed, A.F., Kumar, A., Zoheir, K.M., Aboul-Soud, M.A., Ahmad, S.F., Attia, S.M., Abd-Allah, A.R., Cheryan, V.T. and Rishi, A.K. (2016) Thymoquinone inhibits growth of human medulloblastoma cells by inducing oxidative stress and caspase-dependent apoptosis while suppressing NF-κB signaling and IL-8 expression, *Mol. Cell Biochem.*, **416**, 141–155, doi: 10.1007/s11010-016-2703-4.
- Kolli-Bouhafs, K., Boukhari, A., Abusnina, A., Velot, E., Gies, J.P., Lugnier, C., and Rondé, P. (2012) Thymoquinone reduces migration and invasion of human glioblastoma cells associated with FAK, MMP-2 and MMP-9 down-regulation, *Invest. New Drugs*, **30**, 2121–2131, doi: 10.1007/s10637-011-9777-3.
- Thangnipon, W., Kingsbury, A., Webb, M., and Balazs, R. (1983) Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurones and astrocytes, *Brain Res.*, 313, 177–189, doi: 10.1016/0165-3806(83)90215-8.
- 35. Costa, L.G., Tagliaferri, S., Roqué, P.J., and Pellacani, C. (2016) Role of glutamate receptors in tetrabrominated

diphenyl ether (BDE-47) neurotoxicity in mouse cerebellar granule neurons, *Toxicol. Lett.*, **241**, 159–166, doi: 10.1016/j.toxlet.2015.11.026.

- Robinson, K.M., Janes, M.S., Pehar, M., Monette, J.S., Ross, M.F., Hagen, T.M., Murphy, M.P., and Beckman, J.S. (2006) Selective fluorescent imaging of superoxide *in vivo* using ethidium-based probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15038–15043 doi: 10.1073/pnas.0601945103.
- Johnson-Cadwell, L.I., Jekabsons, M.B., Wang, A., Polster, B.M., and Nicholls, D.G. (2007) "Mild Uncoupling" does not decrease mitochondrial superoxide levels in cultured cerebellar granule neurons but decreases spare respiratory capacity and increases toxicity to glutamate and oxidative stress, J. Neurochem., 101, 1619–1631.
- Zhang, M., Du, H., Huang, Z., Zhang, P., Yue, Y., Wang, W., Liu, W., Zeng, J., Ma, J., Chen, G., Wang, X., and Fan, J. (2018) Thymoquinone induces apoptosis in bladder cancer cell via endoplasmic reticulum stressdependent mitochondrial pathway, *Chem. Biol. Interact.*, 292, 65–75, doi: 10.1016/j.cbi.2018.06.013.
   Gökce, E.C., Kahveci, R., Gökce, A., Cemil, B., Aksoy,
- Gökce, E.C., Kahveci, R., Gökce, A., Cemil, B., Aksoy, N., Sargon, M.F., Kisa, Ü., Erdoğan, B., Güvenç, Y., Alagöz, F., and Kahveci, O. (2016) Neuroprotective effects of thymoquinone against spinal cord ischemia-reperfusion injury by attenuation of inflammation, oxidative stress and apoptosis, *J. Neurosurg. Spin.*, 24, 49–59, doi: 10.3171/ 2015.10.SPINE15612.
- Stelmashook, E.V., Genrikhs, E.E., Kapkaeva, M.R., Zelenova, E.A., and Isaev, N.K. (2017) *N*-acetyl-L-cysteine in the presence of Cu<sup>2+</sup> induces oxidative stress and death of granule neurons in dissociated cultures of rat cerebellum, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1176–1182, doi: 10.1134/S0006297917100108.

## THYMOQUINONE INDUCES MITOCHONDRIAL DAMAGE AND DEATH OF CEREBELLAR GRANULE NEURONS\*

### E. V. Stelmashook<sup>1</sup>, N. S. Chetverikov<sup>2</sup>, S. A. Golyshev<sup>3</sup>, E. E. Genrikhs<sup>1</sup>, and N. K. Isaev<sup>1,2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Research Center of Neurology, 125367 Moscow, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234, Moscow, Russia; E-mail: nisaev61@mail.ru

<sup>3</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Received July 11, 2019 Revised November 11, 2019 Accepted November 13, 2019

Thymoquinone (TQ) exhibits a wide spectrum of biological activities. Most studies on the neurotoxic action of TQ have been carried out in cancer cell lines. Here, we studied the toxic effect of TQ in primary neuronal cultures *in vitro*. Incubation with 0.04-0.05 mM TQ for 24 h induced the death of cultured cerebellar granule neurons (CGNs) in a dose-dependent manner. Neuronal death was preceded by an increase in the reactive oxygen species (ROS) generation, as demonstrated using CellROX Green and MitoSOX Red. Confocal and electron microscopy showed that incubation with 0.05 mM TQ for 5 h induced changes in the intracellular location of mitochondria and mitochondria hypertrophy and cell swelling. The antioxidant *N*-acetyl-L-cysteine (2 mM) protected CGNs from the toxic action of TQ. Taken together, these facts suggest that TQ is toxic for normal neurons, while ROS-induced changes in the mitochondria can be one of the major causes of the TQ-induced neuronal damage and death.

Keywords: thymoquinone, mitochondria, cerebellar granule neurons, N-acetyl-L-cysteine

УДК 577.2.04, 577.122.38, 577.122.5, 618.3-06, 612.64, 611.81.013

# НЕЙРОТРОФИНЫ МОЗГА ПЛОДА И ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ\*

© 2020 А.В. Арутюнян<sup>1</sup>\*\*, Ю.П. Милютина<sup>1</sup>, А.Д. Щербицкая<sup>2</sup>, Г.О. Керкешко<sup>1</sup>, И.В. Залозняя<sup>1</sup>, А.В. Михель<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, 199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: alexarutiunjan@gmail.com <sup>2</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 Санкт-Петербург, Россия

> Поступила в редакцию 25.09.2019 После доработки 28.10.2019 Принята к публикации 11.11.2019

Пренатальную гипергомоцистеинемию (ПГГЦ) вызывали путем хронической метиониновой нагрузки во время беременности крыс, что приводило к значительному повышению уровня гомоцистеина не только в крови самок, но и крови и мозге их плодов. При проведении морфометрических исследований на 20-й день беременности отмечалось существенное уменьшение массы плаценты, плодов и их мозга. Установлено, что ПГГЦ приводит к активации материнской иммунной системы, сопровождающейся увеличением содержания провоспалительного IL-1β в крови самок крыс и плодной части плаценты. ПГГЦ вызывала увеличение содержания предшественников нейротрофических факторов BDNF (29 кДа) и NGF (31 кДа) и снижение уровня нейрегулина NRG1 в плаценте, а также увеличение содержания изоформы BDNF (29 кДа) и NRG1 в мозге плодов. В мозге плодов, перенесших ПГГЦ, было обнаружено также повышение активности каспазы-3. Предполагается, что изменение процессинга нейротрофинов при ПГГЦ, наряду с окислительным стрессом и инициируемым им воспалительным процессом, а также апоптозом, играет важную роль в нарушениях развития мозга потомства.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** пренатальная гипергомоцистеинемия, нейротрофические факторы, провоспалительные цитокины, плацента, мозг плодов.

DOI: 10.31857/S0320972520020086

Пренатальная гипергомоцистеинемия (ПГГЦ) относится к числу факторов, приводящих к изменению структуры и функции различных клеток, систем органов и путей гомеостаза развивающегося организма, повышая риск возникновения в дальнейшем различных патологических состояний. Несмотря на то, что ключевая роль в адаптации материнского организма к беременности, росте и развитии плода принадлежит плаценте, достаточно мало известно, какие процессы, характеризующие ее функциональное состояние, наиболее подвержены воздействию нейротоксических соединений, вызывающих нарушения развития нервной системы в раннем неонатальном периоде и зачастую проявляющихся впоследствии у детей и взрослых в виде тяжелых неврологических и психических заболеваний (аутизм, шизофрения) [1–3].

В последнее время расширяется круг исследований, посвященных изучению роли в плаценте нейротрофических факторов, участвующих в формировании нервной системы плода. Известно, что нейротрофический фактор мозга (BDNF) и фактор роста нервов (NGF) принимают участие в жизненно важных процессах роста и дифференциации нейронов центральной и периферической нервной системы развивающегося плода [4–7]. Внимание исследователей, наряду с BDNF и NGF, привлекает изучение нейрегулинов, выполняющих нейропротекторную

Принятые сокращения: BDNF — нейротрофический фактор мозга; IL-1 $\beta$  — интерлейкин-1 $\beta$ ; IL-6 — интерлейкин-6; NGF — фактор роста нервов; NRG1 — нейрегулин 1; p75NTR — рецептор p75 нейротрофинов; TNF- $\alpha$  фактор некроза опухоли  $\alpha$ ; A $\Phi$ K — активные формы кислорода; ГГЦ — гипергомоцистеинемия; ГЦ — гомоцистеин; E3 — 3-й день беременности; E7 — 7-й день беременности; E12 — 12-й день беременности; E20 — 20-й день эмбрионального развития; МЧП — материнская часть плаценты; ОС — окислительный стресс; ПГГЦ — пренатальная гипергомоцистеинемия; ПЧП — плодная часть плаценты.

<sup>\*</sup> Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio. msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM19-137, 16.12.2019.

<sup>\*\*</sup> Адресат для корреспонденции.

функцию при развитии плода и новорожденного [8, 9].

Нарушения функций мозга плода под влиянием гомоцистеина (ГЦ) могут быть также связаны с повышением уровня в крови матери провоспалительных цитокинов, способных проникать через фетоплацентарный барьер и вызывать долгосрочные нарушения развития мозга у потомства. Эффект провоспалительных цитокинов обычно опосредован изменением под их влиянием содержания нейротрофических факторов, причем не только в мозге плода, но и в плаценте, где эти факторы, как предполагается, оказывают цитопротекторное действие [4–7].

Целью данной работы было изучение динамики развития ПГГЦ при хронической метиониновой нагрузке крыс и выяснение, какое воздействие оказывает она на содержание провоспалительных цитокинов и наиболее значимых в формировании нервной системы плода нейротрофических соединений (BDNF, NGF, а также нейрегулин 1, NRG1) в плаценте и мозге эмбрионов.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использованы беременные самки крыс линии Вистар (5-6 мес.), которые были разделены на 2 группы. Первая группа состояла из животных, находившихся на стандартном рационе, и их плодов, взятых на 20-й день эмбрионального развития (Е20). Вторую группу составили самки крыс, получавшие метиониновую нагрузку на фоне стандартного рациона, и их плоды на тот же день эмбрионального развития. У самок крыс анализировали плаценту и сыворотку крови, у плодов – цельный мозг. При проведении работ использовали разработанный нами ранее метод моделирования гипергомоцистеинемии (ГГЦ) матери, основанный на дозированной метиониновой нагрузке, создаваемой путем принудительного перорального введения экспериментальным животным 0,15%-го водного раствора L-метионина (0,10-0,15 г в расчете на животное, ежедневно, начиная с четвертого дня после оплодотворения до родоразрешения) [10]. Состояние ГГЦ оценивали путем определения содержания общего L-ГЦ в сыворотке крови самок крыс на иммунохемилюминесцентном анализаторе «Architect i1000» («Abbott», США) через 1, 6, 18 и 24 ч после введения метионина. Для отслеживания суточной динамики концентрации ГЦ в крови на 3-й (Е3, т.е. до начала введения метионина или воды), 7-й (Е7), 12-й (Е12) дни беременности у самок забирали кровь из десны [11] и на 20-й день (Е20) после декапитации. На Е20 у самок обеих групп были извлечены плоды и плаценты, у плодов был произведен забор ткани мозга и крови в те же временные интервалы после введения метионина или воды. Были проанализированы классические параметры развития, такие как масса плаценты, масса тела и мозга эмбрионов на E20. Сыворотку крови отделяли путем центрифугирования (2000 g 10 мин) и хранили при -80 °C до начала анализа. Перед началом анализа плаценту отмывали от крови в 0,001М фосфатном буфере (рН 7,4) и разделяли на материнскую (МЧП) и плодную (ПЧП) части.

Содержание провоспалительных цитокинов определяли твердофазным ИФА методом с использованием тест-систем Quantikine Rat IL-6, Quantikine Rat IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine Rat TNF- $\alpha$  («R&D Systems», США), предназначенных для определения крысиного интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) и фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) в супернатантах, сыворотке и плазме крови.

Определение содержания NRG1 в плаценте и цельном мозге плодов проводили с помощью тест-системы NRG1-beta 1 ELISA Kit («RayBiotech», США) согласно протоколу про-изводителя.

Для проведения Вестерн-блот анализа гомогенаты тканей мозга и плаценты готовили на 0,001 М фосфатном буфере (рН 7,4) в соотношении 1 к 2 (m/V) в стеклянном гомогенизаторе, затем центрифугировали 16 000 g в течение 20 мин для удаления клеточного дебриса. Концентрацию общего белка в пробах оценивали по методу Бредфорда [12]. Образцы, содержащие по 50 мкг белка, разделяли в 10%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по Лэммли и переносили на PVDF-мембрану. Мембраны блокировали раствором 2%-го альбумина «(Sigma-Aldrich Chem. Co.», США) в растворе TBST (50 мМ Tris-HCl; 150 мМ NaCl; 0,1% Tween 20). Содержание BDNF выявлялось с помощью специфичных первичных антител Anti-BDNF antibody [EPR1292] (rabbit Ab 1:1000, «Abcam», США). Чтобы оценить относительные концентрации NGF в исследуемых образцах, мы использовали Anti-NGF antibody [EP1320Y] (rabbit Ab 1:1000, «Abcam»), которые распознают иммунореактивные формы NGF ~ 30 кДа. После инкубации с соответствующими HRP-конъюгированными козьими антителами (1:1000, «BioRad», США), сигналы визуализировали с помошью усиленной хемилюминесценции (ECL «BioRad»). Интенсивность полос, полученных в результате иммуноблоттинга, определяли с помощью программного обеспечения ImageLab. Руководствуясь существующими рекомендациями по процедуре нормализации содержания белка-мишени [13], полученные данные были нормализованы по глицеральдегид-3фосфат дегидрогеназе (GAPDH (14C10) Rabbit Ab, 1:1000, Cell Signaling) и содержанию общего белка в геле, определяемого с помощью технологии *stain-free* («BioRad») согласно инструкции производителя.

Для анализа активности каспазы-3 был использован буфер (20 мМ HEPES; 0,1%-ный CHAPS; 2 мМ EDTA, 5 мМ DTT, pH 7,4). В качестве субстрата использовали 4 мМ раствор синтетического пептида Ac-DEVD-pNA (ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-p-нитроанилид). Пробы, содержащие 120 мкг белка, инкубировали в термостате при 37 °C 10 мин, измерили оптическую плотность при 405 нм, после добавления субстрата инкубировали планшет при 37 °C и измеряли оптическую плотность при 405 нм через каждые 5 мин в течение 25 мин. Активность каспазы выражается в мкмоль продукта реакции pNA/мин/мг белка.



**Рис. 1.** Суточная динамика содержания ГЦ через 1 ч, 6 ч, 18 ч и 24 ч после приема беременными самками метионина (ГГЦ) или воды (контроль). *а* – Суточная динамика содержания ГЦ в сыворотке крови беременных самок крыс на третий (Е3), седьмой (Е7), двенадцатый (Е12) и двадцатый (Е20) день беременности (n = 5-7);  $\delta$  – суточная динамика содержания ГЦ в сыворотке крови плодов на E20 (n =4–6) (ПГГЦ – пренатальная гипергомоцистеинемия); *в* – суточная динамика содержания ГЦ в мозге плодов на E20 (n = 4–6) (ПГГЦ – пренатальная гипергомоцистеинемия); \*  $p \le 0,05$ , \*\*  $p \le 0,01$ . Данные представлены как среднее арифметическое и ошибка среднего (M ± SEM)

Статистическая обработка осуществлена с использованием программы STATISTICA 10.0 («StatSoft», США). Для сравнения изучаемых показателей применяли непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни либо параметрический *t*тест для независимых выборок. Характер распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Данные представлены как среднее значение ± SEM или Me [25%, 75%] (Me – медиана, 25% и 75% – 1-й и 3-й квартили) по меньшей мере шести независимых экспериментов. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как показали проведенные исследования, использованная нами модель метиониновой нагрузки приводит к повышению содержания уровня ГЦ в крови беременных самок крыс, крови и мозге плодов (рис. 1). На ЕЗ, до начала введения воды (контроль) или метионина, уровень ГЦ в сыворотке крови самок составлял  $5,7 \pm 0,37$  мкмоль/л в контрольной группе и  $5,7 \pm 0,70$  мкмоль/л в подопытной группе крыс. На Е7 у самок крыс забирали кровь через 1, 6, 18 и 24 ч после введения метионина. Как видно из рис. 1, а, уже через 1 ч после перорального введения метионина наблюдается значимое ( $p \le 0.01$ ) повышение содержания ГЦ с максимальной концентрацией через 6 ч (130,60 ± 33,48 мкмоль/л) по сравнению с контрольной группой животных (5,23 ± 0,10 мкмоль/л). Однако к 18-ти часам уровень ГЦ в крови крыс подопытной группы снижается до контрольных значений и составляет  $(5,46 \pm 0,14 \text{ мкмоль/л})$ . На E12 и E20 динамика изменений повторяется, однако концентрация ГЦ приходит к норму значительно позже только к 24-м часам после введения метионина. Таким образом, максимальный уровень ГЦ, превышающий контрольный в десятки раз, наблюдался у беременных самок крыс через 1-6 ч после введения метионина.

Хроническое введение крысам при беременности метионина вызывало повышение уровня ГЦ после каждого сеанса метиониной нагрузки не только в крови матерей, но и в крови и мозге их плодов на E20. Уровень ГЦ быстро достигал максимальных значений (через 1–6 ч), затем постепенно снижался, становясь через 24 ч статистически не отличимым от контрольных значений (рис. 1,  $\delta$ ,  $\beta$ ).

Наряду с повышением уровня ГЦ в крови при ПГГЦ наблюдалось изменение морфометрических показателей. На Е20 было зарегистрировано уменьшение массы плаценты и массы



**Рис. 2.** Масса плаценты на 20-й день беременности (n = 80) (a), плода на E20 (n = 80) ( $\delta$ ) и мозга плода на E20 (n = 80) (e) в контрольной группе (Контроль) и в группе с пренатальной гипергомоцистеинемией (ПГГЦ); \*  $p \le 0.05$ , \*\*  $p \le 0.01$ . Данные представлены как среднее арифметическое и ошибка среднего (M ± SEM)



**Рис. 3.** Содержание провоспалительных цитокинов в сыворотке крови беременных самок крыс (n = 13) (a), в плодной части плаценты самок крыс на 20-й день беременности (n = 13) (b), в материнской части плаценты самок крыс на 20-й день беременности (n = 13) (b), в контрольной группе (контроль) и у крыс с экспериментальной гипергомоцистеинемией (ГГЦ). Содержание провоспалительных цитокинов в мозге плодов на E20 (c) в контрольной группе (контроль) и в группе, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию (ПГГЦ); \*  $p \le 0.05$ , \*\*  $p \le 0.01$ . Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего (M ± SEM)

плодов при ПГГЦ (p < 0,001). Следует особо подчеркнуть, что были получены данные о значимом снижении массы мозга плодов, подвергшихся влиянию ПГГЦ, почти на 10% (рис. 2).

При определении влияния ПГГЦ на уровень провоспалительных цитокинов было установле-

но повышение содержания IL-1 $\beta$  в крови беременных самок крыс и ПЧП через 24 ч после последнего введения метионина. Как показано на рис. 3, *a*, *б*, содержание IL-1 $\beta$  в сыворотке крови подопытных животных при этом возрастает в 6 раз, достигая 30 пг/мл (*p* < 0,001), а в ПЧП –



**Рис. 4.** Содержание BDNF и NGF в плодной (ПЧП, n = 6) и материнской (МЧП, n = 10) частях плаценты крыс на 20-й день беременности и в мозге плодов на E20 (n = 10) в контрольной группе (контроль) и группе животных, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию (ПГГЦ). a – Репрезентативный Вестерн-блот двух изоформ BDNF (~29 кДа и ~14 кДа);  $\delta$  – результаты денситометрического анализа содержания изоформ BDNF (ось ординат – интенсивность полос в пикселях, полученных методом иммуноблоттинга, выраженная в условных единицах);  $\delta$  – репрезентативный Вестерн-блот NGF; c – результаты денситометрического анализа содержания NGF (ось ординат – интенсивность полос в пикселях, полученных методом иммуноблоттинга, выраженная в условных единицах);  $*** p \le 0,01$ ;  $*p \le 0,05$ . Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего (M ± SEM)

около 2 раз, составляя более 10 пг/мг белка (p < 0,05). В МЧП уровень провоспалительных цитокинов при этом не изменялся (рис. 3, e). ГГЦ не оказывала действия также на содержа-



**Рис. 5.** Содержание нейротрофического фактора NRG1 в материнской (МЧП), плодной (ПЧП) частях плаценты крыс и в мозге плодов на E20 (n = 8), выявленное иммуно-ферментным методом в контрольной группе (контроль) и группе животных при экспериментальной гипергомоцистеинемии (ПГГЦ); \*  $p \le 0.05$ . Данные представлены как Me [25%, 75%]

ние других провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- $\alpha$ ) в крови матери и плаценте. Следует отметить, что в мозге плодов на E20 при этом отсутствовали изменения в содержании не только IL-6 и TNF- $\alpha$ , но и IL-1 $\beta$  (рис. 3, *г*).

Использованный нами подход с применением иммуноблоттинга позволил выявить в МЧП и ПЧП, а также в мозге плодов на Е20 две полосы окрашивания: ~14 кДа, по мол. массе соответствующую зрелой изоформе BDNF (mBDNF), и ~29 кДа, которая может соответствовать предшественнику BDNF (proBDNF) и/или его усеченной форме (truncated BDNF) (рис. 4, a,  $\delta$ ). Полученные результаты указывают на то, что в ПЧП обнаруживаются следовые количества зрелой формы BDNF, тогда как в МЧП она содержится в сопоставимых количествах с мозгом плодов (75,6 ± 11,37 усл. ед. и 78,5 ± 3,22 усл.ед. соответственно) и не изменяется при ПГГЦ. Наряду с этим, содержание фракции BDNF с мол. массой 29 кДа в ПЧП и МЧП значительно выше, по сравнению со зрелой формой нейротрофина, и увеличивается под влиянием ПГГЦ (p < 0.05). В мозге плодов содержание этой изоформы также превышает количество mBDNF и повышается в условиях ПГГЦ. Содержание изоформы BDNF с мол. массой 14 кДа было значи-



**Рис. 6.** Активность каспазы-3 в гомогенате мозга плодов на E20 в контрольной группе (контроль, n = 16) и в группе, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию (ПГГЦ, n = 21); \*  $p \le 0.05$ . Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего (M ± SEM)

тельно снижено по сравнению с изоформой 29 кДа в плаценте (соотношение p14/p29 в МЧП в контрольной группе составило  $0.195 \pm 0.027$ , в подопытной группе  $-0,130 \pm 0,029$ ; соотношение p14/p29 в ПЧП в контрольной группе составило 0,017 ± 0,014, в подопытной группе –  $0,011 \pm 0,005$ ), в то время как в ткани мозга плодов содержание обеих изоформ различалось не столь заметно (соотношение p14/p29 в контрольной группе составило  $0,707 \pm 0,035$ , в группе с ПГГЦ — 0,668  $\pm$  0,037). ПГГЦ вызывала увеличение уровня изоформы 29 кДа как в плаценте, так и мозге плодов и не влияла на содержание изоформы 14 кДа, следует отметить, что наиболее значительно при этом возрастало содержание изоформы 29 кДа в МЧП. На рис. 4, в, г представлены данные, свидетельствующие о том, что метод иммунноблота, наряду с определением изоформ BDNF, может быть успешно использован для выявления в плаценте фактора роста нервов NGF. Установлено, что изоформа NGF с мол. массой ~ 31 кДа также, как и изоформа BDNF 29 кДа присутствует как в МЧП, так и ПЧП, а также в мозге плодов на Е20. Показано, что в МЧП и ПЧП, по аналогии с изоформой BDNF с мол. массой 29 кДа уровень NGF возрастает при ГГЦ, но в мозге плодов на Е20 при этом отмечается лишь тенденция к его увеличению, что, возможно, обусловлено значительным разбросом полученных данных.

Исследование содержания нейротрофина NRG1 в ПЧП не выявило достоверных изменений данного показателя в экспериментальной группе по сравнению с контролем. Однако в МЧП в группе с введением метионина обнаружено достоверное снижение содержания данного ростового фактора (p < 0,05). Исследование содержания NRG1 выявило его повышение в ткани мозга плодов на E20, матери которых потребляли метионин, в 1,66 раза по сравнению с плодами контрольной группы (рис. 5).

Обнаружена повышенная активность фермента каспазы-3 в мозге плодов на E20, перенесших ПГГЦ. Данное наблюдение выражалось в повышенном приросте продукта ферментативной реакции, где он составил  $3,74 \pm 0,17$  мкмоль pNA/мин/мг белка, по сравнению с контрольными животными, где данный показатель был равен  $3,16 \pm 0,19$  мкмоль pNA/мин/мг белка (p < 0,05) (рис. 6).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то, что ПГГЦ является причиной возникновения глубоких функциональных нарушений ЦНС потомства, о чем свидетельствуют работы, опубликованные ранее нами [14, 15], а также другими отечественными и зарубежными исследователями [16-21], не представляется окончательно ясным, чем вызваны эти нарушения, и в какой мере они обусловлены изменением функционального состояния плаценты. ГГЦ у матери сопровождается, как отмечается в вышеперечисленных экспериментальных исследованиях, повышением содержания ГЦ в крови новорожденных животных. В этой связи важно отметить, что в настоящем исследовании нами впервые обнаружена ПГГЦ эмбрионов, у матерей которых в период беременности уровень ГЦ был повышен. Можно представить, что ГЦ, образующийся в повышенной концентрации вследствие нарушения его метаболизма, легко преодолевает фетоплацентарный барьер путем простой диффузии или связываясь со специфическим белком-транспортером [22]. Нами ранее было установлено, что одной из причин нейротоксического действия ПГГЦ является повышенная чувствительность клеток нервной системы к эксайтотоксическому и окислительному повреждению, о чем можно судить на основании данных о подавлении в этих условиях функции NMDA-рецепторов глутамата [23], снижении выживаемости нейронов при повышенной генерации активных форм кислорода (АФК), уменьшении содержания низкомолекулярных антиоксидантов и ингибировании активности антиоксидантных ферментов [24, 25]. Роль окислительного стресса (ОС) в индуцированных ГГЦ нарушениях развития нервной системы и когнитивной функции потомства подтверждается также тем, что они могут быть устранены путем введения животным во время беременности мелатонина и некоторых коротких пептидов, обладающих антиоксидантными свойствами [14, 17, 26].

Полученные нами результаты о стимулировании под влиянием ОС продукции IL-1β при ПГГЦ согласуются с экспериментальными данными, полученными рядом исследователей на взрослых животных. Установлено, что острая и хроническая ГГЦ вызывает повышение содержания провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, TNF-α) в крови и мозге крыс [27, 28]. Предполагается, что одним из механизмов провоспалительного эффекта ГЦ является его воздействие на плацентарные макрофаги, приводящее к усилению ими синтеза и секреции провоспалительных цитокинов [29]. Важная роль в активации этой секреции отводится повышению уровня образования АФК макрофагами и клетками эндотелия сосудов в ответ на повышение уровня ГЦ в крови. В эндотелиальных клетках ГГЦ через усиление генерации АФК может вызвать системное воспаление, сопровождающееся высвобождением IL-1β [30]. Полученные нами результаты позволяют рассматривать ПГГЦ в качестве фактора, приводящего к избыточной активации материнской иммунной системы, следствием чего является повышение уровня в крови провоспалительных цитокинов, в частности, IL-1β, способного проникать через фетоплацентарный барьер, что может вызывать нейродегенеративные и другие долгосрочные нарушения развития мозга у потомства [31–33]. Повышенное содержание IL-1β может быть обусловлено индукцией его экспрессии при участии NMDA-рецепторов глутамата, что было показано рядом авторов при фокальной ишемии мозга [34, 35]. Исходя из значения NMDAрецепторной сигнальной системы в нейротоксичности ГЦ, нельзя исключить функционирования этого механизма в условиях ПГГЦ.

Подобный эффект IL-1В и других провоспалительных цитокинов может быть опосредован изменением под их воздействием содержания нейротрофических факторов, причем как в мозге плодов, так и плаценте, где эти факторы, как предполагается, проявляют цитопротекторный эффект и играют существенную роль в процессах плацентарного ангиогенеза [36-38]. Полученные данные свидетельствуют о существенном изменении уровня нейротрофинов в плаценте. Известно, что в плаценте осуществляется синтез ряда нейроактивных соединений, которые проникают через фетоплацентарный барьер и оказывают влияние на развитие мозга плода [36, 39], причем следует ожидать, что в условиях развития провоспалительного процесса, индуцированного ПГГЦ, их продукция может изменяться. В этой связи следует отметить, что изучению роли нейротрофинов (включая исследуемые нами BDNF и NGF), продуцируемых, в том числе, и различными клетками иммунной системы, придается большое значение при развитии нейродегенеративных заболеваний [40].

NRG1 (как BDNF и NGF) участвует в регуляции пролиферации, миграции, дифференцировки различных клеток и в процессах синаптогенеза. Как показано в данной работе, уровень NRG1 возрастает в мозге плодов на E20 параллельно со снижением в МЧП. Известно, что NRG1 также принимает участие в регуляции метаболизма метионина, а, следовательно, и ГЦ, в нейронах за счет стимуляции работы метионинсинтазы метилкобаламином и активации синтеза глутатиона [41]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что плацентарный NRG1 может проявлять защитные свойства против нейротоксического влияния ГГЦ матери на плод. Несмотря на установленную роль NRG1 в развитии мозга плода [8, 9], исследования, направленные на изучение функций данного фактора в плаценте, единичны. Были показаны экспрессия и секреция нейрегулина NRG1 стромальными децидуальными клетками и высказано предположение о его роли в паракринной регуляции выживаемости, дифференцировки и обеспечении адекватной инвазии клеток вневорсинчатого трофобласта, благодаря активации сигнальных путей, приводящих к подавлению апоптоза [42], который, как известно, усиливается при ГГЦ, вызывая гибель клеток трофобласта [43, 44].

Противоапоптотическими свойствами обладают также и нейротрофические факторы BDNF и NGF [45], уровень которых в плаценте при ПГГЦ, согласно полученным нами данным, возрастал. Однако необходимо принять во внимание, что обнаруженное повышение содержания касалось только их незрелых изоформ. Наряду с этим, полученные результаты показывают, что содержание mBDNF, образующегося в результате протеолитического процессинга белка-предшественника proBDNF [46, 47], в плаценте незначительно, и оно не изменится под влиянием ППГЦ. По мнению некоторых авторов, критические периоды развития плаценты и мозга плода находятся под влиянием схожих биологических сигналов [48]. Тот факт, что BDNF является одним из факторов, который активно участвует в критических процессах развития нервной системы плода, может указывать на возможность наблюдения сходных изменений в содержании BDNF в мозге плода и плаценте на одном и том же этапе пренатального развития [49]. Полученные результаты о сопоставимости уровней нейротрофинов в развивающемся мозге (Е20) и плаценте согласуются с данными исследователей, которые указывают на то, что

экспрессия мРНК BDNF в плаценте крыс с увеличением сроков беременности возрастает и достигает максимума к 21 дню гестации [5]. Установлено, что proBDNF оказывает противоположное (по сравнению с mBDNF) влияние на выживание и функционирование нейронов, развитие синаптической пластичности [50], что особенно наглядно проявляется при исследовании нейродегенеративных патологий [51]. В отличие от mBDNF, который взаимодействует с тирозинкиназным Trk-В рецептором тропомиозина, обладающим к нему высоким сродством, proBDNF связывается с рецептором p75 нейротрофинов (p75NTR), активация которого приводит к снижению пролиферации нейронов и усилению процессов апоптоза [52]. При этом полагают, что proBDNF является нейротрофином, представленным преимущественно в раннем постнатальном периоде, тогда как эффекты mBDNF проявляются, в основном, во взрослом организме [53, 54].

Широко использующиеся методы иммуноферментного анализа не позволяют выявить различные молекулярные изоформы BDNF и других нейротрофинов. Исходной формой нейротрофического фактора BDNF является prepro BDNF с мол. массой 35 кДа, распадающийся с образованием proBDNF (32 кДа). Последующий протеолиз proBDNF при участии внутриклеточных протеолитических ферментов, о чем свидетельствуют результаты многочисленных исследований, приводит к образованию зрелой формы mBDNF с мол. массой 13-15 кДа [55-57] и/или т.н. «усеченной» формы BDNF (28 кДа), функциональное значение которой пока не установлено [58, 59]. Имеются данные о том, что NGF и BDNF экспрессируются неодинаково в разных областях плаценты [60]. Наши данные также указывают на то, что МЧП и ПЧП существенно отличаются по содержанию исследованных нейротрофинов, в частности, показаны более значимые уровни BDNF, NGF и, в особенности, соотношение mBDNF к proBDNF в МЧП. При этом учитывая, что функции изоформ BDNF в развивающемся мозге и различных частях плаценты могут существенно различаться, некоторые исследователи считают более информативным измерение не только их индивидуальных уровней, но и соотношение mBDNF и proBDNF [61]. Преобладание proBDNF, сниженное содержание mBDNF, и, как следствие, более низкие уровни отношения mBDNF к proBDNF в МЧП и особенно в ПЧП, по сравнению с развивающимся мозгом плодов на Е20, были впервые обнаружены в нашей работе. Эти различия могут быть следствием либо более низкой скорости превращения проней-

БИОХИМИЯ том 85 вып. 2 2020

ротрофина в зрелую форму и/или быстрого потребления mBDNF в плаценте по сравнению с мозгом плодов.

Анализ литературных данных позволяет прийти к заключению о том, что динамическое равновесие (баланс) между всеми изоформами BDNF, образующимися при процессинге, включая его «усеченную» форму, играет важную роль в проявлении пластичности нервной системы и когнитивных функций, нарушающихся при различных патологических состояниях организма [58].

Процессинг NGF также, как и BDNF, связан с протеолитическим расщеплением предшественников до зрелых форм, обладающих высоким сродством к Trk-киназным рецепторам тропомиозина, связывание с которыми обуславливает их нейропротекторное действие и выживание нервных клеток. Взаимодействие proNGF и proBDNF с p75NTR рецептором приводит к апоптозу и обуславливает его нейротоксические эффекты [62, 63], которые проявляются не только в нейронах, но и в клетках глии, стимулируя в ней воспалительный процесс вследствие интенсивной продукции TNF-α [64]. При исследованиях с помощью иммуноблота NGF (в отличие от BDNF) в мозге грызунов почти полностью обнаруживается в виде предшественника с мол. массой 32 кДа [63], а mNGF вследствие крайне незначительного содержания в нем практически не детектируется [65]. Низкое содержание mNGF может быть связано с тем, что proNGF легко образует стабильный комплекс с присутствующим в тканях растворимым альфа-2-макроглобулином, что приводит к повышению его устойчивости к протеолитическому расщеплению с образованием mNGF [62]. Вместе с тем, полагают, что в секретируемом клеткой пуле NGF содержатся его обе формы (proNGF и mNGF) [63], и использование иммуноферментного анализа ELISA позволяет определить суммарный уровень нейротрофина.

Приведенные в данной работе результаты позволяют утверждать, что ПГГЦ приводит к повышению содержания в плаценте незрелых форм BDNF и NGF, что может быть следствием замедления их дальнейшего процессинга и отрицательно сказываться на развитии плода. При сопоставлении с данными литературы следует полагать, что выявленные нами изоформы BDNF с мол. массой 29 кДа и NGF с мол. массой 31 кДа, скорее всего, являются предшественниками зрелых форм нейротрофинов, обладающих нейротрофическими свойствами. Нельзя исключить при этом, что полоса с мол. массой 29 кДа может быть представлена также усеченной изоформой BDNF. Отличия в изменении содержания нейротрофинов в МЧП и ПЧП под влиянием ГГЦ могут быть рассмотрены с позиций некоторых исследователей, которые считают, что в различных частях плаценты в условиях патологии возникает ОС разной интенсивности, который вызывает компенсаторный ответ в виде повышения содержания нейротрофинов, необходимых в условиях патологии беременности и стрессорных воздействий для формирования жизнеспособного плода [66]. Полученные данные о влиянии ПГГЦ на содержание предшественников нейротрофинов в плаценте нашли подтверждение при исследовании мозга плодов на Е20, в котором также наблюдалось их повышенное образование под влиянием перенесенной ГГЦ, статистически значимое при определении BDNF и на уровне тенденции в отношении NGF. Характерно, что также как в плаценте, в мозге плодов в условиях ПГГЦ содержание зрелой формы BDNF не изменялось.

Можно представить наличие нескольких причин, лежащих в основе негативного действия ПГГЦ на развивающийся организм плода. Проявлением токсичности ГЦ при воздействии на плод является обнаруженное нами снижение таких жизненно важных показателей, как масса плаценты, масса плода и масса его мозга. Одним из факторов, приводящих к таким последствиям, может быть вызванный ГГЦ ОС, как было описано ранее в наших исследованиях [25], а также в работах других авторов [14, 17, 19]. Развитию ОС способствует также воспалительная реакция, стимулируемая, как показано в данном исследовании, при ПГГЦ повышенным образованием IL-1β в крови беременных самок и ПЧП. Известно, что одним из механизмов повреждающего действия ОС является индуцируемый им вследствие повышенной генерации АФК апоптоз, вызывающий гибель клеток как в плаценте, так и мозге плода. Полученные нами ранее результаты о развитии ОС в мозге новорожденных при ПГГЦ [25], а также данные, полученные в настоящем исследовании, о повышении активности ключевой цистеиновой протеазы апоптотического каскада каспазы-3 в мозге плодов согласуются с имеющимися на сегодняшний день представлениями об основных механизмах повреждающего действия ГЦ, в частности, развитии апоптоза при интенсификации ОС. Согласно литературным данным, активация апоптоза при ГГЦ в различных типах клеток может осуществляться как «внешним путем» через взаимодействие внеклеточных сигналов с рецепторами клеточной поверхности, так и «внутренним», связанным с деструкцией митохондрий под воздействием ОС, что отмечалось, в частности, при воздействии ГЦ на клетки трофобласта [43, 44], а также мозг потомства крыс, перенесших ПГГЦ [16].

В механизме повреждающего действия ГГЦ, помимо перечисленных факторов, существенную роль играют эпигенетические модификации, связанные с реакциями метилирования, в первую очередь ДНК-метилирования, поскольку образование из S-аденозилметионина, являющегося основным донором метильных групп, S-аденозил-ГЦ приводит к ингибированию процессов метилирования в организме [60]. Существуют сведения о том, что фолатная недостаточность при ГГЦ вызывает снижение ДНКметилирования в плаценте, что может оказывать негативное воздействие на рост и развитие плода [67, 68]. ДНК-метилированию в настоящее время придается большое значение в регуляции экспрессии генов нейротрофинов, в частности BDNF, при развитии нервной системы и ряде нейродегенеративных заболеваний [67, 68]. В связи с этим изучение зависимости между процессингом различных форм нейротрофинов и интенсивности ДНК-метилирования представит безусловный интерес для понимания причин возникновения нарушений функционального состояния плаценты и развития плода при ПГГЦ.

Таким образом, можно сделать заключение, что при экспериментальной ПГГЦ, вызванной хронической метиониновой нагрузкой крыс при беременности, отмечаются существенные изменения морфометрических показателей, содержания интерлейкина-1 $\beta$  и нейротрофических соединений (BDNF, NGF, NRG1) плаценты, которые обуславливают нарушение развития мозга плода. Полученные данные открывают перспективу клинического изучения указанных параметров в плаценте в качестве маркеров неблагоприятных изменений формирования нервной системы новорожденных при ГГЦ, относящейся к числу распространенных осложнений беременности.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (18-015-00099) и Госзадания (АААА-А19-119021290116-1).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Onore, C., Careaga, M., and Ashwood, P. (2012) The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism, *Brain Behav. Immun.*, 26, 383–392, doi: 10.1016/ j.bbi.2011.08.007.
- Patterson, P.H. (2009) Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models, *Behav. Brain Res.*, 204, 313–321, doi: 10.1016/ j.bbr.2008.12.016.
- Wahlbeck, K., Forsen, T., Osmond, C., Barker, D.J., and Eriksson, J.G. (2001) Association of schizophrenia with low maternal body mass index, small size at birth, and thinness during childhood, *Arch. Gen. Psychiatry*, 58, 48–52, doi: 10.1001/archpsyc.58.1.48.
- Dhobale, M.V., Pisal, H.R., Mehendale, S.S., and Joshi, S.R. (2013) Differential expression of human placental neurotrophic factors in preterm and term deliveries, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **31**, 719–723, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2013. 09.006.
- Garces, M.F., Sanchez, E., Torres-Sierra, A.L., Ruiz-Parra, A.I., Angel-Muller, E., Alzate, J.P., Sanchez, A.Y., Gomez, M.A., Romero, X.C., Castaneda, Z.E., Sanchez-Rebordelo, E., Dieguez, C., Nogueiras, R., and Caminos, J.E. (2014) Brain-derived neurotrophic factor is expressed in rat and human placenta and its serum levels are similarly regulated throughout pregnancy in both species, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 81, 141–151, doi: 10.1111/cen.12391.
- Tapia-Arancibia, L., Rage, F., Givalois, L., and Arancibia, S. (2004) Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function, *Front. Neuroendocrinol.*, 25, 77–107, doi: 10.1016/ j.yfrne.2004.04.001.
- Tometten, M., Blois, S., and Arck, P.C. (2005) Nerve growth factor in reproductive biology: link between the immune, endocrine and nervous system? *Chem. Immunol. Allergy*, 89, 135–148, doi: 10.1159/000087962.
- Dammann, O., Bueter, W., Leviton, A., Gressens, P., and Dammann, C.E. (2008) Neuregulin-1: a potential endogenous protector in perinatal brain white matter damage, *Neonatology*, 93, 182–187, doi: 10.1159/000111119.
   Esper, R.M., Pankonin, M.S., and Loeb, J.A. (2006)
- Esper, R.M., Pankonin, M.S., and Loeb, J.A. (2006) Neuregulins: versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease, *Brain Res. Rev.*, **51**, 161–175, doi: 10.1016/j.brainresrev. 2005.11.006.
- Арутюнян А.В., Милютина Ю.П., Залозняя И.В., Пустыгина А.В., Козина Л.С., Кореневский А.В. (2012) Использование различных экспериментальных моделей гипергомоцистеинемии в нейрохимических исследованиях, *Нейрохимия*, 29, 83–88.
- 11. Зильфян В.Н., Кумкумаджян В.А. (1970) Новый метод взятия крови у мелких лабораторных животных, *Журн. экспер. и клин. медицины*, **10**, 12–14.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248–254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Bass, J.J., Wilkinson, D.J., Rankin, D., Phillips, B.E., Szewczyk, N.J., Smith, K., and Atherton, P.J. (2017) An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research, *Scand. J. Med. Sci. Sports*, 27, 4–25, doi: 10.1111/sms.12702.
- Arutjunyan, A., Kozina, L., Stvolinskiy, S., Bulygina, Y., Mashkina, A., and Khavinson, V. (2012) Pinealon protects the rat offspring from prenatal hyperhomocysteinemia, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 5, 179–185.
   Shcherbitskaya, A.D., Milyutina, Y.P., Zaloznyaya, I.V.,
- Shcherbitskaya, A.D., Milyutina, Y.P., Zaloznyaya, I.V., Arutjunyan, A.V., Nalivaeva, N.N., and Zhuravin, I.A. (2017) The effects of prenatal hyperhomocysteinemia on

the formation of memory and the contents of biogenic amines in the rat hippocampus, *Neurochem. J.*, **11**, 296-301, doi: 10.1134/s1819712417040080.

- Koz, S.T., Gouwy, N.T., Demir, N., Nedzvetsky, V.S., Etem, E., and Baydas, G. (2010) Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by methionine intake on oxidative stress and apoptosis in pup rat brain, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 28, 325–329, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2010. 02.006.
- Baydas, G., Koz, S.T., Tuzcu, M., and Nedzvetsky, V.S. (2008) Melatonin prevents gestational hyperhomocysteinemia-associated alterations in neurobehavioral developments in rats, *J. Pineal Res.*, 44, 181–188, doi: 10.1111/ j.1600-079X.2007.00506.x.
- Baydas, G., Koz, S.T., Tuzcu, M., Nedzvetsky, V.S., and Etem, E. (2007) Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by high methionine diet on the learning and memory performance in offspring, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 25, 133–139, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2007.03.001.
- Makhro, A.V., Mashkina, A.P., Solenaya, O.A., Trunova, O.A., Kozina, L.S., Arutyunian, A.V., and Bulygina, E.R. (2008) Prenatal hyperhomocysteinemia as a model of oxidative stress of the brain, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **146**, 33–35, doi: 10.1007/s10517-008-0233-0.
- Gerasimova, E., Yakovleva, O., Burkhanova, G., Khaertdinov, N., Sitdikova, G., and Ziyatdinova, G. (2017) Effects of maternal hyperhomocysteinemia on the early physical development and neurobehavioral maturation of rat offspring, *BioNanoScience*, 7, 155–158, doi: 10.1007/s12668-016-0326-6.
- Махро А.В., Машкина А.П., Соленая О.А., Трунова О.А., Тюлина О.В., Булыгина Е.Р., Болдырев А.А. (2008) Карнозин защищает от окислительного стресса, вызванного гипергомоцистеинемией, *Нейрохимия*, 2, 202–208.
- Tsitsiou, E., Sibley, C.P., D'Souza, S.W., Catanescu, O., Jacobsen, D.W., and Glazier, J.D. (2011) Homocysteine is transported by the microvillous plasma membrane of human placenta, *J. Inherit. Metab. Dis.*, 34, 57–65, doi: 10.1007/s10545-010-9141-3.
- Арутюнян А.В., Козина Л.С., Арутюнов В.А. (2010) Токсическое влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на потомство (экспериментальное исследование), *Журнал акушерства и женских болезней*, **59**, 16–23.
- Арутюнян А.В., Пустыгина А.В., Милютина Ю.П., Залозняя И.В., Козина Л.С. (2015) Молекулярные маркеры окислительного стресса у потомства при экспериментальной гипергомоцистеинемии, *Мол. медицина*, 5, 41–46.
- Пустыгина А.В., Милютина Ю.П., Залозняя И.В., Арутюнян А.В. (2015) Показатели окислительного стресса в мозге новорожденных крысят, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию, *Нейрохимия*, 32, 71–77.
- Gitto, E., Pellegrino, S., Gitto, P., Barberi, I., and Reiter, R.J. (2009) Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin, *J. Pineal Res.*, 46, 128–139, doi: 10.1111/j.1600-079X.2008.00649.x.
- Da Cunha, A.A., Ferreira, A.G., Loureiro, S.O., da Cunha, M.J., Schmitz, F., Netto, C.A., and Wyse, A.T. (2012) Chronic hyperhomocysteinemia increases inflammatory markers in hippocampus and serum of rats, *Neurochem Res.*, 37, 1660–1669, doi: 10.1007/s11064-012-0769-2.
- 28. Da Cunha, A.A., Ferreira, A.G., and Wyse, A.T. (2010) Increased inflammatory markers in brain and blood of rats

subjected to acute homocysteine administration, *Metab. Brain Dis.*, **25**, 199–206, doi: 10.1007/s11011-010-9188-8.

- Zanin, R.F., Bergamin, L.S., Morrone, F.B., Coutinho-Silva, R., de Souza Wyse, A.T., and Battastini, A.M. (2015) Pathological concentrations of homocysteine increases ILlbeta production in macrophages in a P2X7, NF-kB, and erk-dependent manner, *Purinergic Signal.*, **11**, 463–470, doi: 10.1007/s11302-015-9464-5.
- Xu, X., Yang, X.Y., He, B.W., Yang, W.J., and Cheng, W.W. (2016) Placental NRP1 and VEGF expression in preeclamptic women and in a homocysteine-treated mouse model of pre-eclampsia, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **196**, 69–75, doi: 10.1016/j.ejogrb.2015.11.017.
- Bilbo, S.D., and Schwarz, J.M. (2009) Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system, *Front. Behav. Neurosci.*, 3, doi: 10.3389/neuro.08.014.2009.
- 32. Jakubowski, H. (2004) Molecular basis of homocysteine toxicity in humans, *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 470–487, doi: 10.1007/s00018-003-3204-7.
- Smith, S.E., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., and Patterson, P.H. (2007) Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6, *J. Neurosci.*, 27, 10695–10702, doi: 10.1523/JNEUROSCI. 2178-07.2007.
- Jander, S., Schroeter, M., and Stoll, G. (2000) Role of NMDA receptor signaling in the regulation of inflammatory gene expression after focal brain ischemia, *J. Neuroimmunol.*, **109**, 181–187, doi: 10.1016/s0165-5728(00)00317-9.
- 35. Онуфриев М.В., Фрейман С.В., Моисеева Ю.В., Степаничев М.Ю., Лазарева Н.А., Гуляева Н.В. (2017) Аккумуляция кортикостерона и интерлейкина-1 в гиппокампе после фокального ишемического повреждения неокортекса: селективная чувствительность вентрального гиппокампа, *Нейрохимия*, 235–241, doi: 10.7868/s1027813317030086.
- Bolton, J.L., and Bilbo, S.D. (2014) Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms, *Dialogues Clin. Neurosci.*, 16, 307–320.
- Gilmore, J.H., Jarskog, L.F., and Vadlamudi, S. (2003) Maternal infection regulates BDNF and NGF expression in fetal and neonatal brain and maternal-fetal unit of the rat, *J. Neuroimmunol.*, **138**, 49–55, doi: 10.1016/S0165-5728(03)00095-X.
- Gilmore, J.H., Jarskog, L.F., and Vadlamudi, S. (2005) Maternal poly I:C exposure during pregnancy regulates TNF alpha, BDNF, and NGF expression in neonatal brain and the maternal-fetal unit of the rat, *J. Neuroimmunol.*, **159**, 106–112, doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.10.008.
- Hsiao, E.Y., and Patterson, P.H. (2012) Placental regulation of maternal-fetal interactions and brain development, *Dev. Neurobiol.*, 72, 1317–1326, doi: 10.1002/dneu.22045.
- Vega, J.A., Garcia-Suarez, O., Hannestad, J., Perez-Perez, M., and Germana, A. (2003) Neurotrophins and the immune system, *J. Anat.*, **203**, 1–19, doi: 10.1046/j.1469-7580.2003.00203.x.
- Zhang, Y., Hodgson, N., Trivedi, M., and Deth, R. (2016) Neuregulin 1 promotes glutathione-dependent neuronal cobalamin metabolism by stimulating cysteine uptake, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 3849087, doi: 10.1155/ 2016/3849087.
- Fock, V., Plessl, K., Draxler, P., Otti, G.R., Fiala, C., Knofler, M., and Pollheimer, J. (2015) Neuregulin-1mediated ErbB2-ErbB3 signalling protects human trophoblasts against apoptosis to preserve differentiation, *J. Cell Sci.*, **128**, 4306–4316, doi: 10.1242/jcs.176933.
- 43. Di Simone, N., Maggiano, N., Caliandro, D., Riccardi, P., Evangelista, A., Carducci, B., and Caruso, A. (2003)

Homocysteine induces trophoblast cell death with apoptotic features, *Biol. Reprod.*, **69**, 1129–1134, doi: 10.1095/ biolreprod.103.015800.

- Kamudhamas, A., Pang, L., Smith, S.D., Sadovsky, Y., and Nelson, D.M. (2004) Homocysteine thiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: a mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction? *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **191**, 563–571, doi: 10.1016/j.ajog. 2004.01.037.
- 45. Fujita, K., Tatsumi, K., Kondoh, E., Chigusa, Y., Mogami, H., Fujii, T., Yura, S., Kakui, K., and Konishi, I. (2011) Differential expression and the anti-apoptotic effect of human placental neurotrophins and their receptors, *Placenta*, **32**, 737–744, doi: 10.1016/j.placenta.2011.07.001.
- 737-744, doi: 10.1016/j.placenta.2011.07.001.
  46. Yang, B., Ren, Q., Zhang, J.C., Chen, Q.X., and Hashimoto, K. (2017) Altered expression of BDNF, BDNF pro-peptide and their precursor proBDNF in brain and liver tissues from psychiatric disorders: rethinking the brain-liver axis, *Transl. Psychiatry*, 7, e1128, doi: 10.1038/tp.2017.95.
- Hashimoto, K. (2016) Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor proBDNF in the brain by serotonin, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 266, 195–197, doi: 10.1007/s00406-016-0682-9.
- Zeltser, L.M., and Leibel, R.L. (2011) Roles of the placenta in fetal brain development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 15667–15668, doi: 10.1073/pnas.1112239108.
- Saenen, N.D., Plusquin, M., Bijnens, E., Janssen, B.G., Gyselaers, W., Cox, B., Fierens, F., Molenberghs, G., Penders, J., Vrijens, K., De Boever, P., and Nawrot, T.S. (2015) In utero fine particle air pollution and placental expression of genes in the brain-derived neurotrophic factor signaling pathway: an environage birth cohort study, *Environ. Health Perspect.*, **123**, 834–840, doi: 10.1289/ehp.1408549.
- 50. Dincheva, I., Lynch, N.B., and Lee, F.S. (2016) The role of BDNF in the development of fear learning, *Depress. Anxiety*, **33**, 907–916, doi: 10.1002/da.22497.
- Gerenu, G., Martisova, E., Ferrero, H., Carracedo, M., Rantamaki, T., Ramirez, M.J., and Gil-Bea, F.J. (2017) Modulation of BDNF cleavage by plasminogen-activator inhibitor-1 contributes to Alzheimer's neuropathology and cognitive deficits, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 1863, 991–1001, doi: 10.1016/j.bbadis.2017.01.023.
- Sasi, M., Vignoli, B., Canossa, M., and Blum, R. (2017) Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling, *Pflugers Arch.*, 469, 593–610, doi: 10.1007/s00424-017-1964-4.
- 53. Menshanov, P.N., Lanshakov, D.A., and Dygalo, N.N. (2015) proBDNF is a major product of bdnf gene expressed in the perinatal rat cortex, *Physiol. Res.*, **64**, 925–934.
- Patz, S., and Wahle, P. (2004) Neurotrophins induce short-term and long-term changes of cortical neurotrophin expression, *Eur. J. Neurosci.*, 20, 701–708, doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03519.x.
- 55. Foltran, R.B., and Diaz, S.L. (2016) BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *J. Neurochem.*, **138**, 204–221, doi: 10.1111/jnc.13658.
- Kowianski, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waskow, M., Steliga, A., and Morys, J. (2018) BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 38, 579–593, doi: 10.1007/ s10571-017-0510-4.
- Mizui, T., Ishikawa, Y., Kumanogoh, H., and Kojima, M. (2016) Neurobiological actions by three distinct subtypes of brain-derived neurotrophic factor: multi-ligand model of growth factor signaling, *Pharmacol. Res.*, **105**, 93–98, doi: 10.1016/j.phrs.2015.12.019.
- 58. Garcia, K.L., Yu, G., Nicolini, C., Michalski, B., Garzon, D.J., Chiu, V.S., Tongiorgi, E., Szatmari, P., and

Fahnestock, M. (2012) Altered balance of proteolytic isoforms of pro-brain-derived neurotrophic factor in autism, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **71**, 289–297, doi: 10.1097/ NEN.0b013e31824b27e4.

- Mizui, T., Hattori, K., Ishiwata, S., Hidese, S., Yoshida, S., Kunugi, H., and Kojima, M. (2019) Cerebrospinal fluid BDNF pro-peptide levels in major depressive disorder and schizophrenia, *J. Psychiatr. Res.*, **113**, 190–198, doi: 10.1016/j.jpsychires.2019.03.024.
- Sahay, A.S., Jadhav, A.T., Sundrani, D.P., Wagh, G.N., and Joshi, S.R. (2019) Differential expression of nerve growth factor (NGF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in different regions of normal and preeclampsia placentae, *Clin. Exp. Hypertens.*, 1–5, doi: 10.1080/ 10641963.2019.1665677.
- Xiong, J., Zhou, L., Yang, M., Lim, Y., Zhu, Y.H., Fu, D.L., Li, Z.W., Zhong, J.H., Xiao, Z.C., and Zhou, X.F. (2013) ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells *in vitro*, *Neuro. Oncol.*, **15**, 990–1007, doi: 10.1093/neuonc/ not039.
- 62. Barcelona, P.F., and Saragovi, H.U. (2015) A pro-nerve growth factor (proNGF) and NGF binding protein, alpha2-macroglobulin, differentially regulates p75 and TrkA receptors and is relevant to neurodegeneration *ex vivo* and *in vivo*, *Mol. Cell. Biol.*, **35**, 3396–3408, doi: 10.1128/MCB.00544-15.
- 63. Budni, J., Bellettini-Santos, T., Mina, F., Garcez, M.L., and Zugno, A.I. (2015) The involvement of BDNF, NGF

and GDNF in aging and Alzheimer's disease, *Aging Dis.*, **6**, 331–341, doi: 10.14336/AD.2015.0825.

259

- Lebrun-Julien, F., Bertrand, M.J., De Backer, O., Stellwagen, D., Morales, C.R., Di Polo, A., and Barker, P.A. (2010) ProNGF induces TNFalpha-dependent death of retinal ganglion cells through a p75NTR non-cellautonomous signaling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 3817–3822, doi: 10.1073/pnas.0909276107.
- Fahnestock, M., Michalski, B., Xu, B., and Coughlin, M.D. (2001) The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease, *Mol. Cell. Neurosci.*, 18, 210–220, doi: 10.1006/mcne.2001.1016.
- 66. Sahay, A.S., Sundrani, D.P., Wagh, G.N., Mehendale, S.S., and Joshi, S.R. (2015) Neurotrophin levels in different regions of the placenta and their association with birth outcome and blood pressure, *Placenta*, **36**, 938–943, doi: 10.1016/j.placenta.2015.06.006.
- Kim, K.C., Friso, S., and Choi, S.W. (2009) DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging, *J. Nutr. Biochem.*, 20, 917–926, doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.06. 008.
- Kulkarni, A., Dangat, K., Kale, A., Sable, P., Chavan-Gautam, P., and Joshi, S. (2011) Effects of altered maternal folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid on placental global DNA methylation patterns in Wistar rats, *PLoS One*, 6, e17706, doi: 10.1371/journal.pone. 0017706.

## NEUROTROPHINS OF THE FETAL BRAIN AND PLACENTA IN PRENATAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA\*

A. V. Arutjunyan<sup>1\*\*</sup>, Yu. P. Milyutina<sup>1</sup>, A. D. Shcherbitskaia<sup>2</sup>,
G. O. Kerkeshko<sup>1</sup>, I. V. Zalozniaia<sup>1</sup>, and A. V. Mikhel<sup>1</sup>

 <sup>1</sup> Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology, 199034 St. Petersburg, Russia; E-mail: alexarutiunjan@gmal.com
 <sup>2</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 194223 St. Petersburg, Russia

> Received September 25, 2019 Revised October 28, 2019 Accepted November 11, 2019

Prenatal hyperhomocysteinemia (PHHC) in pregnant rats was induced by chronic L-methionine loading, resulting in a significant increase in the L-homocysteine content both in the mothers' blood and blood and brain of fetuses. Significant decrease in the weight of the placenta, fetus and fetal brain was detected by the morphometric studies on day 20 of pregnancy. PHHC also activated maternal immune system due to the increase in the content of proinflammatory interleukin-1 $\beta$  in the rat blood and fetal part of the placenta. PHHC elevated the levels of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF, 29 kDa) and nerve growth factor (NGF, 31 kDa) precursors in the placenta and the content of the BDNF isoform (29 kDa) in the fetal brain. The content of neuregulin 1 (NRG1) decreased in the placenta and increased in the fetal brain on day 20 of embryonic development. An increase in the caspase-3 activity was detected in the brains of fetuses subjected to PHHC. It was suggested that changes in the processing of neurotrophins induced by PHHC, oxidative stress, and inflammatory process initiated by it, as well as apoptosis, play an important role in the development of brain disorders in the offspring.

Keywords: prenatal hyperhomocysteinemia, neurotrophic factors, proinflammatory cytokines, placenta, fetus brain

УДК 577.11

# ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКСОВ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ БИОКОНЪЮГАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЧАСТИЦ ВТМ И КОНСЕРВАТИВНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГРИППА А\*

#### © 2020 Т.В. Гасанова\*\*, А.А. Королева, Е.В. Скурат, П.А. Иванов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная novma: tv.gasanova@gmail.com

> Поступила в редакцию 30.09.2019 После доработки 08.11.2019 Принята к публикации 16.11.2019

Получены биокомплексы вирион-белок между генетически модифицированными частицами вируса табачной мозаики (BTM, tobacco mosaic virus, TMV) и рекомбинантным белком, несущим консервативный антиген эпитоп M2e вируса гриппа. Вирусный вектор TMV-N-lys был создан на основе генома ВТМ штамма U1 путем внесения остатка реакционно-способного лизина (lys) в N-концевую область белка оболочки (БО), экспонированную на поверхности частиц. Растения Nicotiana benthamiana инокулировали культурой агробактерии, трансформированной TMV-N-lys. Вирионы TMV-N-lys были выделены из экстрактов системных листьев. Анализ препарата TMV-N-lys с помощью электрофореза в полиакриламидном геле показал наличие белка с подвижностью ~21 кДа. Электронная микроскопия препарата TMV-N-lys подтвердила стабильность модифицированных вирусных частиц. Химическое связывание частиц TMV-N-lys и M2eантигена вируса гриппа, эспрессированного в *E. coli*, производили с помощью 5 mM 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)-карбодиимида (EDC) и 1 mM *N*-гидроксисукцинимида (NHS). Вестерн-блот анализ подтвердил наличие комплексов, образованных рекомбинантным белком и модифицированными частицами TMV-N-lys. Диаметр комплексов практически не отличался от исходных вирионов TMV-N-lys, но биокомплексы образовывали высокоорганизованную и разветвленную сеть с электронно-плотными «зернами». Динамическое рассеяние света продемонстрировало, что одиночные пики, соответствующие комплексам TMV-N-lys/DHFR-M2e, были значительно смещены относительно контрольных вирионов TMV-N-lys. Косвенный иммуноферментный анализ с использованием ТМУ- и М2е-специфических антител показал, что комплексы сохраняют стабильность при длительной адсорбции. Полученные результаты позволяют использовать данные биокомплексы для совершенствования кандидатных универсальных вакцин против вируса гриппа.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** биоконъюгация, вирус табачной мозаики (BTM), генетическая модификация частиц, грипп A, мультивалентная нановакцина.

DOI: 10.31857/S0320972520020098

В настоящее время грипп А остается одним из самых опасных респираторных заболеваний. Отсутствие иммунитета к новым сезонным и пандемическим штаммам данного вируса является серьезной проблемой, способной приводить к тяжелым патологиям и летальному исходу. К сожалению, ни одна из существующих вакцин не может полностью решить проблему борьбы с заболеваемостью гриппом по причине высокой изменчивости основных поверхностных антигенов вируса [1]. Большинство разрабатываемых подходов к созданию «универсальной» вакцины нацелено на использование различных консервативных белков и пептидов вируса гриппа. Эффективность предполагаемой «универсальной» противогриппозной вакцины, главным образом, зависит от индукции кросс-реактивных Т-клеток [2]. Известно, что подобный иммунитет не способен предотвратить инфекцию, но значительно ослабляет ее развитие. Например, белок нуклеопротеида вируса гриппа (NP) может выявляться на ранних стадиях инфекции на поверхности зараженных клеток, и антитела, индуцированные этим белком, могут обладать нейтрализующей активностью [3].

Открытие антител, реагирующих с консервативными эпитопами стебля гемагглютинина

<sup>\*</sup> Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio. msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM19-282, 30.12.2019.

<sup>\*\*</sup> Адресат для корреспонденции.
(stalk domain of HA), стимулировало разработку «универсальной» кандидатной вакцины против вируса гриппа, которая была успешно апробирована в доклинических исследованиях [1].

На куриных эмбрионах было показано, что включение NP в вирусоподобные частицы (ВПЧ) способствовало выработке анти-NP-антител и обеспечивало 100% защиту от летальной дозы гетерологичного штамма вируса гриппа [4]. Другим консервативным белком является матриксный белок М1, который, как и NP, вызывает эффективный Т-клеточный иммунный ответ [4, 5]. Возникновение защиты широкого спектра у мышей и птиц было продемонстрировано при экспрессии полноразмерных генов внутренних белков NP и M1 с помощью адено-, бакуло- и поксвирусных векторных систем [6, 7]. Тетрамер белка М2 образует ионно-трансмембранный канал. На поверхности вирусной частицы расположен консервативный эктодомен данного белка (23 аминокислотных остатка (а.о.), М2е), который также является перспективной мишенью для создания «универсальной» вакцины [8–10]. Вакцины на основе М2е-эпитопа способствуют развитию защиты от вируса гриппа путем антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ или ADCC) через Т-хелперные клетки и естественные киллеры, макрофаги и тучные клетки [2].

Целью данного исследования было изучение конъюгативных комплексов как платформы для усовершенствования «универсальной» субъединичной вакцины против вируса гриппа А за счет экспонирования консервативных антигенов М2е на поверхности частиц вируса табачной мозаики. Предпосылки использования ВТМ, как носителя при создании вакцины, связаны с доказанной эффективностью адъювантных [11] и иммуногенных [12] свойств этих частиц, в том числе для стимулирования устойчивого гуморального и клеточного иммунного ответа [13]. Палочковидные вирионы ВТМ являются перспективной платформой для регулярного экспонирования большого количества (до 2100 копий) эпитопов на поверхности частиц, что обеспечивает весьма эффективную реакцию иммунной системы [13-15]. Мы исследовали возможности применения химической конъюгации для создания устойчивых комплексов частиц ВТМ, содержащих на поверхности реакционноспособный лизин, с консервативным М2е-эпитопом вируса гриппа А. Белок оболочки ВТМ способен к самосборке и подробно охарактеризован с помощью методов рентгеноструктурного анализа. Кроме того, он достаточно устойчив к изменениям рН и температуры. На основе кристаллографических данных было показано, что

каждая субъединица содержит четыре участка, экспонированных наружу и подходящих для клонирования целевых последовательностей. Помимо *N*- и *C*-концевых областей, следует упомянуть две петли полипептидной последовательности, расположенные снаружи вириона (59-65 и 152-156 а.о.) [16]. Ранее реакцию биоконъюгации на *N*-конце БО проводили путем создания доступных реакционноспособных остатков, при этом вносили дополнительную аминокислотную последовательность, включающую лизин (К) с реакционноспособной NH<sub>2</sub>группой. Оптимальной оказалась последовательность аланин-аспарагиновая кислота-фенилаланин-лизин (ADFK) [15]. Этот подход позволил получать комплексы стабильных частиц ВТМ, содержащих реакционноспособный лизин, с эпитопами из цитотоксических Т-лимфоцитов, ассоциированных с антигенами меланомы p15e или Trp2. Иммунизация модифицированными частицами, содержащими оба эпитопа меланомы, показало значительно более эффективное стимулирование противораковой защиты по сравнению с применением этих же пептидов по отдельности [13].

Введение реакционноспособного лизина также позволяет биотинилировать капсид. Таким образом, частицы получают способность связываться с целевым белком, конъюгированным со стрептавидином. Фрагмент структурного белка L2 (36 a.o.) папилломавируса собак, расположенный на поверхности подобных частиц, был значительно более иммуногенным по сравнению с аналогичным «свободным» участком L2 [17]. С помощью химических реагентов *N*-гидроксисукцинимида (NHS) и 1-этил-3-(3диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) можно создавать мультивалентные вакцины с использованием двух и более антигенов, напрямую присоединяя их к генетически модифицированным частицам ВТМ. Было показано, что одновременная иммунизация мышей смесью препаратов частиц ВТМ, несущих белки ОтрА, DnaK и Tul4 из Francisella tularensis, значительно повышала уровень защитного иммунного ответа против туляремии [18]. Аналогичные результаты были получены для частиц ВТМ, содержащих реакционноспособный лизин и конъюгированных с гемагглютинином [11].

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование вектора на основе BTM, содержащего реакционноспособный лизин на *N*-конце белка оболочки. Вставка четырех кодонов, кодирующих аминокислотную последователь-

ность ADFK, была сделана с помощью ПЦР методом перекрывающихся праймеров. «Внешние» праймеры содержали сайты рестрикции для клонирования в промежуточный вектор рА4083, который содержал 3'-концевую часть кДНК ВТМ (cDNA TMV), включая ген белка оболочки (БО). ПЦР проводили в амплификаторе «Терцик» фирмы «ДНК-технология» (Россия). Для ПЦР использовали (в соответствии с протоколом производителя) Encyclo-polymerase («Евроген», Россия), обладающую экзонуклеазной активностью, которая снижает вероятность «ошибок» при амплификации. Две первоначальные параллельные ПЦР проводили с двумя парами праймеров. Первая пара: Pr Nco-mp-p (ggagggcccatggaac) и Pr ADFK-m (tactgtaagacttgaagtcagccatatttaaaacgaatccgattc), вторая пара Pr ADFK-p (gctgacttcaagtcttacagtatcactactccat) и Pr Apa-cp-m (tgggcccctaccgggggtaa). В качестве матрицы использовали плазмиду рА4083. Полученные ПЦР продукты были очищены и введены в следующую ПЦР с добавлением концевых праймеров: Pr Nco-mp-р и Pr Apa-cp-m.

Выделенный ПЦР-продукт был обработан рестриктазами NcoI и BstBI и клонирован по этим же сайтам в промежуточный вектор рА4083. Наличие вставки в конструкции рА4083-N<sub>Lys</sub> проверяли секвенированием. Далее из конструкции рА4083-N<sub>Lys</sub> вырезали фрагмент по BamHI/SaII и переносили в бинарный вектор рBIN-TMV-wt, полученный ранее в нашей лаборатории (рис. 1, *а*). Итоговая конструкция рBIN-TMV-*N*-lys содержала полноразмерную кДНК BTM (cDNA TMV) с последовательностью ADFK-пептида на *N*-конце гена белка оболочки под контролем транскрипционного промотора гена *Actin 2* из *Arabidopsis thaliana* и терминатора гена нопалинсинтазы (*nos*).

Трансформация клеток Agrobacterium tumefaciens. Агробактериальные клетки штамма GV 3101 были трансформированы полученным бинарным вектором pBIN-TMV-N-lys. Все бактериальные культуры выращивали по отдельности в жидкой среде LB с соответствующими антибиотиками при температуре роста бактерий (для A. tumefaciens 28 °C) в течение ночи на шейкере (170 качаний/мин). На следующем этапе смешивали по 100 мкл каждой из ночных бактериальных культур и высевали на чашку Петри с агаром без антибиотиков, которую инкубировали при 28 °C в течение ночи. Далее делали серию десятикратных разведений соскоба из выросшего на чашке сплошного газона бактерий и высевали на LB агар с селективными антибиотиками (канамицин 50 мкг/мл, рифампицин 50 мкг/мл, гентамицин 25 мкг/мл), после чего выращивали в течение 48 ч при 28 °С. Колонии A. tumefaciens проверяли с помощью ПЦР, используя следующие праймеры: PrCP-U1-PstI-p(actgctgcaggagtagacgacgcaacggtggccata), PrCP-U1-HindIII-m (actgaagcttcgcaccacgtgtgaattacggacacaat), PrTad23-p (gggaaaaatagtagtaatgatcggtcagtgccgaacaagaac), Pr CP-154-m (agaggtccaaaccaag).

Агроинфильтрация листьев *Nicotiana benthamiana*. Клетки агробактерий с pBIN-TMV-*N*-lys, а также агробактерии с бинарным вектором, экспрессирующим p19 с антисайленсинговой активностью из вируса карликовой кустистости томатов (*tomato bushy stunt virus*, TBSV), выращивали в течение ночи при 28 °С. Клетки осаждали при 5 000 g 5 мин и ресуспендировали в буфере для агроинфильтрации (10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MES, pH 5,6) до оптической плотности OD<sub>600</sub> = 0,5. Для агроинфильтрации выбирали листья третьего яруса сверху полуторамесячных растений. Смесь агробактерий инфильтрировали в абаксиальную часть листа с помощью шприца со снятой иглой.

Выделение мутантного вируса. Через две-три недели после инфильтрации листья приобретали признаки заражения вирусом. Инфицированные листья гомогенизировали в блендере в двух объемах 0,1 М Na-P-буфера (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,0 и 1%-ный β-меркаптоэтанол (v/v)). Растительный дебрис осаждали на препаративной центрифуге Beckman 10 мин при 13 000 g. Супернатант, содержащий вирус, осветляли с помощью хлороформа (1/4 объема); после интенсивного встряхивания в течение 20 мин препарат снова центрифугировали 10 мин при 13 000 g для разделения фаз. Водную фазу отбирали, добавляли ПЭГ<sub>6000</sub> до 4% (w/v), NaCl до 1% (w/v) и высаживали вирус при 4°C в течение ночи. На следующий день осаждали вирус в течение 10 мин при 13 000 g. Осадок ресуспендировали в 0,01M Na-P-буфере (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (рН 7,0)). После растворения осадка препарат центрифугировали для осаждения нерастворимых компонентов 5 мин при 5 000 g. Супернатант отбирали для дальнейших исследований.

Выделение РНК из растений Nicotiana benthamiana. РНК из 400 мг растительного материала (верхние листья с выраженными симптомами) выделяли по стандартной методике с помощью набора RNeasy Mini-Kit («Qiagen», Германия). РНК элюировали с колонки с помощью воды, свободной от РНКаз из упомянутого набора; количество оценивали спектрофотометрически при OD<sub>260</sub>.

Вестерн-блот анализ. После разделения в градиентном (8–20%) полиакриламидном геле (ПААГ) белки переносили на PVDF мембрану (Hybond-P, «Amersham») в буфере для переноса (25 мМ Tris, 0,192 М глицин, этанол 10% (v/v)).



**Рис. 1.** Конструирование, выделение и очистка генетически модифицированных вирусных частиц. *а* – Схематическое изображение конструкции бинарного вектора pTMV- *N*-lys, полученного путем вставки ADFK в бинарный вектор pTMVwt на основе плазмиды pBin19. Обозначения: PHK-зависимая PHK-полимераза (TMV-U1); RdRp (RNA-depended RNApolymerase); Act2 – промотер гена *Actin 2* из *Arabidopsis thaliana*; NPT – neomycin phosphotransferase (неомицин фототрансфераза, ген устойчивости к канамицину); LB, RB – левая и правая границы T-ДHK соответственно (left, right borders); MP– транспортный белок BTM, CP – белок оболочки, ADFK – вставка в CP, содержащая реакционно-способный лизин (K); *б* – растение *Nicothiana benthamiana* с системными симптомами, вызванными рекомбинантным вирусом TMV-*N*-lys через 10 дней после инокуляции (д.п.и.); *в* – электрофоретический анализ в градиентном 8–20% полиакриламидном геле (ПААГ) растительных экстрактов из контрольного незараженного (*1*) и зараженного TMV-*N*-lys умастиц TMV-*N*-lys; MR – набор белковых маркеров, цифры перед стрелками указывают мол. массы в кДа. Дорожка *3* – TMV-*N*-lys, 10 мкг. С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/ biokhsm/

Далее мембраны блокировали 5% (w/v) обезжиренным молоком в течение 1 ч при комнатной температуре в TBS-Tween буфере (TBS-T; 150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl, Tween 20 0,1% (v/v), pH 8,0). После промывки в TBS-Т мембраны инкубировали в том же буфере с 2,5% (w/v) раствором молока, добавляя первичные мышиные антитела к ВТМ (получены на кафедре вирусологии МГУ путем трех внутримышечных иммунизаций по 500 мкг белка на одну инъекцию через двухнедельные интервалы, разведение 1 : 5000) или специфические IgG к BTM (SRA 57400/1000, «Agdia», США), а также первичные антитела мыши к М2е-пептиду (получены на кафедре вирусологии МГУ путем трех внутримышечных иммунизаций мышей по 300 мкг белка на одну инъекцию через недельные интервалы с использованием адъюванта, разведение 1 : 20 000 [9]). После трех промывок мембран в буфере TBS-T, каждая по 5 мин, проводили инкубацию со вторичными антимыши-

БИОХИМИЯ том 85 вып. 2 2020

ными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена («Sigma») в разведении 1 : 15 000 в течение часа. Последующие промывки проводили в TBS-T 3 раза по 5 мин. Активацию пероксидазы хрена проводили с помощью набора реактивов ECL («Amersham»). Хемилюминисцентный сигнал детектировали на рентгеновской пленке.

Электронная микроскопия. Препараты вируса наносили на металлические сетки с карбоновой пленкой («Ted Pella», США) для электронной микроскопии, затем промывали водой MilliQ и контрастировали подкисленным раствором 2%-ного уранилацетата (w/v).

Непрямой иммуноферментный анализ (ИФА). Препараты вирусных частиц (TMV-*N*-lys, 200 нг) инкубировали в течение ночи при 4 °С в планшетах («Nunc MaxiSorb», Дания). Для блокировки лунок планшеты инкубировали с раствором PBS-T, содержащим 2%-ный БСА (w/v) (1 ч при комнатной температуре). Далее добавляли первичные мышиные антитела к ВТМ или к DHFR-M2e в буфере PBS-T при разведении 1:15 000 и 1:20 000 соответственно; инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Инкубацию со вторичными антимышиными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена («Sigma», разведение 1:15 000), проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли раствор субстрата ABTS («MP Biomedicals», Франция) 0,04% (w/v) в 50 mM фосфатно-цитратном буфере, содержащем 0,009% (v/v) перекиси водорода. Оптическую плотность регистрировали при 405 нм спустя 10, 20 и 40 мин [9].

Биоконъюгация рекомбинантных белков и вирусных частиц с помощью EDC/NHS. К очищенному вирусному препарату частиц TMV-*N*-lys в концентрации 10 мкг/мкл добавляли диализованный белок с концентрацией 20 мкг/мкл в 0,1M PBS-буфере. В смесь добавляли последовательно 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) и *N*-гидроксисукцинимид (NHS) до конечной концентрации 5мM каждого реагента. Реакцию биоконъюгации осуществляли в течение 30 мин при комнатной температуре с последующей инкубацией при 4 °C и энергичном перемешивании в течение 2 ч [19].

Динамическое рассеяние света (DLS). Для установления размера вирусных частиц или их комплексов с белком использовали метод, основанный на измерении гидродинамического диаметра по величине коэффициента диффузии (уравнение Стокса–Энштейна). Проводили по 50 измерений каждой пробы на устройстве Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments Ltd», Великобритания) с гелий-неоновым лазером (633 нм) в соответствии с протоколом фирмыпроизводителя. Обработку измерений осуществляли с помощью встроенного программного обеспечения Dispersion Technology Software (DTS) version 5.10.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование, выделение и очистка генетически модифицированных вирусных частиц, содержащих реакционноспособный лизин. При создании вирусного вектора на основе полноразмерной кДНК ВТМ, содержащей реакционноспособный лизин на *N*-конце белка оболочки (СР), использовали аминокислотную последовательность пептида аланин-аспарагиновая кислота-фенилаланин-лизин (ADFK), которая позволяет экспонировать реакционноспособный лизин (К) на поверхности частиц ВТМ [15]. Нуклеотидная последовательность, кодирующая пептид ADFK, была оптимизирована для



Рис. 2. Электрофоретический анализ в 2%-ном агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР анализа выделенных РНК. МК маркеры, цифры слева от стрелок указывают молекулярную массу в нуклеотидах (нт). Дорожка *1*— TMV-U1, отрицательный контроль на наличие вставки последовательности ADFK; дорожка *2*— частицы TMV-*N*-lys; наличие полосы размером 600 нт свидетельствует о наличии вставки. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/ journal/biokhsm/

экспрессии в растениях. Оптимизацию проводили на основе данных о частоте использования различных кодонов у *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* и двух вирусных белков оболочки, которые эффективно накапливаются при инфекции растений вирусами *Tobacco mosaic virus*, TMV-U1 (BTM) и *Alternanthera mosaic virus*, AltMV-MU [9]. Для клонирования был выбран компромиссный вариант нуклеотидной последовательности (GCU=A; GAC=D; UUC=F; AAG=K).

Для введения последовательности чужеродного пептида, содержащей *N*-концевой лизин, в ген белка оболочки ВТМ, использовали метод ПЦР с перекрывающимися фрагментами. Сиквенс промежуточного продукта подтвердил последовательность мутантного белка оболочки с *N*-концевой вставкой ADFK. Далее полученный фрагмент СР<sub>АДЕК</sub> встраивали в бинарный вектор рТМV-wt; итоговый вектор рТМV-N-lys трансформировали в агробактерию (рис. 1, а). Для анализа стабильности бинарного вектора рТМV-*N*-lys в агробактерии проводили ПЦРскрининг образовавшихся колоний со специфическими праймерами. Далее двухнедельные растения Nicotiana benthamiana были инфильтрированы полученной агробактериальной культурой.

Через 10 дней после инокуляции (10 д.п.и.) наблюдали первые выраженные симптомы в виде желтых хлорозов и скручивания верхних неинокулированных (системных) листьев с последующей деформацией (сгибанием) верхней час-

ти стебля (рис. 1, б). На 14-й день после заражения системные листья были собраны для дальнейшего анализа. Электрофорез белков растительного экстракта показал наличие основной полосы с подвижностью ~21 кДа, отсутствующей в контрольном неинокулированном растении (рис. 1, в). Далее материал из зараженных вектором TMV-N-lys листьев использовали для выделения вирусных частиц методом осаждения полиэтиленгликолем (ПЭГ) с последующей очисткой ультрацентрифугированием и анализом с помощью электрофореза в градиентном ПААГ (рис. 1, г). Было показано наличие единственного белка с электрофоретической подвижностью ~21 кДа, приблизительно соответствующей размеру БО TMV-N-lys.

Для подтверждения генетической стабильности полученного вектора и наличия вставки ADFK в геноме рекомбинантного вируса TMV-*N*-lys из препарата очищенных частиц с помощью RNeasy Mini-Kit («Qiagen», Германия) была выделена вирусная PHK. Полученные препараты проверяли с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), используя праймеры, специфичные к нуклеотидной последовательности ADFK. В качестве отрицательного контроля использовали частицы BTM дикого типа (TMVwt). Анализ продуктов ОТ-ПЦР с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле подтвердил наличие продукта в препарате химерных частиц TMV-*N*-lys и генетическую стабильность вирусного вектора (рис. 2).

Стабильность структуры сформированных химерных вирусных частиц TMV-N-lys была проверена с помощью электронной микроскопии (рис. 3,  $\delta$ ). Было выявлено, что частицы имеют размеры, сходные с частицами BTM дикого типа, однако слегка отличаются от них морфологически за счет менее компактной структуры, приводящей к «изогнутой» геометрии вирионов.



**Рис. 3.** Получение и характеристика комплексов «вирион–белок». a – Схема реакции биоконъюгации частиц TMV-N-lys и DHFR-M2e с использованием химических реагентов EDC и NHS; оптимизацию условий проводили с учетом рекомендаций производителя реактива NHS, а также с учетом ранее опубликованной методики [19];  $\delta$  – электронная микрофотография препарата очищенных вирусных частиц TMV-N-lys; увеличение в 30 000 раз; масштабная линейка указана в правом нижнем углу; негативное контрастирование с помощью 2%-ного уранилацетата; e – электронная микрофотография комплексов «вирион–белок»; увеличение в 10 000 раз; масштабная линейка указана в правом нижнем углу; негативное контрастирование с помощью 2%-ного уранилацетата.

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

Характеристика комплексов «вирион-белок». На следующем этапе проводили химическое связывание частиц TMV-*N*-lys, содержащих реакционноспособный лизин на *N*-конце белка оболочки, и целевого антигена вируса гриппа. Для реакции биоконъюгации использовали очищенные частицы TMV-*N*-lys в концентрации 10 мкг/мкл и белок, содержащий консервативный эпитоп вируса гриппа А. Этот рекомбинантный белок, состоящий из дигидрофолатредуктазы мыши (DHFR), слитой с консервативным эпитопом вируса гриппа M2e (DHFR-M2e) (25,5 кДа), был ранее выделен в нашей лаборатории путем экспрессии в *E. coli* с последующей очисткой на Ni-NTA агарозе [9].

Рекомбинантный белок был диализован против воды (MilliQ) и подвергнут химическим преобразованиям. В отличие от ранее опубликованной работы [18], использованная нами методика предполагает последовательное преобразование свободных СООН-групп рекомбинантных белков в активированный эфир карбоновой кислоты под действием 5 mM *N*-Cyclohexyl-*N*-(2-morpholinoethyl)carbodiimide-metho-p-tolue-



**Рис. 4.** Характеристика с помощью вестерн-блот анализа комплексов «вирион-белок», полученных при конъюгации белка DHFR-M2e с частицами TMV-*N*-lys. *I* – БО BTM (положительный контроль); *2* – рекомбинантный белок DHFR-M2e; *3* – образовавшиеся комплексы TMV-*N*-lys и DHFR-M2e. *a* – Инкубация мембраны с первичными антителами к BTM в разведении 1 : 15 000; *б* – инкубация мембраны с первичными антителами к BTM в разведении 1 : 15 000; *б* – инкубация мембраны с первичными антителами к DHFR-M2e (1 : 10 000). С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

nesulfonate, аналога EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide), с последующим их преобразованием в NHS-промежуточный эфир под действием 1 mM N-hydroxysuccinimide (NHS). В процессе реакции NHS с карбоновой кислотой полученный активированный эфир карбоновой кислоты реагирует с аминогруппой, образуя амид карбоновой кислоты. Аминогруппы представлены *N*-концевыми лизинами на поверхности химерных частиц TMV-*N*-lys. Временные и температурные условия проведения реакции приведены на рис. 3, а. Для выработки наиболее эффективного метода конъюгации проводили серию экспериментов с использованием химических реагентов (EDC, NHS) и буферных растворов. В ходе исследования выяснилось, что наиболее эффективное связывание белка с вирусной частицей происходит в PBSбуфере с одновременным использованием обоих реагентов, EDC и NHS. Полученные комплексы анализировали с помощью электронной микроскопии (рис. 3, в), а также электрофореза в ПААГ.

Комплексы также проверяли с помощью Вестерн-блот анализа для подтверждения того, что высокомолекулярные продукты содержат как частицы TMV-*N*-lys, так и антиген DHFR-M2e. Для этого, после проведения электрофореза комплексов и переноса белков на мембрану PVDF, проводили инкубацию со специфичными сыворотками к белку оболочки BTM или к DHFR-M2e, полученными ранее в нашей лаборатории [9]. Наличие высокомолекулярных полос, имеющих приблизительно одинаковую подвижность, подтверждает факт успешной конъюгации белка с вирусной частицей (рис. 4, *a*, *б*).

Далее осуществляли дополнительные проверки стабильности комплексов. С помощью метода динамического рассеяния света проводили по 50 измерений каждой пробы с комплексами или контролями. Во избежание негативного влияния гетероцикла NHS реакции конъюгации проводили только с участием EDC и при комнатной температуре в течение ночи. После всех измерений и обработки данных во встроенной компьютерной программе были проанализированы полученные графики (рис. 5). Можно сделать вывод, что при смешивании вирусных частиц с белком без реакции биоконъюгации размер полученных комплексов варьирует в пределах 10-150 нм, а измерение проб с EDC показало сдвиг в высокомолекулярную область, где значения достигали уже ~2000 нм. Для доказательства того, что высокомолекулярные соединения являются продуктами конъюгации вирусных частиц с белком, а не связывания каждого из компонентов с самим



**Рис. 5.** Характеристика полученных комплексов TMV-*N*-lys с DHFR-M2e с помощью метода динамического рассеяния света. a -Смесь частиц TMV-*N*-lys с DHFR-M2e до реакции биоконъюгации;  $\delta -$  комплексы частиц TMV-*N*-lys с DHFR-M2e, полученные с помощью биоконъюгации; e - отрицательный контроль: комплексы TMV-*N*-lys с частицами TMV-*N*-lys; e - отрицательный контроль: комплексы DHFR-M2e. С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

собой, были поставлены контрольные эксперименты. Комплексы TMV-*N*-lys—TMV-*N*-lys имели размеры от 100 до 800 нм (пик в области 350 нм), а в случае DHFR-M2e—DHFR-M2e размеры комплексов не превышали 300 нм. Исходя из этого, можно утверждать, что в результате реакции конъюгации действительно образуются комплексы TMV-*N*-lys—DHFR-M2e, размеры которых существенно отличаются от контролей.

Еще одним доказательством наличия стабильных комплексов стали результаты косвенного (непрямого) иммуноферментного анализа (ИФА). Планшеты с нанесенными в лунки пробами (трехкратные повторы) инкубировали в течение ночи при 4 °С. Последовательность нанесения препаратов отражена на рис. 6. На следующий день к пробам добавляли первичные антитела к BTM или DHFR-M2e, дальнейшие действия проводили согласно стандартной методике непрямого иммуноферментного анали-Использование вторичных антител и 32 субстрата ABTS позволило визуализировать ферментативную реакцию, приводящую к дифференциальному окрашиванию образцов. Для обработки результатов ИФА планшет с пробами подвергали измерениям в микробиологическом

анализаторе («Thermo Scientific», «Multiskan FC») при длине волны 405 нм с интервалами 10, 20 и 40 мин. Статистическая обработка данных показала, что сигнал, соответствующий комплексам TMV-N-lys с DHFR-M2e, инкубированным с антителами к ВТМ, был почти в полтора раза слабее, чем в случае смеси этих же частиц с белком без проведения реакции биоконъюгации. Можно предположить, что в результате реакции конъюгации и образования комплексов частицы вируса практически полностью покрываются белком DHFR-M2e, из-за чего связывание антител к ВТМ с вирусными частицами происходит менее эффективно, чем при простом смешивании двух компонентов (вириона и белка). При этом сигнал тех же проб, инкубированных с антителами к DHFR-M2e, был практически идентичен как для комплексов, так и для смеси, что может указывать на равномерное покрытие вирусных частиц белком.

Таким образом, можно утверждать, что структура полученных комплексов вирусных частиц TMV-*N*-lys с экспонированным на поверхности эпитопом M2e вируса гриппа является стабильной; это позволяет использовать данные комплексы для иммунизации животных с дальнейшим совершенствованием существующих кан-



**Рис. 6.** Характеристика комплексов вирусных частиц TMV-*N*-lys с белком DHFR-M2е методом непрямого иммуноферментного анализа. Приведены результаты ИФА и статистической обработки данных, полученные в трех независимых экспериментах. a - Пробы, инкубированные с антителами к BTM;  $\delta - пробы$ , инкубированные с антителами к DHFR-M2e; TMV-*N*-lys + DHFR-M2e – смесь двух компонентов (вирион + белок) в эквимолярных количествах. С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/ biokhsm/

дидатных «универсальных» вакцин против вируса гриппа A [9, 20].

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время, основываясь на литературных данных, можно с уверенностью говорить о ряде преимуществ использования ВТМ как безопасной платформы для создания мультивалентных вакцин на основе биокомплексов вирион—белок для борьбы с широким спектром заболеваний человека и животных.

Иммуногенные свойства ВТМ дикого типа подробно исследовали на протяжении многих лет [12]. Недавно было доказано, что вирионы ВТМ способны успешно играть роль адъюванта, в том числе, при повторных иммунизациях [11]. Использование частиц ВТМ в качестве носителя антигенных белков и пептидов неизбежно приводит к появлению в крови соответствующих антител. Следует отметить, что упомянутые антитела не являются «мусорными». Согласно данным Liu et al. [21], наличие антител к ВТМ в крови курильщиков коррелирует с пониженным риском возникновения болезней Паркинсона и Альцгеймера [21]. Кроме того, присутствие таких антител практически не оказывает влияния на эффективность дальнейшей вакцинации [11]. Таким образом, предполагаемая вакцина на основе биокомплексов вирион—белок является полифункциональной, поскольку антитела против целевого пептида дополняются «полезными» антителами против частицы-носителя.

Форма частиц, применяемых при иммунизации, имеет большое значение. Синтетические полимерные наночастицы мицеллярной формы дольше циркулируют в организме по сравнению с аналогичными сферическими частицами. Предполагают, что данный эффект может быть связан с менее эффективным захватом протяженных частиц мононуклеарными фагоцитами [22]. Аналогичный результат был получен с наночастицами из золота [23]. Иммунизация мышей частицами ВТМ дикого типа (длина 300 нм) и сферическими частицами (диаметр ~50 нм), полученными при температурной модификации вирионов ВТМ, показала, что выведение сферических частиц из организма происходит заметно

быстрее по сравнению с палочковидными частицами [14].

Очевидно, что рекомбинантные субъединичные вакцины обладают потенциальными преимуществами безопасности по сравнению с инактивированными или живыми ослабленными вакцинами. Текущие исследования по разработке субъединичной вакцины против туляремии выявили ряд антигенов F. tularensis, которые способны индуцировать частичный защитный иммунный ответ [24, 25]. Было показано, что протективность вакцин усиливается, когда в их составе используются множественные антигены [26]. Серьезной проблемой при разработке поливалентных субъединичных вакцин остается несовершенство подходов для эффективной доставки таких антигенов через слизистые пути. Напротив, индукция надежного иммунного ответа без использования адъювантов является существенной предпосылкой для внедрения новой стратегии вакцинации с помощью биоконъюгированного ВТМ.

Для определения потенциала создания мультивалентной вакцины применяют два различных подхода: а) создание вакцинных композиций, состоящих из набора всех целевых белков, конъюгированных с одним вирионом ВТМ (моноконъюгатная ВТМ вакцина); или б) использование смеси, состоящей из каждого белка, индивидуально конъюгированного со «своей» частицей ВТМ (поликонъюгатная ВТМ вакцина). Обе вакцинные композиции приводят к образованию антител против всех рекомбинантных белков, при этом процедуры очистки и/или биоконъюгации не изменяют конформацию нативных эпитопов. Сравнение иммунных ответов для моно- и поликонъюгатных композиций показало, что иммобилизация всех белков на одной частице не является оптимальным подходом, а связывание антигенов в эквимолярной концентрации с ВТМ обеспечивает эффективную доставку множества антигенов [18]. ВТМконъюгатная вакцина является безопасной, и ее можно вводить мышам многократными дозами без каких-либо побочных реакций [27]. Для создания эффективной поликонъюгатной вакцины можно использовать различные консервативные антигены вируса гриппа, в том числе белки M1 и NP, а также консервативный «стебель» гемагглютинина (НА).

Другой подход к созданию субъединичной поливалентной вакцины может быть связан с комбинированием генетических модификаций и химической конъюгации в рамках одной химерной частицы ВТМ. Для создания химерных частиц на основе генома вируса табачной мозаики чужеродная последовательность клонируется в открытую рамку трансляции гена белка оболочки. Ранее было показано, что такие частицы могут обеспечивать защиту против вирусов гриппа А [9, 20], папилломы [28], ящура [29], а также применяться в противораковой терапии [30, 31]. Например, частицы TMV-M2e-ala и TMV-M2e-ser, созданные ранее в нашей лаборатории, содержали до 90% рекомбинантного белка в очищенных препаратах химерных частиц. При внутрибрюшинной иммунизации мышей соотношение антител, специфичных к эпитопу и носителю, составляло 5:1, что свидетельствует об их стабильности в организме животного и значительно превышает показатели, достигнутые ранее (примерно 1:1) [30, 32]. Нановакцина TMV-M2e-ala обеспечивала защиту от пяти летальных доз гомологичного и гетерологичного штаммов вируса гриппа А. Для противогриппозных вакцин подобного типа достигнутый показатель протективности является очень высоким. Предполагается, что использование полученных нами и описанных в данной статье конъюгированных комплексов белок-вирион позволит дополнительно повысить эффективность вакцинации за счет генерации мощных гуморальных и клеточно-опосредованных иммунных ответов. Кроме того, в перспективе возможно использование комбинаций химерных частиц и полученных комплексов в разных соотношениях с целью повышения эффективности мультивалентных «универсальных» вакцин против гриппа [9].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной статье нет исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди или животные.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Krammer, F. (2016) Novel universal influenza virus vaccine approaches, *Cur. Opin. Virology*, **17**, 95–103, doi: 10.1016/ j.coviro.2016.02.002.
- Deng, L., Cho, K.J., Fiers, W., and Saelens, X. (2015) M2e-based universal influenza a vaccines, *Vaccines*, 3, 105–136, doi: 10.3390/vaccines3010105.

 Virelizier, J.L., Allison, A.C., Oxford, J.S., and Schild, G.C. (1977) Early presence of ribonucleoprotein antigen on surface of influenza virus-infected cells, *Nature*, 266, 52–54, doi: 10.1038/266052a0.

4. Xue, C., Tian, G., Chen, X., Liu, Q., Ma, J., Xu, S., Li, X., Chen, H., and Cao, Y. (2015) Incorporation of conserved

nucleoprotein into influenza virus-like particles could provoke a broad protective immune response in BALB/c mice and chickens, *Virus Res.*, **195**, 35–42, doi: 10.1016/j.virus-res.2014.09.018.

- Gotch, F., McMichael, A., Smith, G., and Moss, B. (1987) Identification of viral molecules recognised by influenza specific human cytotoxic T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 165, 401–416, doi: 10.1084/jem.165.2.408.
- Boyd, A.C., Ruiz-Hernandez, R., Peroval, M.Y., Carsona, C., Balkissoonb, D., Staines, K., Turner, A.V., Hill, A.V.S., Gilbert, S.C., and Butter, C. (2013) Towards a universal vaccine for avian influenza: protective efficacy of modified vaccinia virus Ankara and Adenovirus vaccines expressing conserved influenza antigens in chickens challenged with low pathogenic avian influenza virus, *Vaccine*, **31**, 670–675, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.11.047.
- Pushko, P., Pearce, M.B., Ahmad, A., and Tretyakova, I. (2011) Influenza virus-like particle can accommodate multiple subtypes of hemagglutinin and protect from multiple influenza types and subtypes, *Vaccine*, 29, 5911–5918, doi: 10.1016/j.vaccine.2011.06.068.
- Fiers, W., De Filette, M., Bakkouri, K., Schepens, B., Roose, K., Schotsaert, M., Birkett, A., and Saelens, X. (2009) M2e-based universal influenza A vaccine, *Vaccine*, 27, 6280–6283, doi: 10.1016/j.vaccine.2009.07.007.
- Petukhova, N.V., Gasanova, T.V., Stepanova, L.A., Rusova, O.A., Potapchuk, M.V., Korotkov, A.V., Skurat, E.V., Tsybalova, L.M., Kiselev, O.I., Ivanov, P.A., and Atabekov, J.G. (2013) Immunogenicity and protective efficacy of candidate universal influenza A nanovaccines produced in plants by tobacco mosaic virus-based vectors, *Curr. Pharm. Des.*, **19**, 5587–5600, doi: 10.2174/ 13816128113199990337.
- Stepanova, L.A., Kotlyarov, R.Y., Kovaleva, A.A., Potapchuk, M.V., Korotkov, A.V., Sergeeva, M.V., Kasianenko, M.A., Kuprianov, V.V., Ravin, N.V., Tsybalova, L.M., Skryabin, K.G., Kiselev, O.I. (2015) Protection against multiple influenza A virus strains induced by candidate recombinant vaccine based on heterologous M2e peptides linked to flagellin, *PLoS One*, **10**, e0119520, doi: 10.1371/journal.pone.0119520.
- Mallajosyula, J.K., Hiatt, E., Hume, S., Johnson, A., Jeevan, T., Chikwamba, R., Pogue, G.P., Bratcher, B., Haydon, H., Webby, R.J., and McCormick, A.A. (2014) Single-dose monomeric HA subunit vaccine generates full protection from influenza challenge, *Hum. Vaccin. Immunother.*, **10**, 586–595, doi: 10.4161/hv.27567.
- Van Regenmortel, M.H. (1999) The antigenicity of tobacco mosaic virus, *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 354, 559–568, doi: 10.1098/rstb.1999.0407.
- McCormick, A.A., Corbo, T.A., Wykoff-Clary, S., Palmer, K.E., and Pogue, G.P. (2006) Chemical ocnjugate TMV-peptide bivalent fusion vaccines improve cellular immunity and tumor protection, *Bioconjugate Chem.*, 17, 1330-1338, doi: 10.1021/bc060124m.
- Bruckman, M.A., Randolph, L.N., VanMeter, A., Hern, S., Shoffstall, A.J., Taurog, R.E., and Steinmetz, N.F. (2014) Biodistribution, pharmacokinetics, and blood compatibility of native and PEGylated tobacco mosaic virus nanorods and -spheres in mice, *Virology*, **449**, 163–173, doi: 10.1016/j.virol.2013.10.035.
- Smith, M.L., Lindbo, J.A., Dillad-Telm, S., Brosio, P.M., Lasnik, A.B., McCormick, A.A., Nguyen, L.V., and Palmer, K.E. (2006) Modified tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications, *Virology*, **348**, 475–488, doi: 10.1016/ j.virol.2005.12.039.
- 16. Gasanova, T.V., Petukhova, N.V., and Ivanov, P.A. (2016) Chimeric particles of tobacco mosaic virus as a platform for

the development of next-generation nanovaccines, *Nanotechnologies in Russia*, **11**, 227–236, doi: 10.1134/S1995078016020051.

- Lee, S.Y., Royston, E., Culver, J.N., and Harris, M.T. (2005) Improved metal cluster deposition on a genetically engineered tobacco mosaic virus template, *Nanotechnology*, 16, 435–441, doi: 10.1088/0957-4484/16/7/019.
- Banik, S., Mansour, A.A., Suresh, R.V., Wykoff-Clary, S., Malik, M., McCormick, A.A., and Bakshi, C.S. (2015) Development of a multivalent subunit vaccine against tularemia using tobacco mosaic virus (TMV) based delivery system, *PLoS One*, **10**, e0130858, doi: 10.1371/journal.pone.0130858.
- Narain, R. (2014) Chemistry of bioconjugates: synthesis, characterization, and biomedical applications, doi: 10.1002/ 9781118775882.
- Petukhova, N.V., Gasanova, T.V., Ivanov, P.A., and Atabekov, J.G. (2014) High-level systemic expression of conserved influenza epitope in plants on the surface of rodshaped chimeric particles, *Viruses*, 6, 1789–1800, doi: 10.3390/v6041789.
- Liu, R., Vaishnav, R.A., Roberts, A.M., and Friedland, R.P. (2013) Humans have antibodies against a plant virus: evidence from tobacco mosaic virus, *PLoS One*, e60621, doi: 10.1371/journal.pone.0060621.
- Geng, Y., Dalhaimer, P., Cai, S.S., Tsai, R., Tewari, M., Minko, T., and Discher, D.E. (2007) Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery, *Nat. Nanotechnol.*, 2, 249–255, doi: 10.1038/nnano.2007.70.
- 23. Arnida, Janát-Amsbury M.M., Ray, A., Peterson, C.M., and Ghandehari, H. (2011) Geometry and surface characteristics of gold nano particles influence their biodistribution and uptake by macrophages, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **77**, 417–423, doi: 10.1016/j.ejpb.2010.11.010.
- Huntley, J.F., Conley, P.G., Rasko, D.A., Hagman, K.E., Apicella, M.A., and Norgard, M.V. (2008) Native outer membrane proteins protect mice against pulmonary challenge with virulent type A *Francisella tularensis, Infect Immun.*, 76, 3664–3671, doi: 10.1128/IAI.00374-08.
- Apicella, M.A., Post, D.M., Fowler, A.C., Jones, B.D., Rasmussen, J.A., Hunt, J.R. Imagawa, S., Choudhury, B., Inzana, T.J., Maier, T.M., Frank, D.W., Zahrt, T.C., Chaloner, K., Jennings, M.P., McLendon, M.K., and Gibson, B.W. (2010) Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisella tularensis*, *PLoS One*, 5, e11060, doi: 10.1371/journal.pone.0011060.
- Huntley, J.F., Conley, P.G., Hagman, K.E., and Norgard, M.V. (2007) Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins, *J. Bacteriol.*, 189, 561–574, doi: 10.1128/JB.01505-06.
- Mallajosyula, J.K., Jeevan, T., Chikwamba, R., Webby, R.J., and McCormick, A.A. (2016) A single dose TMV-HA vaccine protects mice from H5N1 Influenza challenge, *Intern. J. Vaccine Res.*, 1, 6, doi: 10.15226/2473-2176/1/2/00106.
- Palmer, K.E., Benko, A., Doucette, S.A., Cameron, T.I., Foster, T., Hanley, K.M., McCormick, A.A., McCulloch, M., Pogue, G.P., Smith, M.L., and Christensen, N.D. (2006) Protection of rabbits against cutaneous papillomavirus infection using recombinant tobacco mosaic virus containing L2 capsid epitopes, *Vaccine*, 24, 5516–5525, doi: 10.1016/j.vaccine.2006.04.058.
- Jiang, L., Li, Q., Li, M., Zhou, Z., Wu, L., Fan, J., Zhang, Q., Zhu, H., and Xu, Z. (2006) A modified TMV-based vector facilitates the expression of longer foreign epitopes in tobacco., *Vaccine*, 24, 109–115, doi: 10.1016/j.vaccine. 2005.09.060.
- 30. Fitchen, J., Beachy, R.N., and Hein, M.B. (1995) Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine

epitope elicits autoantibody response, *Vaccine*, **13**, 1051–1057, doi: 10.1016/0264-410x(95)00075-c.

- Frolova, O.Y., Petrunia, I.V., Komarova, T.V., Kosorukov, V.S., Sheval, E.V., Gleba, Y.Y., and Dorokhov, Y.L. (2010) Trastuzumab-binding peptide display by tobacco mosaic virus, *Virology*, **407**, 7–13, doi: 10.1016/j.virol.2010. 08.005.
- Koo, M., Bendahmane, M., Lettieri, G.A., Paoletti, A.D., Lane, T.E., Fitchen, J.H., Buchmeier, M.J., and Beachy, R.N. (1999) Protective immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by intranasal or subcutaneous administration of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 7774–7779, doi: 10.1073/pnas.96.14.7774.

## COMPLEXES FORMED *via* BIOCONJUGATION OF GENETICALLY MODIFIED TMV PARTICLES WITH CONSERVED INFLUENZA A VIRUS ANTIGEN: SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION\*

### T. V. Gasanova<sup>\*\*</sup>, A. A. Koroleva, E. V. Skurat, and P. A. Ivanov

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia; E-mail: tv.gasanova@gmail.com

Received September 30, 2019 Revised November 8, 2019 Accepted November 16, 2019

Genetically modified tobacco mosaic virus (TMV) particles were conjugated with the recombinant protein carrying conserved M2e epitope of influenza A virus. The TMV-N-lys viral vector was generated based on the TMV-UI genome by inserting reactive lysine (lys) residue into the N-terminal fragment of the coat protein (CP) displayed on the particle surface. Nicotiana benthamiana plants were agroinfiltrated with the agrobacteria transformed with the pBIN-TMV-N-lys vector, and TMV-N-lys virions were then isolated from the extracts of non-inoculated leaves. Analysis of the TMV-N-lys preparations by PAGE demonstrated the presence of a protein with the electrophoretic mobility of ~21 kDa. Electron microscopy of the TMV-N-lys preparations confirmed stability of the modified viral particles. TMV-N-lys particles were conjugated with the recombinant protein DHFR-M2e containing the M2e antigen of influenza A virus using 5 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) and 1 mM N-hydroxysuccinimide (NHS). Formation of complexes between the recombinant protein and modified TMV-N-lys particles was confirmed by Western blotting. The diameter of the obtained conjugates was virtually indistinguishable from the diameter of original TMV-N-lys virions, but the conjugates formed a highly organized extensive network with electron-dense grains. Dynamic light scattering revealed that the individual peaks corresponding to the TMV-N-lys complexes with DHFR-M2e were shifted relative to those of the original TMV-N-lys virions. Indirect enzyme immunoassay using TMV- and M2e-specific antibodies demonstrated that the complex was stable during the long-term adsorption. Our results suggest that the obtained virion-protein complex could be used for improving the properties of the universal influenza virus vaccine candidates.

Keywords: bioconjugation, tobacco mosaic virus (TMV), genetically modified particles, influenza A, multivalent nanovaccine

УДК 577.124

# ИЗМЕНЕНИЯ В ЭКСПРЕССИИ КОНЦЕВЫХ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ЗВЕНЬЕВ И ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ ЦЕПИ ПОЛИ-*N*-АЦЕТИЛЛАКТОЗАМИНА В ЛИПОПОЛИСАХАРИДЕ *Helicobacter pylori* ПРИ КОЛОНИЗАЦИИ МАКАК-РЕЗУС\*

### © 2020 А.В. Перепелов\*\*, С.Н. Сенченкова, Ю.А. Книрель

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991 Москва, Россия; электронная почта: andreivperepelov@gmail.com

> Поступила в редакцию 04.10.2019 После доработки 29.11.2019 Принята к публикации 30.11.2019

Helicobacter pylori является важным патогеном человека, вызывая гастриты, язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, а также может быть причиной рака желудка. О-полисахариды, входящие в состав липополисахаридов (ЛПС) *H. pylori*, построены из ( $\beta 1 \rightarrow 3$ )-поли-*N*-ацетиллактозамина (polyLacNAc), различным образом замещенного остатками α-L-фукозы. Во многих штаммах концевые звенья LacNAc являются моноили ди-фукозилированными, таким образом представляя собой олигосахариды Льюис X (Le<sup>x</sup>) и/или Льюис Y (Le<sup>y</sup>). Ранее при исследовании на макаках-резус как модели инфекции, вызываемой *H. pylori* у человека, обнаружена адаптация бактерий к организму хозяина за счет экспрессии ими антигенов Льюис в ходе колонизации. В настоящей работе охарактеризованы ЛПС штаммов H. pylori, использовавшихся ранее, включая родительский штамм J166 и три дочерних штамма 98-149, 98-169 и 98-181, полученных от макак-резус после длительной колонизации. Анализы химическими методами и спектроскопией ЯМР показали, что родительский штамм продуцирует концевые олигосахаридные звенья Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup> и Н типа 1. Дочерние штаммы оказались сходными с родительским по присутствию одинаковой олигосахаридной области (кора) ЛПС и фукозилированию внутренних звеньев LacNAc цепи polyLacNAc, но различались по строению концевых олигосахаридных звеньев. Le<sup>x</sup> присутствовал в обезьяньих изолятах 98-149 и 98-169 из животного-хозяина с фенотипом Le<sup>a</sup>, а Le<sup>y</sup> был обнаружен в изоляте 98-181 из обезьяны с фенотипом Le<sup>b</sup>. Так как Le<sup>a</sup> и Le<sup>b</sup> являются изомерами Le<sup>x</sup> и Le<sup>y</sup> соответственно, то такая корреляция подтверждает адаптацию экспрессии терминальных олигосахаридных звеньев в штаммах H. pylori к индивидуальным особенностям слизистой оболочка желудка организма-хозяина. Штамм 98-181 приобрел также способность к глюкозилированию цепи polyLacNAc. Отметим, что этот штамм отличался низким содержанием фукозы во внутренних звеньях LacNAc (внутренний Le<sup>x</sup>) вследствие декорирования polyLacNAc остатками β-глюкопиранозы, что также могло играть роль в адаптации бактерий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** *Helicobacter pylori*, липополисахарид, *О*-полисахарид, поли(*N*-ацетиллактозамин), глюкозилирование, экспрессия антигенов Льюиса, бактериальная адаптация, макака-резус. **DOI:** 10.31857/S0320972520020104

Бактерия *Helicobacter pylori* — важный патоген, вызывающий хронические гастриты у людей [1]. Инфекции, связанные с этой бактерией, имеют широкий спектр клинических проявлений [1, 2], включая развитие язвенных заболеваний и возрастание риска развития рака желудка. Как и другие грамотрицательные бактерии, *H. pylori* несет на внешней мембране липополисахарид (ЛПС), который является основной мишенью иммунной системы организма—хозяина. ЛПС обычно состоит из трех различных частей: липид A, олигосахарид кора и *О*-полисахарид (ОПС).

Структуры липида А [3] и олигосахарида кора [4] ЛПС *H. pylori* были ранее установлены. Низкая степень фосфорилирования и необычный

Принятые сокращения: ГЖХ – газожидкостная хроматография; ЛПС – липополисахарид; ОПС – O-полисахарид; СОЅУ – корреляционная спектроскопия; ESI MS – масс-спектрометрия с ионизацией в электрическом поле; DD-Hep, LD-Hep – D-*глицеро*-, L-*глицеро*-, L-*глицеро*-, L-*глицеро*-, L-*корреляционная*, Кdo – 3-дезокси-D-*манно*-окт-2-улозоновая кислота; LacNAc – N-ацетиллактозамин; Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup> и H-1 – Льюис а, Льюис b, Льюис X, Льюис Y и H типа 1 соответственно; *P*Etn – 2-аминоэтил фосфат; polyLacNAc – ( $\beta$ I $\rightarrow$ 3)-поли-N-ацетиллактозамин.

<sup>\*</sup>Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio. msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM19-289, 30.12.2019.

<sup>\*\*</sup> Адресат для корреспонденции.



**Рис. 1.** Структуры олигосахаридов типа 2 и типа 1. Звенья Льюис Х, Льюис Ү и Н типа 1 найдены в ЛПС исследованных штаммах *H. Pylori* 

тип ацилирования в липиде А объясняют низкую эндотоксическую активность и слабый иммунологический ответ на ЛПС *H. pylori* [5]. В общем виде ОПС штаммов *H. pylori* построен из ( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)поли-*N*-ацетиллактозамина (polyLacNAc), декорированного остатками  $\alpha$ -L-фукозы или, в некоторых штаммах, дополнительно остатками глюкозы или галактозы [6–11]. Концевое звено ОПС *H. pylori* представляет собой моно- или дифукозилированный *N*-ацетиллактозамин (LacNAc), который, таким образом, подстраивается («мимикрирует») под антигены Льюис X (Le<sup>x</sup>) и/или Льюис Y (Le<sup>y</sup>) (рис. 1) [6–12]. В некоторых штаммах *H. pylori* были найдены Льюис a (Le<sup>a</sup>), Льюис b (Le<sup>b</sup>) и H тип I (H-1) (рис. 1) [13].

Ранее было продемонстрировано, что в ходе длительной колонизации в макаках-резус (*Macaca mulatta*) клетки *H. pylori* способны переключать свой фенотип, определяемый антигеном Льюиса, для адаптации к организму—хозяину, что указывает на возможность селекции бактериальных фенотипов [14]. Однако не было проведено структурных исследований, которые могли бы прояснить молекулярный механизм такой адаптации. В настоящей работе приведены результаты химического, ЯМР-спектроско-

БИОХИМИЯ том 85 вып. 2 2020

пического и масс-спектрометрического анализов ОПС, включая изучение внутренних и концевых олигосахаридных звеньев, а также олигосахаридов кора в ЛПС штаммов *H. pylori*, выделенных после длительной колонизациии в организме животных в сравнении с родительским штаммом. Эти данные подтвердили эволюцию экспрессии антигенов Льюиса в макаках-резус.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы, культивирование, выделение и деградация липополисахаридов. Использованы прививочный (родительский) штамм J166 и три изолята (98-149 и 98-169 от обезьян, экспрессирующих Le<sup>a</sup>, и 98-181 от обезьяны с Le<sup>b</sup>), выделенные после 40-недельной колонизации. Для получения биомассы бактериальные штаммы выращивали на кровяном агаре как описано в работе [15]. Образцы ЛПС выделяли экстракцией из клеточной массы водным фенолом [16] и расщепляли 0,1 М натрий-ацетатным буфером (рН 4) 2,2 ч при 100 °С. Водорастворимую углеводсодержащую часть фракционировали гель-распределитель-



Рис. 2. Профили элюции на геле Sephadex G-50 углеводных продуктов из ЛПС *H. pylori* 98-149 (*a*) и 98-169 (*б*). Фракция I представляет собой ОПС с цепью polyLacNAc, присоединенный к кору; фракции II и III являются олигосахаридами кора. Соответствующие структуры приведены на рис. 3

ной хроматографией на колонке с гелем Sephadex G-50 Superfine (70 × 2,6 см, свободный объем 200 мл) в 0,05 М пиридиний-ацетатном буфере (pH 4,5) со скоростью потока 0,5 мл/мин (puc. 2). Элюцию контролировали с помощью дифференциального рефрактометра «Waters», размер фракции составлял 10 мл. Полученные продукты из каждого ЛПС представляли собой полисахарид (фракция I) и усеченный олигосахарид кора (фракция II); дополнительный олигосахарид кора (фракция II) был выделен из ЛПС штаммов J166 и 98-169.

Моносахаридный анализ и метилирование. Гидролиз проводили 2 М трифторуксусной кислотой (120 °C, 2 ч) и моносахариды идентифицировали газо-жидкостной хроматографией (ГЖХ) в виде ацетатов полиолов на приборе «Hewlett-Packard» 5880 с колонкой DB-5 (25 м × × 0,25 мм) при температурной программе от 160 °C (1 мин) до 250 °C со скоростью 3 °C/мин.

Метилирование осуществляли с помощью метилиодида в диметилсульфоксиде в присутствии натрий-метилсульфинилметанида (CH<sub>3</sub>SOCH<sub>2</sub>Na) в качестве основания [17]. Гидролиз проводили как при моносахаридном анализе, частично метилированные моносахариды восстанавливали NaBD<sub>4</sub>, превращали в ацетаты полиолов и анализировали методом ГЖХ-МС на хроматографе «Hewlett Packard» 5890, соединенном с массспектрометром «NERMAG» R10-10L (Франция), используя колонку с неподвижной фазой DB-5 и температурной программой от 130 °C (1 мин) до 250 °C со скоростью 3 °C/мин.

Деградация по Смиту. ОПС штамма 98-181 (2 мг) окисляли 0,1 М NaIO<sub>4</sub> (0,3 мл) при 20 °С в течение 48 ч в темноте и избыток периодата разрушали добавлением этиленгликоля (0,05 мл). Продукты реакции восстанавливали NaBH<sub>4</sub> (6 мг) при 20 °С в течение 2 ч, обессоливали гель-распределительной хроматографией на колонке с гелем Fractogel TSK HW-40S (24 × 1 см) в воде, гидролизовали 2%-ной уксусной кислотой (2 ч, 100 °С), и полученный модифицированный ОПС выделяли хроматографией на колонке с тем же гелем.

Спектроскопия ЯМР и масс-спектрометрия. Спектры ЯМР были записаны в 99,96%  $D_2O$  при 60 °С, используя спектрометр «JEOL» EX-270. Перед съемкой спектров образцы дважды лиофилизовали из  $D_2O$  (99,9%). Химические сдвиги представлены в м.д., в качестве внутреннего стандарта использовали натрий-3-триметилсилилпропаноат-2,2,3,3-d<sub>4</sub> ( $\delta_H$  0,00).

Масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением (ESI MS) осуществляли для отрицательных ионов на масс-спектрометре «VG Quattro» («Micromass», Великобритания) с ацетонитрилом в качестве мобильной фазы при потоке 10 л/мин. Образцы растворяли в 50%-ном водном ацетонитриле при концентрации ~50 пкмоль/мкл и 10 мкл раствора вводили с помощью шприца в прибор.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Расщепление липополисахаридов и характеризация олигосахаридов кора. Мягкая кислотная деградация ЛПС из *H. pylori* J166 и трех дочерних штаммов (98-149, 98-169 и 98-181) с последующей хроматографией на геле Sephadex G-50 (рис. 2) привела к ОПС на основе polyLacNAc (фракция I) и одной или двум фракциям олигосахарида кора (фракция III в штаммах 98-149 и 98-181 или фракции II и III в штаммах J166 и 98-169). Все фракции исследовали с помощью моносахаридного анализа; олигосахариды анализировали также методом ESI MS, а ОПС изучали методами метилирования (таблица) и спектроскопии ЯМР.

Постино солини спользова	0	Содержание (по отклику детектора) в штаммах			
частично метилированное производное	относительное время удерживания	J166	98-149	98-169	98-181
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Fuc	1,00	0,43	0,39	0,31	0,16
$3,5-Me_2-Rib$	1,01	0,10	0,11	0,17	0,13
$2,4-Me_2$ -Fuc	1,27	0,12	0,15	0,12	0,09
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1,33	0,13	0,13	0,10	0,71
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1,38	<0,05	0,13	0,10	<0,05
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	1,66	0,13	0,12	0,11	0,13
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1,67	0,24	0,25	0,23	0,15
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1,73	1,15	1,17	1,23	0,33
2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	1,96	<0,05	<0,05	<0,05	0,86
3,4,6,7-Me <sub>4</sub> -LD-Hep	2,31	0,13	0,11	0,12	0,06
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -DD-Hep	2,37	0,13	0,13	0,13	0,18
3,4,6-Me <sub>3</sub> -DD-Hep	2,71	0,12	0,11	0,10	0,10
$2,3,6-Me_3-GlcNAc$	2,81	0,39	0,28	0,32	0,68
2,4,6-Me <sub>3</sub> -GlcNAc	2,97	0,15	0,11	0,08	0,09
2,6-Me <sub>2</sub> -GlcNAc	3,13	0,46	0,61	0,60	0,20

Данные метилирования фракции I (ОПС). Времена удерживания при анализе ГЖХ частично метилированных ацетатов полиолов в сравнении с 2,3,4-три-*O*-метилфукозой (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Fuc, 1.00) и гексаацетатом глюцитола (2,67)

Моносахаридный анализ показал, что главными компонентами олигосахаридной фракции III в каждом штамме были глюкоза, галактоза, D-глицеро-D-манно-гептоза (DD-Hep) и Lглицеро-D-манно-гептоза (LD-Hep). Анализ методом ESI MS показал присутствие основного соединения с мол. массой 242,4 Да. С учетом данных моносахаридного анализа и ESI MS сделан вывод, что эта фракция представляет собой укороченный олигосахарид кора состава GlcGal(DD-Hep)(LD-Hep)<sub>2</sub>KdoPEtn, где Kdo обозначает 3-дезокси-D-манно-окт-2-улозоновую кислоту в ангидро-форме, а PEtn – 2-аминоэтилфосфат. Соединение с таким же составом было получено ранее из ЛПС ряда других штаммов *H. pylori*, его строение приведено на рис. 3 (структура 1) [7, 13].

Основная олигосахаридная фракция II, полученная из ЛПС *H. pylori* J166 и 98-169, отличалась от фракции III присутствием фукозы и GlcNAc, а также более высоким содержанием DD-Hep. Ее моносахаридный состав и мол. масса 1946,6 Да, определенная методом ESI MS, соответствовали олигосахариду кора из штаммов *H. pylori* 26695 и Sydney, имеющему структуру 2 (рис. 3) [4, 18]. Во фракции II также присутствовали соединения, содержащие одну или несколько дополнительных остатков гексоз и рибозы и имеющие сходный состав с олигосахаридами кора *H. pylori*, строение которых было установлено ранее [4].

Моносахаридный анализ и анализ методом метилирования фракции I из каждого штамма (таблица) продемонстрировали присутствие всех составляющих кора, включая концевую глюкозу, 4-замещенную галактозу, 2-замещенную LD-Hep, 7-замещенную DD-Hep (место удлинения кора), 2,7-дизамещенную DD-Hep, 3замещенный GlcNAc и 3-замещенную фукозу. Эти компоненты были минорными, и был сделан вывод, что фракция I представляет собой ОПС, присоединенный к кору ЛПС.

Характеристика О-полисахаридов. Моносахаридный анализ и метилирование фракции I из ЛПС *H. pylori* J166, 98-149 и 98-169 (таблица) продемонстрировали типичное строение на основе (1 $\rightarrow$ 3)-polyLacNAc с несколькими звеньями LacNAc, фукозилированными по положению 3 остатка GlcNAc (структура 3) (рис. 3) (сравни с лит. данными [7, 18–20]). Исходя из соотношения 4-замещенного и 3,4-дизамещенного остатков GlcNAc (таблица), степень фукозилирования составляла 54, 69 и 65% в штаммах J166, 98-149 и 98-169 соответственно и, следовательно, фукозилированные звенья LacNAc в них были основными. Соотношение метилирован-



**Рис. 3.** Структуры фракции III с укороченным олигосахаридом кора из всех изученных штаммов *H. pylori* (1), основной фракции II олигосахарида кора ЛПС штаммов *H. pylori* J166 и 98-169 (2) и фракции I (ОПС) из *H. pylori* J166, 98-149, 98-169 (3) и 98-181 (4). В олигосахаридах 1 и 2 остатки Коо присутствуют в ангидро-форме. Распределение гликозилированных и негликозилированных звеньев LacNAc в полисахаридах 3 и 4 не определено

ных производных 3-замещенной Gal в звеньях LacNAc и остатков гептозы в коре показало присутствие 10–11 внутренних звеньев LacNAc в каждой полисахаридной цепи. Основные сигналы аномерных протонов в <sup>1</sup>Н ЯМР-спектре ОПС принадлежали остаткам  $\beta$ -GlcpNAc (4,74 м.д.,  $J_{1,2}$  8,5 Гц),  $\beta$ -Galp (4,49 м.д.,  $J_{1,2}$  8 Гц) и  $\alpha$ -Fucp (5,04 м.д.,  $J_{1,2}$  3 Гц) (сравни с лит. данными [7, 18, 19]). Эти данные подтверждают поли( $\alpha$ -фукозилирование) цепи polyLacNAc (структура 3) (рис. 3).

В то время как существенного структурного различия между фракцией I из штаммов J166, 98-149 и 98-169 обнаружено не было, ОПС штамма *H. pylori* 98-181 отличался существенно большим содержанием глюкозы (82% по сравнению с 22–29% в трех других исследованных штаммах). Анализ методом метилирования показал присутствие как главных компонентов концевых остатков глюкозы и 3,4-дизамещенных остатков галактозы, тогда как 3-замещенные остатки галактозы, являющиеся основными в ОПС со структурой **3**, были минорными (таблица). В дополнение к сигналам аномерных протонов, идентифицированных в ОПС штаммов J166, 98-149 и 98-169 (см. выше), спектр <sup>1</sup>Н ЯМР полисахарида штамма 98-181 содержал интенсивный сигнал H-1 остатка  $\beta$ -Glcp (4,88 м.д.,  $J_{1,2}$  7,5 Гц).

Эти данные подтвердили, что ОПС штамма 98-181 имеет структуру **4**, которая отличается декорацией звена LacNAc остатком  $\beta$ -глюкозы, присоединенным в положение 4 остатку галактозы (рис. 3). Исходя из соотношения 3-замещенного и 3,4-дизамещенного остактов галактозы (таблица), степень глюкозилирования составляла ~70%. Цепь poly(LacNAc) в штамме 98-181 оказалась сходной с цепями трех других штаммов, но степень фукозилирования звеньев LacNAc была меньше (~30%).

Структура 4 подтверждена распадом ОПС по Смиту, в результате которого за счет удаления концевых остатков фукозы и глюкозы образовалась линейная цепь polyLacNAc, строение которой было подтверждено метилированием и спектроскопией <sup>1</sup>Н ЯМР (данные не представле-

ны). Глюкозилирование polyLacNAc по положению 4 остатка β-Galp является новой структурной особенностью ЛПС *H. pylori*, в то время как глюкозилирование или галактозилирование β-GlcpNAc по положению 6 было описано ранее [9].

Характеристика концевых олигосахаридных звеньев и соответствие фенотипу хозяина. Структуры концевых звеньев на невосстанавливающем конце ОПС исследовали с помощью двумерной корреляционной спектроскопии <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H (COSY), как описано ранее [7, 18]. Анализ характеристичных корреляций H5/H6 в остатках Fuc оказался полезным для идентификации концевых олигосахаридных звеньев в ОПС *H. pylori.* 

В ОПС всех изученных штаммов остатки фукозы находились в определенных положениях кора (рис. 4, *в*) (H5/H6 при 4,33/1,14 м.д.) и во внутреннем фукозилированном звене LacNAc (рис. 4, I) (H5/H6 при 4,80/1,13 м.д.). В родительском штамме J166 дополнительные остатки фукозы присутствовали в составе концевых звеньев Le<sup>y</sup> (H5/H6 при 4,87/1,22 м.д. и 4,24/1,25 м.д.) и Н типа 1 (H5/H6 при 4,29/1,24 м.д.) (рис. 4, *a*). Ни один из дочерних штаммов не давал таких же корреляций Fuc H5/H6, как родительский штамм, из-за отсутствия одного или обоих этих типов концевых олигосахаридных звеньев. Таким образом, звено Н типа 1 отсутствует во всех трех дочерних штаммах (рис. 4,  $\delta$ -*e*), и только штамм 98-181 сохранил звено Le<sup>y</sup> (рис. 4, *e*). Штаммы 98-149 и 98-169 экспрессировали звено Le<sup>x</sup> вместо звена Le<sup>y</sup> (рис. 4, *б*, *e*).

Экспрессия Le<sup>y</sup> изолятом 98-181 соответствует статусу секреции обезьяны-хозяина, который характеризовался фенотипом Le<sup>b</sup>. Отсутствие экспрессии концевого звена Le<sup>x</sup> штаммом 98-181 сопровождалось меньшим уровнем фукозилирования внутренних звеньев LacNAc, что



**Puc. 4.** Фрагменты спектров <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H COSY ОПС из *H. pylori* J166 (*a*), 98-149 (*b*), 98-169 (*b*) и 98-181 (*c*). Показаны корреляции H5/H6 остатков фукозы в коре (C), внутренних звеньях ОПС (I), концевых звеньях Льюис X (Le<sup>x</sup>), Льюис Y (Le<sup>y</sup>) и H типа 1 (H-1), а также в неизвестном положении (U)

не способствовало синтезу также внутренних звеньев Le<sup>x</sup>. С другой стороны, изоляты 98-149 и 98-169 различались более высокой экспрессией как терминальных, так и внутренних звеньев Le<sup>x</sup>, которые соответствовали фенотипу Le<sup>a</sup> в животных-хозяевах. Таким образом, сделано заключение, что, поскольку Le<sup>a</sup> и Le<sup>b</sup> являются изомерами Le<sup>x</sup> и Le<sup>y</sup> соответственно (рис. 1), обнаруженные корреляции являются формами адаптации или селекции штаммов *H. pylori* в слизистой оболочке индивидуальных организмов-хозяевах.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов изучения.

Благодарности. Авторы благодарят М. Дж. Блайзера (Нью-Йоркский университет, США) за предоставление штаммов *H. pylori*, А. П. Морана (Национальный университет Ирландии, Ирландия) за культивирование бактерий и ценное обсуждение, профессора П.-Э. Янссона (Каролинский институт, Клинический исследовательский центр, Университетский госпиталь Худдинге, Худдинге, Швеция) за предоставление доступа к лабораторному оборудованию, включая ЯМР-спектрометр и ГЖХ-масс-спектрометр.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Kusters, J.G., van Vliet, A.H., and Kuipers, E.J. (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, *Clin Microbiol Rev.*, **19**, 449–490, doi: 10.1128/CMR.00054-05.
- Chmiela, M., and Kupcinskas, J. (2019) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, *Helicobacter*, 24, 2638, doi: 10.1111/hel.12638.
- Moran, A.P., Lindner, B., and Walsh, E.J. (1997) Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides, *J. Bacteriol.*, **179**, 6453–6463, doi: 10.1128/ jb.179.20.6453-6463.1997.
- Altman, E., Chandan, V., Li, J., and Vinogradov, E. (2011) A reinvestigation of the lipopolysaccharide structure of *Helicobacter pylori* strain Sydney (SS1), *FEBS J.*, 278, 3484–3493, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08270.x.
- Moran, A.P. (1996) The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 10, 39–50, doi: 10.1046/j.1365-2036.1996.22164004.x.
- 6. Moran, A.P., and Aspinall, G.O. (1998) Unique structural and biological features of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides, *Prog. Clin. Biol. Res.*, **397**, 37–49.
- Knirel, Y.A., Kocharova, N.A., Hynes, S.O., Widmalm, G., Andersen, L.P., Jansson, P.-E., and Moran, A.P. (1999) Structural studies on lipopolysaccharides of serologically non-typable strains of *Helicobacter pylori*, AF1 and 007, expressing Lewis antigenic determinants, *Eur. J. Biochem.*, 266, 123–131, doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00831.x.
- Wang, G., Ge, Z.M., Rasko, D.A., and Taylor, D.E. (2000) Lewis antigens in *Helicobacter pylori*: biosynthesis and phase variation, *Mol. Microbiol.*, 36, 1187–1196, doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01934.x.
- Monteiro, M.A. (2001) Helicobacter pylori: a wolf in sheep's clothing: the glycotype families of Helicobacter pylori lipopolysaccharides expressing histo-blood groups: structure, biosynthesis, and role in pathogenesi, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 57, 99–158, doi: 10.1016/ s0065-2318(01)57016-x.
- Moran, A.P. (2008) Relevance of fucosylation and Lewis antigen expression in the bacterial gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*, *Carbohydr. Res.*, 343, 1952–1965, doi: 10.1016/j.carres.2007.12.012.
- Chmiela, M., Miszczyk, E., and Rudnicka, K. (2014) Structural modifications of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide: an idea for how to live in peace, *World J. Gastroenterol.*, 20, 9882–9897, doi: 10.3748/wjg.v20.i29.9882.

- Li, H., Liao, T., Debowski, A.W., Tang, H., Nilsson, H.O., Stubbs, K.A., Marshall, B.J., and Benghezal, M. (2016) Lipopolysaccharide structure and biosynthesis in *Helicobacter pylori*, *Helicobacter*, 21, 445–461, doi: 10.1111/hel.12301.
- Monteiro, M.A., Chan, K.H.N., Rasko, D.A., Taylor, D.E., Zheng, P.Y., Appelmelk, B.J., Wirth, H.P., Yang, M.Q., Blaser, M.J., Hynes, S.O., Moran, A.P., and Perry, M.B. (1998) Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides, *J. Biol. Chem.*, 273, 11533–11543, doi: 10.1074/ jbc.273.19.11533.
- Wirth, H.-P., Manqiao, Y., Edgardo, S.-V., Berg, D.E., Dubois, A., and Blaser, M.J. (2006) Host Lewis phenotype-dependent *Helicobacter pylori* Lewis antigen expression in rhesus monkeys, *FASEB J.*, 20, 1534–1536, doi: 10.1096/fj.05-5529fje.
- Moran, A.P., Helander, I.M., and Kosunen, T.U. (1992) Compositional analysis of *Helicobacter pylori* rough-form lipopolysaccharides, *J. Bacteriol.*, **174**, 1370–1377, doi: 10.1128/jb.174.4.1370-1377.1992.
- 16. Westphal, O., and Jann, K. (1965) Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure, *Methods Carbohydr. Chem.*, **5**, 83–91.
- Hakomori, S.-I. (1964) A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide, *J. Biochem. (Tokyo)*, 55, 205–208.
- Moran, A.P., Knirel, Y.A., Senchenkova, S.N., Widmalm, G., Hynes, S.O., and Jansson, P.-E. (2002) Phenotypic variation in molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. Acid-induced phase variation in Lewis(x) and Lewis(y) expression by *H. pylori* lipopolysaccharides, *J. Biol. Chem.*, 277, 5785–5795, doi: 10.1074/jbc.M108574200.
- Monteiro, M.A., Rasko, D., Taylor, D.E., and Perry, M.B. (1998) Glucosylated *N*-acetyllactosamine *O*-antigen chain in the lipopolysaccharide from *Helicobacter pylori* strain UA861, *Glycobiology*, 8, 107–112. doi: 10.1093/glycob/8.1.107.
- Aspinall, G.O., Monteiro, M.A., Pang, H., Walsh, E.J., and Moran, A.P. (1996) Lipopolysaccharide of the *Helicobacter pylori* type strain NCTC 11637 (ATCC 43504): structure of the *O*-antigen chain and core oligosaccharide regions, *Biochemistry*, **35**, 2489–2497, doi: 10.1021/bi951852s.

## VARIATIONS IN THE EXPRESSION OF TERMINAL OLIGOSACCHARIDE UNITS AND GLYCOSYLATION OF POLY(*N*-ACETYLLACTOSAMINE) CHAIN IN THE *Helicobacter pylori* LIPOPOLYSACCHARIDE UPON COLONIZATION OF RHESUS MACAQUES\*

### A. V. Perepelov\*\*, S. N. Senchenkova, and Yu. A. Knirel

Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 19991 Moscow, Russia; E-mail: andreivperepelov@gmail.com

> Received October 4, 2019 Revised November 29, 2019 Accepted November 30, 2019

Helicobacter pylori is an important human pathogen that causes gastritis, gastric and duodenal ulcers, and gastric cancer. O-polysaccharides of *H. pylori* lipopolysaccharides (LPS) are composed of  $(\beta 1 \rightarrow 3)$ -poly(*N*-acetyllactosamine) (polyLacNAc) decorated with multiple  $\alpha$ -L-fucose residues. In many strains, their terminal LacNAc units are monoor di-fucosylated to mimic Lewis X (Le<sup>x</sup>) and/or Lewis Y (Le<sup>y</sup>) oligosaccharides. The studies in rhesus macaques as a model of human infection by H. pylori showed that this bacterium adapts to the host during colonization by expressing host Lewis antigens. Here, we characterized LPS from H. pylori strains used in the previous study, including the parental J166 strain and the three derivatives (98-149, 98-169, and 98-181) isolated from rhesus macaques after longterm colonization. Chemical and NMR spectroscopic analyses of the LPS showed that the parental strain expressed Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>, and H type 1 terminal oligosaccharide units. The daughter strains were similar to the parental one in the presence of the same LPS core and fucosylated polyLacNAc chain of the same length but differed in the terminal oligosaccharide units. These were Lex in the isolates 98-149 and 98-169, which corresponded to the Lea phenotype of the host animals, and Le<sup>y</sup> was found in the 98-181 isolate from the macaque characterized by the Le<sup>b</sup> phenotype. As Le<sup>a</sup> and Le<sup>b</sup> are isomers of Le<sup>x</sup> and Le<sup>y</sup>, respectively, the observed correlation confirmed adaptation of the expression of terminal oligosaccharide units in H. pylori strains to the properties of the host gastric mucosa. The 98-181 strain also acquired glycosylation of the polyLacNAc chain and was distinguished by a lower expression of fucosylated internal LacNAc units (internal Le<sup>x</sup>) as a result of decoration of polyLacNAc with  $\beta$ -glucopyranose, which may also play a role in the bacterial adaptation.

*Keywords: Helicobacter pylori*, lipopolysaccharide, O-polysaccharide, poly(*N*-acetyllactosamine), glucosylation, Lewis antigen expression, bacterial adaptation, resus macaque

УДК 577.114.5;577.21;579.841

# УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА КЗ2 И ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕННОГО КЛАСТЕРА KL32 Acinetobacter baumannii LUH5549\*,\*\*

© 2020 С.М. Кахилл<sup>1#</sup>, Н.П. Арбатский<sup>2#</sup>, А.С. Шашков<sup>2</sup>, М.М. Шнейдер<sup>3</sup>, А.В. Попова<sup>4,5</sup>, Р.М. Хэлл<sup>6#</sup>, Дж.Дж. Кенион<sup>1#</sup>, Ю.А. Книрель<sup>2\*\*\*#</sup>

<sup>1</sup> Institute of Health and Biomedical Innovation, School of Biomedical Sciences,

119991 Москва, Россия; электронная почта: yknirel@gmail.com

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

117997 Москва, Россия

<sup>4</sup> Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный Московской обл., Россия

<sup>5</sup> ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, 142279 Оболенск Московской обл., Россия

<sup>6</sup> School of Life and Environmental Sciences, The University of Sydney, Sydney, Australia

Поступила в редакцию 29.10.2019 После доработки 25.11.2019 Принята к публикации 26.11.2019

Капсульный полисахарид (КПС), относящийся к типу K32, выделен из штамма Acinetobacter baumannii LUH5549, содержащего генный кластер биосинтеза КПС типа KL32. Структура КПС установлена с помощью углеводного анализа, деградации по Смиту, одно- и двумерной спектроскопии <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>С ЯМР. Найдено, что КПС типа K32 построен из разветвленных повторяющихся пентасахаридных единиц (К-звеньев), включающих два остатка  $\beta$ -D-GalpNAc и один остаток  $\beta$ -D-глюкуроновой кислоты ( $\beta$ -D-GlcpA) в основной цепи и по одному остатку  $\beta$ -D-Glcp и  $\alpha$ -D-GlcpNAc в боковой дисахаридной цепи. В соответствии со структурой КПС генный кластер KL32 включает гены UDP-D-Glc-6-дегидрогеназы (Ugd3), ответственной за синтез D-GlcA и четырех гликозилтрансфераз, образующих специфические гликозидные связи. Присутствующие в кластере гены, кодирующие ацетилтрансферазу и белок с неизвестной функцией, не участвуют в биосинтезе КПС. Ранее присутствие генного кластера KL32 обнаружено в штаммах, принадлежащих к глобальной клональной линии 2 (GC2), тогда как штамм LUH5549 принадлежит к сиквенс-типу ST354, что свидетельствует о горизонтальном генетическом переносе между этими линиями.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** Acinetobacter baumannii, капсула, К-локус, структура полисахарида, глюкуроновая кислота.

DOI: 10.31857/S0320972520020116

Капсульный полисахарид (КПС) присутствует на клеточной поверхности многих патогенных бактерий, и в том числе нозокомиальных видов *Acinetobacter baumannii*. Образуя поверхностный слой, защищающий бактерию от иммунного ответа хозяина, высыхания и выживания в других неблагоприятных условиях внешней среды, КПС является одним из основных факторов патогенности микроорганизмов [1–4]. Он представляет собой длинную полисахаридную цепь из повторяющихся олигосахаридных единиц (Кзвеньев), включающих от 2 до 6 моносахаридных остатков, соединенных различными гликозидными связями. Биосинтез и экспорт КПС *А. baumannii* контролируется соответствующими генами в К-локусе (КL) хромосомы, состав и расположение которых изменчивы [5].

К-локус включает оперон генов *wza-wzb-wzc*, ответственных за экспорт КПС, и область с генами синтеза специфического К-звена, содержащую разнонаправленные единицы транскрипции. В К-локусе находятся гены синтеза простых сахаров, инициации синтеза К-звена (*itr*), переноса углеводных остатков (*gtr*), транс-

Faculty of Health, Queensland University of Technology, Brisbane, Australia

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,

Принятые сокращения: КПС – капсульный полисахарид; GlcA – глюкуроновая кислота; КL– К-локус.

<sup>\*</sup> Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio. msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM19-307, 30.12.2019.

<sup>\*\*</sup> Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/ 10541), том 85, вып. 2, 2020.

<sup>\*\*\*</sup> Адресат для корреспонденции.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup> Авторы внесли равный вклад в работу.

локации (wzx) и полимеризации (wzy) К-звена, а также присоединения ацетильной или пируватной групп (*atr/ptr*) в случае их присутствия.

Ранее была исследована организация генных кластеров KL изолятов из коллекции Трауба, которая была использована для разработки оригинальной схемы серотипирования A. baumannii [6, 7]. Однако эти генные кластеры изначально были описаны как кодирующие биосинтез полисахаридов (PSgc) с использованием традиционной систематической номенклатуры. В настоящее время структура многих КПС из различных изолятов установлена и показано, что их состав и конфигурация сахаров коррелирует с составом генного кластера КL [8-12]. В связи с этим аннотация генных кластеров PSgc была пересмотрена [8-14] и приведена в соответствие с более удобной и уже широко распространенной системой номенклатуры генных кластеров биосинтеза КПС А. baumannii [5]. В данной работе мы установили структуру КПС еще одного штамма (LUH5549) из коллекции Трауба, генный кластер которого ранее обозначался как PSgc21.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование бактерий. Штамм *A. baumannii* LUH5549 из коллекции W.H. Traub (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität des Saarlandes, Саарленд, Германия) был любезно предоставлен профессором Peter Reeves. Бактерии культивировали в среде 2ТҮ в течение ночи, клетки отделяли центрифугированием (10 000 g, 20 мин), промывали Na-фосфатным буфером pH 7,4, суспендировали в смеси ацетонвода (7 : 3 v/v), осаждали и высушивали.

Выделение капсульного полисахарида. КПС выделяли из бактериальных клеток (1,1 г) водно-фенольной экстракцией [15]. Экстракт диализовали без разделения слоев, нерастворимые примеси отделяли центрифугированием, растобрабатывали вор 50%-ным раствором CCl<sub>3</sub>COOH при 4 °C, осадок (белки и нуклеиновые кислоты) удаляли центрифугированием, раствор диализовали против дистиллированной воды, лиофилизовали и получили неочищенный КПС (370 мг). Очистку КПС (120 мг) проводили нагреванием в 2% AcOH (100 °C, 2 ч) с последующим отделением примесей центрифугированием и фракционированием с помощью гель-проникающей хроматографии на колонке (60 × 2.5 см) с гелем Sephadex G-50 в 0.1% AcOH, используя для детектирования дифференциальный рефрактометр («Кпаиег», Германия). Высокомолекулярную фракцию лиофилизовали и получали очищенный КПС (27 мг).

Анализ моносахаридов. Образец КПС (0,5 мг) гидролизовали 2М CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (120 °C, 2 ч), моносахариды анализировали в виде ацетатов полиолов [16] методом ГЖХ на хроматографе Maestro (Agilent 7820, Москва, Россия) на колонке 0,32 мм × 20 м с фазой HP-5 в температурном режиме от 160 °C (1 мин) до 290 °C с градиентом 7 °C мин<sup>-1</sup>. Глюкуроновую кислоту идентифицировали с помощью углеводного анализатора Biotronik LC 2000 (Германия), используя колонку (7 × 0,4 см) с анионитом DA×8 (Durrum, США), 5 мМ К-фосфатный буфер pH 3 и К-бицинхонинат для детекции.

Деградация по Смиту. Образец КПС (12 мг) окисляли NaIO<sub>4</sub> (29 мг в 1,5 мл воды, 20 °С, 72 ч) в темноте, восстанавливали NaBH<sub>4</sub> (30 мг, 24 ч, 16 °С), раствор упаривали, борную кислоту удаляли трехкратным упариванием с 10% AcOH в MeOH и продукты разделяли на колонке (108 × 1,2 см) с гелем Sephadex G-25 в воде с детектированием с помощью дифференциального рефрактометра. Полимерную фракцию гидролизовали 2% AcOH (100 °С, 2 ч), продукты фракционировали на той же колонке и получали модифицированный КПС (2,6 мг).

Спектроскопия ЯМР. Перед съемкой спектров ЯМР образцы дважды лиофилизовали из 99,9% D<sub>2</sub>O и исследовали в виде раствора в 99,95% D<sub>2</sub>O при 65 град. С. В качестве внутреннего стандарта для калибровки использовали Na-3-триметилсилилпропаноат-2,2,3,3-d<sub>4</sub> ( $\delta_{\rm H}$  $0,0, \delta_{\rm C}$  –1,6). Спектр <sup>13</sup>С ЯМР регистрировали на приборе Bruker DRX-500, двумерные эксперименты ЯМР были проведены на спектрометре Bruker Avance II 600 MHz (Германия) с использованием стандартного программного обеспечения компании «Bruker». В эксперименте <sup>13</sup>С ЯМР релаксационная задержка составляла 3 с. Время спиновой стабилизации и время смешивания в экспериментах TOCSY и ROESY составляло 60 и 150 мсек, соответственно. Для оптимизации эксперимента <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>С НМВС использовали задержку 60 мсек для развития многосвязевых корреляций. Другие параметры ЯМР были установлены, как описано ранее [8]. Для получения и обработки данных ЯМР использовали программу BrukerTopSpin 2.1.

Биоинформатика. Данные коротких ридов геномной последовательности штамма LUH5549 получены из архива коротких ридов (SRA, номер доступа DRS005644) и собраны в контиги с использованием программы SPAdes [17]. Генный кластер KL32 идентифицирован между генами *fkpA* и *lldP* и повторно аннотирован в соответствии с раннее описанной номенклатурой [5]. Базы данных CAZy (http://www.cazy.org/) [18] и Pfam (https://pfam.xfam.org) [19] использованы для соотнесения кодируемых белков с их биосинтетическими функциями. Собранная последовательность и обновленная аннотация доступны в базе данных GenBank под номером доступа KC526897.2. Полная геномная последовательность использована для установления сиквенс-типа в соответствии со схемой MLST Института Пастера для *A. baumannii* (https://pubmlst. org/bigsdb?db=pubmlst\_abaumannii\_pasteur\_seqdef).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Последовательность генов в геномном кластере PSgc21 КПС A. baumannii LUH5549, доступная в базе данных GenBank под номером доступа КС526897.1, является неполной ввиду отсутствия генов экспорта КПС (wza-wzb-wzc), что свидетельствует о потенциальной проблеме качества сборки генома. Поскольку последовательность изначально была собрана в контиги из коротких ридов с использованием программы Velvet 2.0 [7], короткие риды (SRA, номер доступа DRS005644) были вновь собраны в контиги, используя программу SPAdes. Полная последовательность фрагмента геномного кластера между консервативными генами *fkpA* и *lldP*, фланкирующими К-локус, оказалась на 99,56% идентичной установленной ранее последовательности генного кластера KL32 штамма A. baumannii BAL 058 (GenBank, номер доступа КТ359615.1), выделенного во Вьетнаме [20]. Соответственно, генный кластер LUH5549 переименован в KL32, и его гены обозначены в соответствии с принятой системой номенклатуры [5]. Обновленная последовательность и аннотация доступны в базе данных GenBank (номер доступа КС526897.2).

Генный кластер KL32 (рис. 1) включает гены wzy и wzx, ответственные за процессинг K-звена, модуль генов galU, ugd, gpi, gne1, pgm, отвечающих за синтез UDP-производных сахаров, включая UDP-D-Glcp, UDP-D-GlcpNAc и UDP-D-GalpNAc. Рядом с геном galU находится ген *itrA2*, который отвечает за инициацию синтеза К-звена путем присоединения первого остатка К-звена (D-GalpNAc) к липиду-переносчику на внутренней мембране бактерии [21]. Центральная область KL32 включает четыре предсказанных гена гликозилтрансфераз (gtr67, gtr68, gtr69, gtr70), необходимых для образования гликозидных связей в К-звене, ген ацетилтрансферазы (atr9) и ген, кодирующий белок с неустановленной функцией (Orf).

В центральной области кластера присутствует также ген типа udg (udg3), который по данным базы данных GenPept (номер доступа АНВ32286.1) только на 20% идентичен (74% покрытия) продукту гена ugd (GenPept, номер доступа АНВ32291.1), расположенного в генном модуле синтеза сахаров и предположительно отвечающего за превращение UDP-D-Glcp в UDP-D-GlcA [5]. Хотя ген ugd является общим для всех генных кластеров A. baumannii, его роль в синтезе КПС пока не установлена. Белок Ugd3 также на 27% идентичен (на 71% гомологичен) другому белку типу Ugd (Ugd2), найденному в центральной области генных кластеров KL20 и KL21. В соответствии с наличием Ugd2 (GenPept, номера доступа AUG44319.1 и AIT56461.1), КПС К20 и К21 содержат D-GlcpA [22]. Присутствие гена ugd3 в центральной области KL32 предполагает, что КПС K32 также содержит D-GlcA.

КПС выделяли из клеток бактерии *A. baumannii* LUH5549 водно-фенольной экстракцией с последующей очисткой нагреванием в 2% НОАс для расщепления липополисахаридов с короткими углеводными цепями и гель-проникающей хроматографией на геле Sephadex G-50. Анализ углеводов, содержащихся в КПС, в виде ацетатов альдитолов методом ГЖХ показал наличие Glc, GlcNAc и GalNAc в соотношении 1 : 1,6 : 1,8. Кроме того, с помощью жидкостной анионообменной хроматографии идентифицирована GlcA. Абсолютная конфигурация сахаров не определялась химическим методом, но следовала из генетических данных (см. ниже).



**Рис. 1.** Генный кластер биосинтеза КПС *Acinetobacter baumannii* КL32. Стрелки показывают направление транскрипции по данным базы данных GenBank (номер доступа КС526879.2). Гены гликозилтрансфераз (*gtr*) окрашены в светло-серый цвет, ген инициирующей трансферазы (*itrA2*) – в черный цвет. Роль генов, окрашенных в темно-серый цвет, в биосинтезе КПС К32 не установлена

Моносахаридные остатки		C-1 <i>H</i> -1	C-2 <i>H</i> -2	C-3 <i>H-3</i>	C-4 <i>H</i> -4	C-5 <i>H-5</i>	C-6 <i>H</i> -6
КПС							
$\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Gal <i>p</i> NAc-(1 $\rightarrow$	A	104,1 <i>4,54</i>	52,5 <i>3,83</i>	81,3 <i>3,89</i>	69,2 <i>4,06</i>	75,9 <i>3,59</i>	62,6 <i>3,74; 3,82</i>
$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$	B	105,3 <i>4,58</i>	73,5 <i>3,40</i>	75,2 3,64	81,2 <i>3,84</i>	74,8 <i>4,01</i>	172,1
$\rightarrow$ 3,4)- $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$	C	102,9 <i>4,53</i>	52,8 <i>4,06</i>	79,0 <i>3,84</i>	74,9 <i>4,22</i>	77,0 <i>3,73</i>	61,6 <i>3,64</i> ; <i>3,68</i>
$\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$	D	98,3 <i>4,86</i>	55,3 <i>3,90</i>	71,9 <i>3,87</i>	70,9 <i>3,71</i>	72,0 <i>4,34</i>	69,3 <i>4,06</i> ; <i>4,32</i>
$\beta$ -D-Glc <i>p</i> -(1 $\rightarrow$	E	104,0 <i>4,4</i> 7	74,5 <i>3,35</i>	77,2 <i>3,49</i>	71,2 <i>3,40</i>	77,2 <i>3,43</i>	62,4 <i>3,72</i> ; <i>3,91</i>
МПС							
$\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Gal <i>p</i> NAc-(1 $\rightarrow$	A	103,7 <i>4,58</i>	52,4 <i>3,97</i>	81,1 <i>3,85</i>	69,1 <i>4,12</i>	76,0 <i>3,64</i>	62,3 <i>3,76; 3,78</i>
$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$	B	105,4 <i>4,50</i>	73,9 <i>3,36</i>	75,1 <i>3,57</i>	81,1 <i>3,76</i>	77,9 <i>3,68</i>	
$\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Gal $p$ NAc-(1 $\rightarrow$	C	102,3 <i>4,51</i>	52,4 <i>3,95</i>	80,7 <i>3,80</i>	69,3 <i>4,16</i>	76,0 <i>3,70</i>	62,3 <i>3,77; 3,81</i>

Химические сдвиги <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С ЯМР (м.д.)

Примечание. Химические сдвиги <sup>1</sup>Н ЯМР выделены курсивом; химические сдвиги *N*-ацетильных групп:  $\delta_{\rm H}$  1,96-2,06,  $\delta_{\rm C}$  23.3-24.0 (Ме) и 175.3-175.5 (СО).

Спектры <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С (рис. 2) ЯМР КПС включали сигналы пяти моносахаридных остатков и трех N-ацетильных групп. Интерпретация спектров с помощью двумерных экспериментов <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H TOCSY, <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H ROESY,  $^{1}$ H,  $^{13}$ C HSOC и  $^{1}$ H,  $^{13}$ C HMBC выявила спиновые системы остатков  $\beta$ -Glc (E),  $\beta$ -GlcA (B),  $\alpha$ -GlcNAc (D) и двух остатков  $\beta$ -GalNAc (A и С), находящихся в пиранозной форме (таблица 1). Из величин констант спин-спинового взаимодействия <sup>3</sup>J<sub>н.н</sub> кольцевых протонов в одно- и двумерных спектрах следовала α-глюкоконфигурация остатка **D**, *β-глюко*конфигурация остатков В и Е и β-галактоконфигурация остатков А и С. Конфигурация остатков А, В, С и Е подтверждена корреляциями Н-1/Н-5 в спектре ROESY (рис. 3). Сравнение положений низкопольных сигналов атомов С-3 остатков С и А (8 79,0 и 81,3), атомов C-4 остатков C и B (8 74,9 и 81,2), а также атома C-6 остатка D (δ 69,3) (таблица 1) с таковыми в соответствующих незамещенных моносахаридах [23, 24] указывало на места замещения моносахаридных остатков в К-звене. Химические сдвиги атомов С-2,3,4,5,6 в остатке Е и незамещенной β-глюкопиранозы [23] близки, что указывало на терминальное положение этого остатка.

В спектре <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C HMBC имелись корреляции между аномерными протонами и атомами углерода в местах замещения при  $\delta$  4,47/69,3;  $\delta$  4,53/81,2;  $\delta$  4,54/79,0;  $\delta$  4,58/81,3 и  $\delta$  4,86/74,9, что указывало на корреляции Е H1/D C-6, C H1/B C-4, A H-1/C C-3, B H-1/A C-3 и D H-1/C C-4, соответственно (рис. S1 Приложения). Эти данные, а также данные о корреляции аномерных протонов с протонами при атомах углерода гликозилируемых остатков в спектре <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H ROESY (рис. S2 Приложения) позволили установить типы гликозидных связей и последовательность моносахаридов в K-звене.

Таким образом, КПС К32 *А. baumannii* LUH5549 имеет структуру, представленную на рис. 3, которая, по нашим данным, отличается от известных структур бактериальных полисахаридов, депонированных в базе данных Bacterial Carbohydrate Structure Database (BCSDB; http://csdb.glycoscience.ru/bacterial/) [25]. Дополнительное доказательство структуры КПС получено в результате деградации КПС по Смиту, приведшей к образованию модифицированного полисахарида (МПС). Структура МПС, представленная на рис. 3, установлена теми же методами, что и структура КПС, включая однои двумерную спектроскопию ЯМР (таблица).



**Рис. 2.** Спектр <sup>13</sup>С ЯМР КПС *А. baumannii* LUH5549. Обозначения сигналов атомов углерода приведены в соответствии с таблицей и рис. 3



**Рис. 3.** Структура КПС *A. baumannii* LUH5549 и МПС, полученного при деградации КПС по Смиту. Гликозилтрансферазы Gtr, полимераза Wzy и инициирующая трансфераза ItrA2 показаны рядом с гликозидными связями, которые они предположительно образуют

КПС К32 построен из повторяющихся пентасахаридных К-звеньев, включающих обычные для бактерий сахара, такие как D-GalpNAc, D-GlcpNAc и D-Glcp, а также D-GlcpA. Ранее мы предположили, что ген *ugd*, присутствующий в модуле синтеза простых сахаров, не является необходимым для продуцирования КПС [5], а моносахарид D-GlcA присутствует в КПС *A. baumannii*, только когда второй ген тип *ugd* включен в генный кластер [22]. Соответственно, генный кластер КL32 содержит ген *ugd3* в центральной области, и, как результат, в структуре КПС типа K32 имеется D-GlcA.

Поскольку в структуре КПС присутствуют два остатка D-GalNAc (рис. 3), оставалось неясным какой из них является первым в биологическом повторяющемся звене К32, присоединяемым в ходе биосинтеза КПС к липиду-носителю продуктом гена *itrA2* (GenPept, номер доступа АНВ32289.2). Однако первый остаток мог быть определен путем выяснения типа связи, образуемой полимеразой Wzy<sub>к32</sub>, ответственной за связывание К-звеньев в единую полисахаридную цепь, т.е. за присоединение первого остатка К-звена к последнему остатку. Полимераза Wzy<sub>K32</sub> (GenPept, номер доступа АНВ32283.1) на 28% идентична полимеразе Wzy<sub>K116</sub>, кодируемой в генном кластере A. baumannii KL116 (GenBank, номер доступа МК399425.1), которая, как недавно установлено, образует связь  $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Galp [26]. Похожая связь  $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)-D-GalpNAc имеется в КПС К32, и следовательно, Wzy<sub>K32</sub> ответственна за ее образование. Таким образом, построение К-звена начинается с переноса остат-ка D-GalpNAc A на липид-носитель (рис. 3).

Сборка К-звена требует участия трех инвертирующих гликозилтрансфераз для образования трех  $\beta$ -связей и одной гликозилтрансферазы, работающей по механизму с сохранением аномерной конфигурации, для образования  $\alpha$ -связи. Эту роль может выполнять только одна гликозилтрансфераза в генном кластере KL32, а именно Gtr68<sub>K32</sub> (GenPept, номер доступа AHB32282.2), входящая по базе данных CAZ<sub>y</sub> в семейство гликозилтрансфераз GT4, сохраняющих аномерную конфигурацию [18]. Следовательно, Gtr68<sub>K32</sub> отвечает за образование связи между остатками  $\alpha$ -D-GlcpNAc **D** и D-GalpNAc **C**.

Функции остальных гликозилтрансфераз в образовании гликозидных связей определены на основании гомологии с другими известными или предполагаемыми гликозилтрансферазами. Gtr70<sub>K32</sub> (GenPept, номер доступа AHB32285.1) на 54% идентична WdbN в О-антигенном кластере *Escherichia coli* O143 (GenPept, номер доступа STM86374.1), и в структуре полисахарида O143 имеется связь  $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ 3)-D-GlcpNAc [27]. Похожая связь —  $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ 3)-D-GlpNAc – есть в КПС К32 (рис. 3), и на основании этого был сделан вывод, что Gtr70<sub>K32</sub> образу-

ет эту связь. Гликозилтрансфераза Gtr67<sub>к32</sub> (GenPept, номер доступа АНВ32281.1) на 27% идентична Gtr75<sub>K37</sub>, кодируемой в генном кластере A. baumannii KL37 (GenBank, номер доступа КХ712115.1). В соответствии со структурой КПС K37 [26], Gtr75<sub>K37</sub> катализирует образование связи  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6)-D-GalpNAc. Таким образом, Gtr67<sub>K32</sub> предположительно отвечает за образопохожей связи β-D-Glcp-(1→6)-Dвание GlcpNAc в КПС К32 Наконец, для Gtr69<sub>к32</sub> (GenPept, номер доступа АНВ32284.1), входящей в семейство белков glycos\_transf 2 (Pfam -PF00535), не было найдено соответствий в базе данных BLASTp. Так как в К-звене оставалась только одна связь – β-D-GalpNAc-(1→4)-D-GlcpA, к которой могла быть отнесена эта гликозилтрансфераза, был сделан вывод, что Gtr69<sub>к32</sub> отвечает за образование этой связи (рис. 3).

Функции белков Atr9 (GenPept, номер доступа AHB32287.2) и Orf (GenPept, номер доступа AHB32288.2) не могли быть установлены, поскольку КПС не содержит ацетильных или других ацильных групп, и все особенности его структуры обусловлены наличием остальных генов в генном кластере KL32.

- Russo, T., Luke N., Beanan J., Olson R., Sauberan S., MacDonald U., Schultz L., Umland T., and Campagnari A. (2010) The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor, *Infect. Immun.*, 78, 3993–4000, doi: 10.1128/IAI.00366-10.
- Singh, J.K., Adams, F.G., and Brown, M.H. (2018) Diversity and function of capsular polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*, *Front. Microbiol.*, 9, 3301, doi: 10.3389/fmicb.2018.03301.
- Tipton, K.A., Chin, C.Y., Farokhyfar, M., Weiss, D.S., and Rather, P.N. (2018) Role of capsule in resistance to disinfectants, host antimicrobials, and desiccation in *Acinetobacter baumannii, Antimicrob. Agents Chemother.*, 62, doi: 10.1128/aac.01188-18.
- Geisinger, E., Huo, W., Hernandez-Bird, J., and Isberg, R.R. (2019) Acinetobacter baumannii: envelope determinants that control drug resistance, virulence, and surface variability, Ann. Rev. Microbiol., 73, 481–506, doi: 10.1146/ annurev-micro-020518-115714.
- Kenyon, J.J., and Hall, R.M. (2013) Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes, *PLoS One*, 8, e62160, doi: 10.1371/journal. pone.0062160.
- Traub, W.H. (1989) *Acinetobacter baumannii* serotyping for deliniation of outbreaks of nosocomial cross-infection, *J. Clin. Microbiol.*, 27, 2713–2716.
   Hu, D., Liu, B., Dijkshoorn, L., Wang, L., and Reeves, P.R.
- Hu, D., Liu, B., Dijkshoorn, L., Wang, L., and Reeves, P.R. (2013) Diversity in the major polysaccharide antigen of *Acinetobacter baumannii* assessed by DNA sequencing, and development of a molecular serotyping scheme, *PLoS One*, 8, e70329, doi: 10.1371/journal.pone.0070329.
- 8. e70329, doi: 10.1371/journal.pone.0070329.
   8. Senchenkova, S.N., Kenyon, J.J., Jia, T., Popova, A.V., Shneider, M.M., Kasimova, A.A., Shashkov, A.S., Liu, B., Hall, R.M., and Knirel, Y.A. (2019) The K90 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* LUH5553 contains di-*N*-acetylpseudaminic acid and is structurally related to the K7 polysaccharide from *A. bau*-

БИОХИМИЯ том 85 вып. 2 2020

Ранее генный кластер КL32 был обнаружен в штаммах, принадлежащих к широко распространенной глобальной клональной линии 2 (GC2, эквивалент сиквенс-типа ST2 в схеме MLST института Пастера [20]). В настоящей работе исследован штамм *A. baumannii* LUH5549 с генным кластером KL32, принадлежащий к сиквенс-типу ST354, что свидетельствует о распространении этого генного кластера среди различных клональных линий вследствие горизонтального генетического переноса между ними.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект 19-14-00273) для Ю.А.К. и гранта Australian Research Council (ARC) DECRA Fellowship 180101563 для Дж.Дж.К.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов изучения.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*mannii* LUH5533, *Carbohydr. Res.*, **479**, 1–5, doi: 10.1016/j.carres.2019.04.008.

- Shashkov, A.S., Senchenkova, S.N., Popova, A.V., Mei, Z., Shneider, M.M., Liu, B., Miroshnikov, K.A., Volozhantsev, N.V., and Knirel, Y.A. (2015) Revised structure of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* LUH5533 (serogroup O1) containing di-*N*-acetyllegionaminic acid, *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.*, 64, 1196–1199, doi: 10.1007/ s11172-015-1000-9.
- Senchenkova, S.N., Popova, A.V., Shashkov, A.S., Shneider, M.M., Mei, Z., Arbatsky, N.P., Liu, B., Miroshinikov, K.A., Volozhantsev, N.V., and Knirel, Y.A. (2015) Structure of a new pseudaminic acid-containing capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* LUH5550 having the KL42 capsule biosynthesis locus, *Carbohydr. Res.*, **407**, 154–157, doi: 10.1016/j.carres.2015.02.006.
   Kasimova, A.A., Kenyon, J.J., Arbatsky, N.P., Shashkov, A.S.,
- Kasimova, A.A., Kenyon, J.J., Arbatsky, N.P., Shashkov, A.S., Popova, A.V., Knirel, Y.A., and Hall, R.M. (2018) Structure of the K82 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* LUH5534 containing a D-galactose 4,6-pyruvic acid acetal, *Biochemistry (Moscow)*, 83, 831–835, doi: 10.1134/S0006297918070064.
- Shashkov, A.S., Liu, B., Kenyon, J.J., Popova, A.V., Shneider, M.M., Senchenkova, S.N., Arbatsky, N.P., Miroshnikov, K.A., Wang, L., and Knirel, Y.A. (2017) Structures of the K35 and K15 capsular polysaccharides of *Acinetobacter baumannii* LUH5535 and LUH5554 containing amino and diamino uronic acids, *Carbohydr. Res.*, 448, 28–34, doi: 10.1016/j.carres.2017.05.017.
- Kenyon, J.J., Shashkov, A.S., Senchenkova, S.N., Shneider, M.M., Liu, B., Popova, A.V., Arbatsky, N.P., Miroshnikov, K.A., Wang, L., Knirel, Y.A., and Hall, R.M. (2017) Acinetobacter baumannii K11 and K83 capsular polysaccharides have the same 6-deoxy-l-talose-containing pentasaccharide K units but different linkages between the K units, Int. J. Biol. Macromol., 103, 648–655, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.082.

- Shashkov, A.S., Kenyon, J.J., Arbatsky, N.P., Shneider, M.M., Popova, A.V., Miroshnikov, K.A., Hall, R.M., and Knirel, Y.A. (2016) Related structures of neutral capsular polysaccharides of *Acinetobacter baumannii* isolates that carry related capsule gene clusters KL43, KL47, and KL88, *Carbohydr. Res.*, 435, 173–179, doi: 10.1016/j.carres.2016.10.007.
   Westphal, O., and Jann, K. (1965) Bacterial lipopolysaccha-
- Westphal, O., and Jann, K. (1965) Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure, in *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Whistler, R. ed.) Academic press, New York, pp. 83–91.
- (Whistler, R. ed.) Academic press, New York, pp. 83–91.
  16. Sawardeker, J.S., Sloneker, J.H., and Jeanes, A. (1965) Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 37, 1602–1604, doi: 10.1021/ac60231a048.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., and Pevzner, P.A. (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing, *J. Comput. Biol.*, 19, 455–477, doi: 10.1089/cmb.2012.0021.
- (2012) SFAdes. a new genome assentioty algorithm and its applications to single-cell sequencing, *J. Comput. Biol.*, 19, 455–477, doi: 10.1089/cmb.2012.0021.
  18. Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., and Henrissat, B. (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013, *Nucleic Acids Res.*, 42, 490–495, doi: 10.1093/nar/gkt1178.
  10. Firm, P.D. Coerill, P. Ebarberder P.V. Eddy, S.P.
- Finn, R.D., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J., and Bateman, A. (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future, *Nucleic Acids Res.*, 44, 279–285, doi: 10.1093/nar/gkv1344.
- schultz, M.B., Thanh, D.P., Hoan, N.T.D., Wick, R.R., Ingle, D.J., Hawkey, J., Edwards, D.J., Kenyon, J.J., Lan, N.P.H., Campbell, J.I., Thwaites, G., Nhu, N.T.K., Hall, R.M., Fournier-Level, A., Baker, S., and Holt, K.E. (2016) Repeated local emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single hospital ward, *Microb*.

Genom., 2, e000050, doi: 10.1099/mgen.0.000050.

- Kenyon, J.J., Marzaioli, A.M., Hall, R.M., and De Castro, C. (2014) Structure of the K2 capsule associated with the *KL2* gene cluster of *Acinetobacter baumannii*, *Glycobiology*, 24, 554–563, doi: 10.1093/glycob/cwu024.
- Kasimova, A.A., Kenyon, J.J., Arbatsky, N.P., Shashkov, A.S., Popova, A.V., Shneider, M.M., Knirel, Y.A., and Hall, R.M. (2018) *Acinetobacter baumannii* K20 and K21 capsular polysaccharide structures establish roles for UDP-glucose dehydrogenase Ugd2, pyruvyl transferase Ptr2 and two glycosyltransferases, *Glycobiology*, 28, 876–884, doi: 10.1093/ glycob/cwy074.
- Lipkind, G.M., Shashkov, A.S., Knirel, Y.A., Vinogradov, E.V., and Kochetkov, N.K. (1988) A computer-assisted structural analysis of regular polysaccharides on the basis of <sup>13</sup>Cn.m.r. data, *Carbohydr. Res.*, **175**, 59–75, doi: 10.1016/ 0008-6215(88)80156-3.
- Jansson, P.E., Kenne, L., and Schweda, E. (1987) Nuclear magnetic resonance and conformational studies on monoacetylated methyl D-gluco- and D-galacto-pyranosides, J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1, 377–383, doi: 10.1039/P19870000377.
- Toukach, P. (2011) Bacterial Carbohydrate Structure Database 3: principles and realization, J. Chem. Inf. Model., 51, 159–170, doi: 10.1021/ci100150d.
- *Model.*, 51, 159–170, doi: 10.1021/ci100150d.
  Shashkov, A.S., Cahill, S.M., Arbatsky, N.P., Westacott, A.C., Kasimova, A.A., Shneider, M.M., Popova, A.V., Shagin, D.A., Shelenkov, A.A., Mikhailova, Y.V., Yanushevich, Y.G., Edelstein, M.V., Kenyon, J.J., and Knirel, Y.A. (2019) *Acinetobacter baumannii* K116 capsular polysaccharide structure is a hybrid of the K14 and revised K37 structures, *Carbohydr. Res.*, 484, 107774, doi: 10.1016/j.carres.2019.107774.
- Landersjö, C., Weintraub, A., and Widmalm, G. (1996) Structure determination of the O-antigen polysaccharide from the enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) O143 by component analysis and NMR spectroscopy, *Carbohydr. Res.*, 291, 209–216, doi: 10.1016/s0008-6215(96)00168-1.

# ELUCIDATION OF THE K32 CAPSULAR POLYSACCHARIDE STRUCTURE AND CHARACTERIZATION OF THE KL32 GENE CLUSTER

OF Acinetobacter baumannii LUH5549\*,\*\*

S. M. Cahill<sup>1#</sup>, N. P. Arbatsky<sup>2#</sup>, A. S. Shashkov<sup>2</sup>, M. M. Shneider<sup>3</sup>, A. V. Popova<sup>4,5</sup>, R. M. Hall<sup>6#</sup>, J. J. Kenyon<sup>1#</sup>, Yu. A. Knirel<sup>2\*\*\*#</sup>

<sup>1</sup> Institute of Health and Biomedical Innovation, School of Biomedical Sciences, Faculty of Health, Queensland University of Technology, QLD 4001 Brisbane, Australia

<sup>2</sup> Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; E-mail: yknirel@gmail.com

<sup>3</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

<sup>5</sup> State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279 Obolensk, Moscow Region, Russia <sup>6</sup> School of Life and Environmental Sciences, The University of Sydney, Sydney, Australia

> Received October 29, 2019 Revised November 25, 2019 Accepted November 26, 2019

Capsular polysaccharide (CPS) isolated from *Acinetobacter baumannii* LUH5549 carrying the KL32 capsule biosynthesis gene cluster, was studied by sugar analysis, Smith degradation, and one- and two-dimensional <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. The K32 CPS was found to be composed of branched pentasaccharide repeats (K units) containing two residues of  $\beta$ -D-GalpNAc and one residue of  $\beta$ -D-GlcpA ( $\beta$ -D-glucuronic acid) in the main chain and one residue of each of  $\beta$ -D-Glcp and  $\alpha$ -D-GlcpNAc in the side disaccharide chain. Consistent with the established CPS structure, the KL32 gene cluster includes genes for UDP-D-glucose 6-dehydrogenase (Ugd3) responsible for D-glucuronic acid (D-GlcA) synthesis and four glycosyltransferases that were assigned to specific linkages. Genes encoding acetyltransferase and unknown protein product were not involved in the CPS biosynthesis. Whilst the KL32 gene cluster has previously been found in the global clone 2 (GC2) lineage, LUH5549 belongs to the sequence type ST354, thus demonstrating horizontal gene transfer between these lineages.

Keywords: Acinetobacter baumannii, capsule, K locus, polysaccharide structure, glucuronic acid

УДК 577.152.51

## ГЛУТАМАТ-РАЦЕМАЗА НЕОБХОДИМА ДЛЯ ВЫЖИВАЕМОСТИ КЛЕТОК Streptococcus iniae И ЦЕЛОСТНОСТИ ИХ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ\*

© 2020 М. Мухаммад<sup>1,2</sup>, Дж. Бай<sup>1</sup>, А.Дж. Альхассан<sup>3</sup>, Х. Суле<sup>4</sup>, Дж. Цзюй<sup>1</sup>, Б. Чжао<sup>1\*\*</sup>, Д. Лю<sup>1\*\*</sup>

 <sup>1</sup> College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China; E-mail: morui19-hebtu@qq.com, pqw1234@163.com
 <sup>2</sup> Department of Biochemistry, Kano University of Science and Technology, Wudil, Nigeria
 <sup>3</sup> Department of Biochemistry, Bayero University, Kano, Nigeria
 <sup>4</sup> Department of Medical Laboratory Science, Bayero University Kano, Nigeria

> Поступила в редакцию 14.06.2019 После доработки 19.09.2019 Принята к публикации 07.10.2019

Streptococcus iniae является патогенным и зоонозным видом бактерий, который вызывает возникновение болезней у человека и гибель многих видов рыб. Как было недавно показано у бактерий наблюдается тенденция развития устойчивости к антибиотикам, что гарантирует интерес к этой теме и требует поиска новых подходов для борьбы с возникающей инфекцией. Глутамат-рацемаза (MurI) является широко распространенным ферментом, участвующим в процессе синтеза пептидогликанов, который играет значительную роль в поддержании целостности клеточной стенки. Однако необходимость в активной глутамат-рацемазе является видоспецифичной. В настоящей работе нами был произведен нокаут гена, кодирующего глутаматрацемазу в клетках S. iniae, и определена ее роль в поддержании целостности клеточной стенки. Кроме того, нами было осуществлено клонирование и экспрессия гена Murl, выделен и очищен его белковый продукт и определены его биохимические характеристики. Проведенный биохимический анализ показал, что ген MurI из S. iniae кодирует функционально активный фермент с молекулярной массой 30 кДа и оптимальными значениями температуры (35 °C) и pH (8,5). Ионы металлов, такие как Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup>, были способны ингибировать его активность. Ген MurI крайне необходим для обеспечения жизнеспособности клеток S. iniae и целостности их клеточной стенки. Оказалось, что для достижения оптимального роста мутантного штамма S. iniae необходимо обеспечить высокую концентрацию D-глутамата. Анализ проницаемости мембран клеток мутантного штамма показал увеличение повреждения клеточной стенки во время Dглутаматного голодания. Кроме того, мутантный штамм потерял свою вирулентность при инкубации в крови рыб. Наши результаты показали, что нокаут гена Murl приводит к появлению ауксотрофного штамма S. iniae с поврежденной клеточной стенкой.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** *Streptococcus iniae*, глутамат-рацемаза, нокаут гена, биохимическая характеристика целостности клеточной стенки.

DOI: 10.31857/S0320972520020128

Глутамат-рацемаза (ЕС 5.1.1.3, MurI) является независимым от присутствия кофакторов ферментом, который катализирует взаимопревращения L-глутаминовой и D-глутаминовой кислот. Этот фермент обеспечивает бактерии источником D-глутаминовой кислоты, которая является необходимым компонентом пептидогликана бактерий [1]. Пептидогликан представляет собой слой кристаллической решетчатой структуры, образованный из линейных цепей двух альтернативных аминосахаров, а именно N-ацетилглюкозамина (GlcNAc или NAGA) и N-ацетилмураминовой кислоты (MurNAc или NAMA), который защищает клетки от разрушения в результате действия градиента осмотического давления [2]. D-Глутаминовая кислота также является основным компонентом бактериальной капсулы [3]. В этом ферменте присутствует пара строго консервативных остатков цистеина (Cys74/Cys185), которые участвуют в двухопорном механизме переноса протона с α-атома углерода в молекуле глутаминовой кислоты на противоположную сторону стабилизированного промежуточного продукта в виде енолата [4]. Большинство бактерий имеют один

Принятые сокращения: MurI – глутамат-рацемаза.

<sup>\*</sup> Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/10541), том 85, вып. 2, 2020.

<sup>\*\*</sup> Адресат для корреспонденции.

ген глутамат-рацемазы. В то время как виды бацилл, такие как *Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bacillus subtilis* и некоторые другие бактерии, имеют два гена глутамат-рацемазы, которые экспрессируют различные изоферменты [5]. Кроме того, этот фермент отсутствует у человека, что делает его верным кандидатом для разработки новых антибиотиков [6].

Streptococcus iniae является грамположительной бактерией, наиболее часто регистрируемой в качестве патогена рыб, которая представляет угрозу здоровью людей в связи с тем, что она способна вызывать у людей бактериемию, целлюлит, менингит и остеомиелит [7]. В нашей предыдущей работе была продемонстрирована усиливаюшаяся угроза со стороны этих бактерий при получении морепродуктов и необходимость поиска возможных решений для борьбы с будущими вспышками. Для того чтобы выяснить роль глутамат-рацемазы в патогенности бактерий, необходимо получить клетки, мутантные по этим генам, и затем проанализировать их свойства. Необходимость *гена MurI* является сложным вопросом, и ответ на него, по-видимому, зависит от вида микроорганизма. Нокаут генов глутамат-рацемазы (racE1 и racE2) в клетках B. anthracis не оказывал заметного влияния на скорость роста бактерий. В то время как удаление обоих генов приводило к получению нежизнеспособных мутантных клеток [8]. Было показано, что для Escherichia coli ген MurI необходим для выживания бактерий [9], но не в случае Staphylococcus haemolyticus [10] и Bacillus sphaericus [11], у которых есть дополнительный фермент метаболизма D-аминокислот, превращающий L-глутаминовую кислоту в D-глутаминовую. Необходимость и свойства гена *MurI* из *S. iniae* еще не изучены. Кроме того, характеристика MurI из различных грамположительных и грамотрицательных бактерий имеет важное значение для лучшего понимания как общих, так и уникальных особенностей фермента, которые могут быть использованы для открытия новых лекарств и проведения исследований по получению мутантных штаммов с улучшенной активностью [12]. Целью настоящей работы было осуществление нокаута гена MurI из S. iniae и определение влияния этого воздействия на жизнеспособность и вирулентность бактерий, а также клонирование, экспрессия, очистка и определение биохимических характеристик изолированного фермента.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы бактерий и условия их культивирования. Штамм HNM-1 *Streptococcus iniae* был ранее получен в нашей лаборатории из инфицированного китайского осетра (*Acipenser sinensis*). Бактерии были идентифицированы с использованием обычных физиологических и биохимических методов. Ген 16S рРНК амплифицировали с использованием ПЦР, секвенировали, и полученные данные были размещены на сайте NCBI под кодом доступа КY781829. HNM-1 культивировали в среде ВНІ при температуре 30 °C. Штаммы DH5α и BL21 *E. coli* культивировали в среде LB (Luria Bertani), и в дальнейшем их использовали соответственно для клонирования и экспрессии белка.

Получение мутантного штамма S. iniae  $\Delta MurI$ . Для получения мутантного штамма, дефицитного по гену MurI, использовали плазмиду рК18mobsacB. Вышележащие и нижележащие участки гена MurI из S. iniae амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров MurI-up-F, MurI-up-R, MurI-down-F и MurIdown-R (таблица). Были использованы следующие сайты рестрикции: *Eco*RI и *Bam*HI для MurI-up-F и MurI-up-R, BamHI и XbaI для Murl-down-F и Murl-down-R соответственно. Фрагмент размером 1440 п.н., полученный с помощью ПЦР, содержащий фрагмент (740 п.н.), расположенный выше стартового кодона ATG, и фрагмент (700 п.н.), расположенный ниже стоп-кодона TCA гена Murl, был амплифицирован, прикреплен к вектору pMD19-Т и затем клонирован в pK18mobsacB, чтобы получить плазмиду pMZ1. Последовательности клонированных фрагментов ДНК pMZ1 были подтверждены с помощью секвенирования.

Плазмида pMZ1 была трансформирована в электрокомпетентные клетки *S. iniae* HNM-1. Стабильный мутантный штамм *ΔMurI* был получен в результате двух успешных кроссинговеров, как это было ранее описано [13]. Клоны, полученные в результате одиночного кроссинговера, были отобраны на планшетах, содержащих 50 мкг/мл канамицина. Клоны, полученные в результате проведения двойного кроссинговера, отбирали на планшетах, содержащих 10%-ную сахарозу и 16 мМ D-глутаминовой кислоты. Полученные результаты были проверены с помощью амплификации с использованием ПЦР и секвенирования с использованием праймеров MurI-up-F и MurI-down-R (таблица).

**Кривые роста.** Колонии клеток *S. iniae* дикого типа (WT) и мутантного штамма ( $\Delta MurI$ ) вводили в жидкую культуральную среду LB и Триптонного соевого дрожжевого экстракта (TSYE) и культивировали при 30 °С и 180 об./мин до поглощения при 600 нм ( $A_{600}$ ) ~0,1. Затем супернатант переносили в стерильные планшеты (по 300 мкл в лунку) и определяли жизнеспособ-

Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	5'-3' последовательность праймеров
MurI-up-F	5'-ATT <u>GAATTC</u> AGGGTTGGTGATTTGCTTG-3'
MurI-up-R	5'-ATT <u>GGATCC</u> CAACTGAGTTTTGCTTTG-3'
MurI-down-F	5'-ATT <u>GGATCC</u> ATGAATTTAAAGATAATGAC-3'
MurI-down-R	5'-TAT <u>TCTAGA</u> AATCATCCGCAAGAACCATC-3'
MurI-F	5'-GCG <u>CCATGG</u> ATGGATAATAGACCAATTG-3'
MurI-R	5'-GCTACTCGAGTAGGTCAATATGCTCCAC-3'

ность клеток с использованием прибора Bioscreen machine («Thermo Lab systems», США). В качестве добавок в образцы мутантного штамма *S. iniae*  $\Delta MurI$  вносили 14 мМ и 16 мМ D-глутаминовой кислоты. Через определенные промежутки времени измеряли поглощение образцов в соответствии с протоколом подготовки кривых роста, полученных на Bio-screen.

Определение жизнеспособности бактерий. Для того чтобы различить клетки с нативными мембранами и клетки с нарушенной целостностью мембран, использовали набор LIVE/DEAD®Bac Light<sup>™</sup>Bacterial Viability Kit («Molecular Probes<sup>™</sup>», «Life Technologies», CША) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 6 мкл смеси компонентов А и В красителя добавляли в каплю бактериальной суспензии после продолжительного голодания клеток по D-глутаминовой кислоте (20 и 30 ч) и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем регистрировали флуоресценцию с использованием эпифлуоресцентного микроскопа [14].

Определение выживаемости клеток в цельной крови. К разведенной, находящейся в лог-фазе, бактериальной культуре дикого типа и мутантного штамма *ΔMurI* (100 мкл) с поглощением при 600 нм (*A*<sub>600</sub>) 0,5 добавляли к 300 мкл свежей гепаринизированной крови (натриевая соль гепарина, «Sigma-Aldrich», США), полученной от трех различных китайских осетров A. sinensis, и инкубировали при 35 °С при покачивании на шейкере в течение 2 ч, после чего раскапывали в ячейки микропланшет с агаром TSYE. Процент живых бактерий рассчитывали по формуле: (КОЕ<sub>после совместной инкубации</sub>/КОЕ<sub>в исходном инокуляте</sub>) × 100%, где КОЕ – колониеобразующие единицы [15]. Для получения отрицательного контроля в гепаринизированную кровь рыб прямо вводили 100 мкл PBS.

Конструирование плазмиды для экспрессии Murl. Ген Murl был амплифицирован с помощью следующих праймеров Murl-F и Murl-R (табли-

БИОХИМИЯ том 85 вып. 2 2020

ца). Праймеры конструировали в соответствии с последовательностью генома штамма *S. iniae* 89353 (код доступа CP017953.1 в базе данных NCBI). Продукт ПЦР очищали и клонировали в вектор клонирования pMD19-T («Takara», Китай), проверяли секвенирование и переваривали с помощью ферментов рестрикции *NcoI* и *XhoI*, затем клонировали в вектор экспрессии pET-25b («Novagen», Германия). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей глутамат-рацемаз из различных видов бактерий проводили с помощью программы Clustal Omega.

Экспрессия и очистка белка Murl. Штамм E. coli BL 21 (DE3) был трансформирован плазмидой pET25b-MurI. Когда поглощение при 600нм ( $A_{600}$ ) достигало значения 0,5, проводили сверхэкспрессию белка путем добавления 1 мМ IPTG и инкубировали в течение ночи при 16 °C. Клетки лизировали ультразвуком в буфере, содержащем 50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0, 300 мМ NaCl и 10 мМ имидазола, затем центрифугировали при 8000 об./мин в течение 10 мин. Полученный супернатант собирали и очищали с использованием колонки Ni-NTA («Qiagen», Германия), затем диализовали против фосфатного солевого буфера (PBS, phosphate-buffered saline, pH 7,4). Чистоту белка и его концентрацию определяли с помощью электрофореза в SDS-ПААГ и набора для определения белка с использованием бицинхониновой кислоты BCA protein assay kit («Takara», Китай) соответственно.

Определение активности Murl. Примерно по 200 мл культуры дикого типа и мутантной культуры  $\Delta MurI$  в культуральной среде LB в присутствии D-глутаминовой кислоты и без нее инкубировали при 30 °C до достижения поглощения при 600 нм ( $A_{600}$ ), равного 0,7. Клетки собирали путем центрифугирования, дважды промывали, концентрировали 25× в 50 мМ Tris-HCl буфере (рН 8,0) и обрабатывали ультразвуком в водяной бане со льдом и солью. Соникацию проводили в течение 2 мин при 80% выходной мощности и 50% рабочем цикле. Полученные активные клеточные экстракты центрифугировали при 4 °С в течение 20 мин при 10 000 g и диализовали против 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Рацемизацию MurI проводили с использованием в качестве субстрата D-глутамата в реакционной смеси, содержащей 100 мкл 200 мМ Tris-HCl буфера, pH 8,5, 2 мМ дитиотрейтола (DTT) и 12 мМ Dглутаминовой кислоты. Запуск реакции производили путем добавления фермента, и затем инкубировали при 35 °C в течение 10 мин. Реакцию завершали добавлением 30 мкл 2 М HCl, помещали на 2 мин в лед и нейтрализовали добавлением 30 мкл 2 М NaOH. Далее осадки удаляли центрифугированием при 1400 об./мин в течение 5 мин. Продукт реакции рацемизации (L-глутаминовая кислота) определяли с помощью набора для анализа L-глутамата, L-glutamate Assay Kit («Megazyme», США) в соответствии инструкциями производителя. Набор содержал L-глутаматдегидрогеназу, диафоразу, НАДН и иодонитротетразолий хлорид (INT). Поглощение при 492 нм измеряли с помощью спектрофотометра для микропланшет Epoch microplate spectrophotometer («Biotech», США).

Биохимические свойства MurI из S. iniae. Оптимальное значение температуры для максимальной активности MurI определяли при различных значениях температуры (10, 20, 30, 35, 40 и 50 °C). В то время как термическую стабильность определяли путем инкубации фермента в течение 2 ч при 30, 35, 40 и 50 °С, остаточную активность фермента через различные интервалы времени измеряли в соответствии с условиями определения активности фермента. Используя в качестве 100% активность фермента в 0 ч рассчитывали относительную активность фермента. В то время как оптимальный pH MurI определяли при оптимальной температуре в 50 мМ Tris-HCl буферах (рН 6–12), стабильность фермента при различных значениях рН исследовали при инкубации фермента в течение 2 ч при трех значениях рН (7, 8,5 и 10). Относительную активность образца рассчитывали, используя в качестве 100% активность образца при 0 ч. Субстратную специфичность также определяли в стандартной реакционной смеси, содержащей 50 мМ Tris-HCl буфер (pH 8,5), 2 мМ DTT и различные концентрации субстратов (L/D-глутаминовая кислота, L/D-аспарагиновая кислота, L/D-гистидин и L/D-аланин). Реакционную смесь инкубировали при 35 °С в течение 10 мин, 40 мкл аликвоты реакционной смеси обрабатывали 280 мкл смеси 0,4 М борной кислоты, рН 9,0, 0,1% N-терт-бутилокси-карбонил-L-цистеина («Sigma», США) и 0,1% О-фталевого альдегида («Thirumalai Chemicals Limited», Индия) [16]. Кроме того, ионы металлов и некоторые химические соединения в конечной концентрации 10 мМ также были добавлены в реакционную смесь для рацемизации, и реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин. Остаточную активность фермента определяли при 35 °С в течение 10 мин согласно условиям стандартного метода определения активности фермента.

Статистическая обработка полученных данных. Статистический анализ был осуществлен с использованием программ SPSS 16.0 («SPSS Inc.», США) и Prism software program 7.0 («GraphPad Software, Inc.», США). Значения pбыли рассчитаны с использованием критерия Стьюдента. Значения p < 0,05 и < 0,01 рассматривались как статистически достоверные и высоко статистически достоверные соответственно. Результаты, полученные в результате проведения по крайней мере трех независимых экспериментов, представлены в виде средних значений ± стандартное отклонение.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Биоинформатический анализ гена, кодирующего глутамат-рацемазу. В соответствии с данными по геномной последовательности S. iniae, штамм 89353 (код доступа СР017952) в клетках S. iniae имеется один ген глутамат-рацемазы. Этот ген с открытой рамкой считывания длиной 795 п.н. кодирует белок, содержащий 265 аминокислотных остатков. Ген был секвенирован и размещен на сайте NCBI под кодом доступа MN385365. В сравнении с родственными белками из Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus agalactiae, B. anthracis, Mycobacterium smegmatis и Mycobacterium tuberculosis гомология его последовательности составляет 80,6; 78,4; 77,6; 75; 50,5; 40,38 и 38,40% соответственно. Множественное выравнивание показало, что функционально значимые остатки цистеина в активном центре фермента MurI из S. iniae также являются консервативными. В этом ферменте это аминокислотные остатки Cys73 и Cys186, которые соответствуют Cys 70 и Cys 178 в MurI из Aquifex pyrophilus и остаткам Cys 73 и Cys 184 в MurI из Lactobacillus fermenti соответственно (рис. S1 в Приложении) [17].

Конструирование мутантного (в результате делеции гена *MurI*) штамма. Плазмида pMZ1 была трансформирована в *S. iniae* HNM-1 с помощью электропорации, и транформанты, несущие плазмиду pMZ1, были отобраны в агаре LB, содержащем канамицин. Размещение трансформированных клеток в агаре с добавлением 10% (w/v) сахарозы и 16 ммоль/л D-глутаминовой кислоты привело к появлению изолированных колоний, у которых отсутствовали чувствительные к действию канамицина последовательности pK18mobsacB и которые представляли собой как культуру неизмененного дикого типа, так и мутантную культуру, не содержащую ген MurI. Делеция гена была подтверждена с помощью ПЦР и секвенирования, продукт ПЦР мутантных клеток был меньше продукта ПЦР клеток дикого типа (рис. S2, *а* в Приложении). Кроме того, при проведении ПЦР с использованием специфических праймеров ген MurI не был обнаружен (рис. S2, *b* в Приложении).

Ген *MurI* необходим для поддержания жизнеспособности клеток *S. iniae*. Мутантные клетки



**Рис. 1.** Кривые роста мутантных клеток *S. iniae*  $\Delta MurI$  и клеток дикого типа. *a* – Рост *S. iniae*  $\Delta MurI$  в среде TSYE и LB. В качестве контроля служат клетки *S. iniae* дикого типа, культивируемые в среде LB. *b* – В среду роста мутантного штамма *S. iniae*  $\Delta MurI$  добавляли 14 мМ и 16 мМ D-глутаминовой кислоты. SI – *S. iniae*, SI $\Delta MurI$  – Мутантный штамм *S. iniae* с делецией гена *MurI* 

штамма S. iniae  $\Delta MurI$  образуют маленькие колонии в чашках с агаром TSYE в сравнении со штаммом дикого типа, и они не способны расти в среде LB без добавления глутаминовой кислоты. Следует подчеркнуть, что мутантный штамм был способен расти в среде TSYE без добавления D-глутаминовой кислоты, хотя и с более низкой скоростью в сравнении со штаммом дикого типа (рис. 1, *a*). Добавление 16 мМ D-глутаминовой кислоты в среду LB приводило к значительному повышению жизнеспособности мутантных клеток (рис. 1, *b*). Поэтому можно считать, что ген *MurI* необходим для выживания клеток S. iniae.

Голодание по D-глутаминовой кислоте приводит к нарушению целостности клеточной стенки. Для оценки повреждения клеточной стенки мутантных по гену Murl клеток во время их культивирования был использован набор LIVE/DEAD BacLight kit («Invitrogen», CША). Этот набор содержит два красителя, пропидиум иодид (PI) и SYTO9, которые окрашивают нуклеиновые кислоты. Зеленый флуоресцирующий краситель SYTO9 может проникать внутрь клеток, и он используется для определения общего количества клеток, тогда как красный флуоресцирующий краситель РІ проникает только в клетки, у которых повреждена цитоплазматическая мембрана [18]. Общее количество клеток было определено с помощью метода эпифлуоресцентного анализа, проведенного после голодания по D-глутаминовой кислоте в течение 0, 20 и 30 ч (рис. 2, *a*). Полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки обоих типов находятся в интактном состоянии в среде, дополненной D-глутаминовой кислотой в момент времени 0 ч. Однако через 20 ч голодания по D-глутаминовой кислоте значительно возрастает количество поврежденных клеток мутантного штамма, тогда как клетки дикого типа остаются интактными (рис. 2, b). Со временем степень нарушения целостности клеточной стенки повышается в связи с длительным отсутствием D-глутаминовой кислоты.

Полученные нами результаты подтверждают значимость гена *MurI* для способности клеток *S. iniae* выживать и для целостности их клеточной стенки. Глутамат-рацемаза, кодируемая геном *MurI* из *S. iniae*, крайне необходима для поддержания целостности клеточной стенки, и этот ген может рассматриваться в качестве полезной мишени для разработки новых лекарственных препаратов против инфекции, вызванной *S. iniae*.

Мутантный штамм S. iniae  $\Delta MurI$  в крови рыб демонстрирует ослабленную вирулентность по сравнению со штаммом дикого типа. Одним из важнейших механизмов действия фагоцитов является генерация активных форм кислорода («окислительный взрыв»). Клетки штамма *ΔMurI* выращивали в крови рыб в течение 2 ч. В качестве контроля использовали клетки дикого типа и клетки мутантного штамма S. iniae  $\Delta MurI$ , pocшие в среде, дополненной D-глутаминовой кислотой (С  $\Delta MurI$ ). Мутантные клетки S. iniae  $\Delta MurI$  утратили устойчивость к врожденному иммунному ответу, так как имеют более низкую выживаемость (20%) в крови рыб по сравнению с диким типом. Полученные результаты показали, что бактерии штамма  $\Delta MurI$  имеют более низкую жизнеспособность по сравнению с диким типом (рис. 3). Способность бактерий избегать воздействия врожденного иммунного ответа является показателем их вирулентности, которая означает их способность наносить непоправимый ущерб организму, в который они попали [19].

Мутантный штамм *S. iniae* ∆*MurI* не обладает глутамат-рацемазной активностью. Были получены грубые клеточные экстракты клеток штамма дикого типа и мутантного штамма, и в них была определена ферментативная активность MurI.



**Рис. 2.** Влияние голодания клеток по D-глутаминовой кислоте на проницаемость клеточной стенки, определенное в результате двойного флуоресцентного окрашивания с помощью набора «LIVE/DEAD BacLight kit» при 0, 20 и 30 ч голодания. *a* – Число флуоресцирующих благодаря SYTO9 бактерий (черные столбики) и число флуоресцирующих благодаря PI бактерий (белые столбики) было определено по подсчетам в шести полях зрения. Результаты были выражены в виде числа клеток в одном мл. *b* – Верхняя панель: красные флуоресцентные сигналы (PI) мутантных клеток с поврежденными цитоплазматическими мембранами. Нижняя панель: зеленые флуоресцентные сигналы (SYTO9) клеток дикого типа с интактной клеточной стенкой во время пролонгированного голодания по D-глутаминовой кислоте. С цветным вариантом рис. 2, *b* можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/ journal/biokhsm/

Клетки дикого типа росли как в присутствии D-глутаминовой кислоты, так и без нее; при этом показывали примерно одинаковые уровни активности MurI. Напротив, не удалось обнаружить какую-либо активность MurI в экстрактах мутантного штамма  $\Delta MurI$ , приготовленных из клеток, выросших в присутствии или в отсутствие D-глутаминовой кислоты (рис. 4).

Экспрессия и выделение Murl из клеток S. iniae. Глутамат-рацемаза (SIMurl) из клеток S. iniae была очищена до гомогенного состояния с ис-



**Рис. 3.** Выживаемость клеток мутантного штамма *S. iniae*  $\Delta MurI$  в крови рыб. Клетки этого штамма *S. iniae* обладают меньшей выживаемостью в крови рыб в сравнении с клет-ками дикого типа. WT – штамм дикого типа,  $\Delta MurI$  – мутантный по гену *MurI* штамм, С  $\Delta MurI$  – мутантный по гену *MurI* штамм, С  $\Delta MurI$  – мутантный по гену *MurI* штамм при добавлении D-глутаминовой кислоты. \*\*\* p < 0,001

пользованием Ni-агарозной аффинной хроматографии. С помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS было определено, что рекомбинантный белок имел относительную молекулярную массу 30 кДа (рис. S3 в Приложении), что сходно с рассчитанной молекулярной массой 30 кДа в случае MurI из *Pediococcus pentosaceus* [20], в то время как MurI, выделенный из клеток *Lactobacillus plantarum* NC8, имел молекулярную массу 40 кДа [21].

Влияние температуры и pH на активность фермента. Предварительные эксперименты по сравнению свойств рекомбинантных белков до и после прикрепления на *N*-конце полипептидной цепи полигистидинового пептида, удаляемого тромбином, показали, что присутствие этого пептида не оказывает особого влияния на активность и свойства SIMurI [22].

Оптимальная температура для активности MurI из S. iniae оказалось равной 35 °C (рис. 5, a), в то время как в случае MurI из L. plantarum NC8 значение температурного оптимума достигало 50 °C [18, 19]. Оптимальное значение pH для MurI из S. iniae равно 8,5 (рис. 5, b), и это значение находится внутри диапазона оптимальных значений pH для MurI охарактеризованных ранее [18, 19, 21, 22].

Фермент сохранял свою активность почти на уровне 50% после инкубации в течение 1-30 ч при температурах 30–40 °С (рис. 5, *c*) и интервале рН 7,0–10,0 (рис. 5, *d*).



**Рис. 4.** Определение специфической активности глутаматрацемазы в экстрактах клеток *S. iniae*. Клетки мутантного штамма  $\Delta MurI$  не обладают активностью MurI

Влияние ионов металлов и химических соединений на активность фермента. Некоторые ионы металлов могут ингибировать активность Murl. Этот фермент показывал остаточную активность, равную 4,6; 17; 3; 7 и 23% в присутствии  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и Pb<sup>2+</sup> соответственно. Гидроксиламин снижал активность фермента на 73%, в то время как дитиотрейтол и ЭДТА, напротив, повышали его активность на 68 и 43% соответственно (рис. S4 в Приложении). Кроме того, было показано, что активность Murl из *Burkholderia cenoсерасіа* подавляется ионами Mn<sup>2+</sup>,  $Cu^{2+}$  и Zn<sup>2+</sup> [23].

Субстратная специфичность. Известно, что глутамат-рацемаза отличается высокой субстратной специфичностью. При использовании в качестве субстратов аспарагиновой кислоты гистидина и аланина дальнейший анализ с использованием ВЭЖХ не выявил никаких продуктов рацемизации. По сути, в плане субстратной специфичности MurI из *S. iniae* напоминает другие ранее охарактеризованные MurI [20, 21, 24, 25].

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

S. iniae — это патогенная бактерия, которая угрожает как здоровью человека, так и индустрии морских продуктов, приводя к огромным экономическим потерям во всем мире [26]. В настоящее время вакцинация, как правило, считается эффективным методом борьбы с частыми вспышками стрептококковой инфекции, и было получено несколько эффективных кандидатных субъединиц вакцины [27]. Штамм S. iniae HNM-1 был выделен из инфицированных китайских осетров A. Sinensis после вспышки болезни, которая спровоцировала высокую смертность среди рыб. В условиях возрастающей угрозы резистентности к антибиотикам и появления штаммов, устойчивых к лекарственным препаратам, поиск эффективных лекарственных мишеней и разработка новых антибиотиков широкого спектра действия являются верными подходами к решению этой проблемы [28].

Глутамат-рацемазы являются ферментами, которые имеют важное значение при синтезе пептидогликана, необходимого для создания клеточной стенки бактерий [2]. Необходимость в гене *MurI* является сложным вопросом, ответ на который зависит от биологического вида. Ген



**Рис 5.** Стабильность MurI при различных значениях температуры и pH. a – Оптимальное значение температуры – 35 °C. b – Оптимальное значение pH – 8,5. c – Стабильность при различных значениях температуры. d – Стабильность при различных значениях рH

*MurI* необходим для роста клеток *E. coli* и *S. pneu*moniae, геномы которых содержат только один ген MurI [29]. Нокаут какого-либо гена глутаматрацемазы в клетках *B. anthracis* (racE1 и racE2) не оказывает заметного влияния на скорость роста бактерий, в то время как делеция обоих генов (racE1 и racE2) приводит к образованию мутантных штаммов, которые являются нежизнеспособными [8]. Кроме того, бактерии, такие как S. haemolyticus и B. sphaericus, которые содержат трансферазы D-аминокислот, могут приводить к образованию значительных количеств D-глутаминовой кислоты из D-аланина, что может восполнить недостаток этого вещества в мутантных клетках, в которых произошла делеция гена Murl [30]. Было показано, что Murl является незаменимым геном у *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* [31–33].

С помощью биоинформатических методов было показано, что в клетках S. iniae обнаруживается только один ген глутамат-рацемазы, который кодирует функционально активный фермент, высокоспецифичный к своему субстрату, а оптимальные значения рН и температуры этой глутамат-рацемазы равны 8,5 и 35 °С соответственно. Больше генов, которые кодируют аминотрансферазы D-аминокислот в клетках S. iniae, не выявлено. Некоторые ионы металлов способны ингибировать ферментативную активность этой глутамат-рацемазы. Специфичность и различия в действии ионов металлов на активность MurI различных биологических видов свидетельствует о различиях в первичной структуре фермента. Таким образом, крайне важно очистить и охарактеризовать MurI из различных патогенных организмов, чтобы обеспечить более полное понимание их универсальных особенностей, которые могут быть использованы для скрининга новых ингибиторов. Однако для того чтобы ген мог быть использован в качестве мишени для создания новых лекарств, он должен быть необходим для выживания бактерий. Поскольку необходимость в гене MurI для выживания бактерий не является универсальной, чтобы установить значение этого гена, потребуется изучить множество различных видов бактерий [30].

Удаление гена *MurI* из клеток *S. iniae* было сложной задачей. Но изменив методику путем повышения концентрации субстрата (D-глутаминовая кислота) и используя более высокие значения напряжения для осуществления трансформации, ее удалось решить [34]. Кроме того, было показано, что поглощение D-глутамата бактериями может быть достигнуто при выделении мутантного штамма  $\Delta MurI$ , содержащего мутацию, позволяющую увеличить транспорт Dглутамата через плазматическую мембрану [31]. Мутантный штамм *S. iniae*  $\Delta MurI$  не жизнеспособен в культуральной среде LB без добавки Dглутаминовой кислоты. Интересно, что он смог расти в среде TSYE, но с меньшей скоростью по сравнению со штаммом дикого типа. Способность мутантного по гену MurI штамма расти в среде TSYE в отсутствие D-глутаминовой кислоты обусловлено присутствием в ней глюкозы и соли, которые обеспечивают осмотическую стабилизацию и защищают мутантные клетки от разрушения. Было показано, что бактерии с нарушенной клеточной стенкой обычно могут расти в культуральной среде, содержащей осмопротекторы, такие как глицерин, глюкозу и соли [35]. Добавление 16 мМ D-глутаминовой кислоты приводило к тому, что мутантный штамм начинал расти со скоростью, почти достигающей скорость роста штамма дикого типа.

Синтез D-глутаминовой кислоты имеет большое значение для формирования клеточной стенки, и поэтому глутамат-рацемаза может служить мишенью для направленного действия новых антибиотиков [36]. Ауксотрофные по D-глутаминовой кислоте штаммы, полученные в результате инактивации гена MurI и гена, кодирующего трансаминазу D-аминокислот, также могут быть использованы в качестве эффективных аттенуированных живых бактериальных вакцин. Cabral et al. [37] получили такие D-глутамат-ауксотрофные вакцины против трех патогенов человека: Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa и Staphylococcus aureus. Ауксотрофные вакцины, полученные на основе штамма P. aeruginosa, запускали соответствующие клеточные иммунные ответы и образование специфических перекрестно реагирующих антител в вакцинированных мышах и способствовали их долгосрочному выживанию в условиях их инфицирования летальными дозами P. aeruginosa. Эти вакцины также быстро выводились из организма хозяина без возникновения заболевания [37, 38].

Клетки S. iniae содержат один ген функциональной глутамат-рацемазы, и нет ни одного гена аминотрансфераз D-аминокислот. В ходе нашей работы было показано, что инактивация гена MurI в клетках S. iniae оказывает влияние на выживаемость мутантных клеток и их вирулентные свойства, что, в общем, подчеркивает значение и жизненную необходимость в этом ферменте для выживаемости S. iniae. Полученные нами результаты также позволяют предположить, что мутантный штамм S. iniae  $\Delta MurI$  может быть использован в дальнейших работах в качестве живой аттенуированной вакцины или использовать фермент в качестве уязвимой мишени для разработки антибиотиков, направленных против патогенной бактерии S. iniae.

Финансирование. Выполнение данной работы было поддержано Фондом естественных наук провинции Хэбэй (Natural Science Foundation of Неbei Province, грант № С2019205044), Фондом поддержки молодых ученых департамента образования провинции Хэбэй (Outstanding Youth Foundation of Department of Education of Hebei Province, грант № YQ2014026), Исследовательским фондом нормального университета провинции Хэбэй (the Research Fund of Hebei Normal University, грант № L2016Z03), Государственной центральной лабораторией изучения патогенов и биобезопасности (State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity при Академии военно-медицинской науки, грант № SKLPBS1529) и программой научно-исследовательских и технологических работ нормального университета провинции Хэбэй (the Science and Technology Research Project of Hebei Normal University, грант № ZD2018070).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все эксперименты над лабораторными животными были проведены в строгом соответствии с рекомендациями, изложенными в руководстве по уходу и использованию лабораторных животных провинции Хэбэй, Китай (Guide for the Care and Use of the Laboratory Animals of Hebei Province of China). Протокол экспериментов над лабораторными животными был одобрен комитетом по наблюдению за лабораторными животными нормального университета провинции Хэбэй (Animal Monitoring Committee of Hebei Normal University).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mehboob, S., Guo, L., Fu, W., Mittal, A., Yau, T., Truong, K., Johlfs, M., Long, F., Fung, L.W.-M., and Johnson, M.E. (2009) Glutamate racemase dimerization inhibits dynamic conformational flexibility and reduces catalytic rates, *Biochemistry*, 48, 7045–7055, doi: 10.1021/bi9005072.
- Rogers, H.J., Perkins, H.R., and Ward, J.B. (1980) *Microbial cell walls and membranes*, (Chapman and Hall), Springer, London, pp. 72–104, doi: 10.1007/978-94-011-6014-8.
- Prosser, G.A., Rodenburg, A., Khoury, H., de Chiara, C., Howell, S., Snijders, A.P., and de Carvalho, L.P.S. (2016) Glutamate racemase is the primary target of β-chloro-Dalanine in *Mycobacterium tuberculosis, Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 6091–6099, doi: 10.1128/AAC.01249-16.
   Whalen, K.L., Pankow, K.L., Blanke, S.R., and Spies, M.A.
- Whalen, K.L., Pankow, K.L., Blanke, S.R., and Spies, M.A. (2009) Exploiting enzyme plasticity in virtual screening: high efficiency inhibitors of glutamate racemase, *ACS Med. Chem. Lett.*, 1, 9–13, doi: 10.1021/ml900005b.
- Fisher, S.L. (2008) Glutamate racemase as a target for drug discovery, *Microb. Biotechnol.*, 1, 345–360, doi: 10.1111/ j.1751-7915.2008.00031.x.
- Dean, S.F., Whalen, K.L., and Spies, M.A. (2015) Biosynthesis of a novel glutamate racemase containing a site-specific 7-hydroxycoumarin amino acid: enzyme-ligand promiscuity revealed at the atomistic level, *ACS Cent. Sci.*, 1, 364–373, doi: 10.1021/acscentsci.5b00211.
- Agnew, W., and Barnes, A.C. (2007) *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination, *Vet. Microbiol.*, **122**, 1–15, doi: 10.1016/j.vetmic.2007.03.002.
- Oh, S.-Y., Richter, S.G., Missiakas, D.M., and Schneewind, O. (2015) Glutamate racemase mutants of *Bacillus anthracis*, *J. Bacteriol.*, **197**, 1854–1861, doi: 10.1128/JB.00070-15.
- Doublet, P., Van Heijenoort, J., Bohin, J.-P., and Mengin-Lecreulx, D. (1993) The murl gene of *Escherichia coli* is an essential gene that encodes a glutamate racemase activity, *J. Bacteriol.*, **175**, 2970–2979, doi: 10.1128/jb.175. 10.2970-2979.1993.
- Pucci, M.J., Thanassi, J.A., Ho, H.T., Falk, P.J., and Dougherty, T.J. (1995) *Staphylococcus haemolyticus* contains two D-glutamic acid biosynthetic activities, a glutamate racemase and a D-amino acid transaminase, *J. Bacteriol.*, 177, 336–342, doi: 10.1128/jb.177.2.336-342.1995.
- Fotheringham, I.G., Bledig, S.A., and Taylor, P.P. (1998) Characterization of the genes encoding D-amino acid transaminase and glutamate racemase, two D-glutamate biosynthetic enzymes of *Bacillus sphaericus* ATCC 10208, *J. Bacteriol.*, **80**, 4319–4323.

- Vance, N.R., Witkin, K.R., Rooney, P.W., Li, Y., Pope, M., and Spies, M.A. (2018) Elucidating the catalytic power of glutamate racemase by investigating a series of covalent inhibitors, *ChemMedChem*, 13, 2514–2521, doi: 10.1002/cmdc.201800592.
- Ferain, T., Hobbs, J., Richardson, J., Bernard, N., Garmyn, D., Hols, P., Allen, N., and Delcour, J. (1996) Knockout of the two ldh genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*, *J. Bacteriol.*, **178**, 5431–5437, doi: 10.1128/jb.178.18.5431-5437.1996.
- Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H.-U., and Egli, T. (2007) Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 3283–3290, doi: 10.1128/AEM.02750-06.
- Buchanan, J.T., Colvin, K.M., Vicknair, M.R., Patel, S.K., Timmer, A.M., and Nizet, V. (2008) Strain-associated virulence factors of *Streptococcus iniae* in hybrid-striped bass, *Vet. Microbiol.*, 131, 145–153, doi: 10.1016/j.vetmic.2008.02.027.
- Hashimoto, A., Nishikawa, T., Oka, T., Takahashi, K., and Hayashi, T. (1992) Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cysteine and o-phthaldialdehyde, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, **582**, 41–48.
   Hwang, K.Y., Cho, C.-S., Kim, S.S., Sung, H.-C., Yu, Y.G.,
- Hwang, K.Y., Cho, C.-S., Kim, S.S., Sung, H.-C., Yu, Y.G., and Cho, Y. (1999) Structure and mechanism of glutamate racemase from *Aquifex pyrophilus*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 6, 422, doi: 10.1038/8223.
- Stocks, S., (2004) Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight, *Cytometry A*, 61, 189–195, doi: 10.1002/cyto.a.20069.
- Liu, G.Y., Essex, A., Buchanan, J.T., Datta, V., Hoffman, H.M., Bastian, J.F., Fierer, J., and Nizet, V. (2005) *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity, *J. Exp. Med.*, 202, 209–215, doi: 10.1084/jem.20050846.
- Nakajima, N., Tanizawa, K., Tanaka, H., and Soda, K. (1986) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the glutamate racemase gene from *Pediococcus pentosaceus, Agric. Biol. Chem.*, 50, 2823–2830, doi: 10.1271/bbb1961.50.2823.
- Böhmer, N., Dautel, A., Eisele, T., and Fischer, L. (2013) Recombinant expression, purification and characterisation of the native glutamate racemase from *Lactobacillus plantarum* NC8, *Protein Express. Purif.*, **88**, 54–60, doi: 10.1016/j.pep.2012.11.012.
- 22. Dodd, D., Reese, J.G., Louer, C.R., Ballard, J.D., Spies, M.A., and Blanke, S.R. (2007) Functional comparison of the two

295

*Bacillus anthracis* glutamate racemases, *J. Bacteriol.*, **189**, 5265–5275, doi: 10.1128/JB.00352-07.

- Israyilova, A., Buroni, S., Forneris, F., Scoffone, V.C., Shixaliyev, N.Q., Riccardi, G., and Chiarelli, L.R. (2016) Biochemical characterization of glutamate racemase – a new candidate drug target against *Burkholderia cenocepacia* infections, *PLoS One*, **11**, e0167350, doi: 10.1371/journal. pone.0167350.
- Ashiuchi, M., Tani, K., Soda, K., and Misono, H. (1998) Properties of glutamate racemase from *Bacillus subtilis* IFO 3336 producing poly-γ-glutamate, *J. Biochem.*, **123**, 1156–1163, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem. a022055.
- 25. Potrykus, J., Flemming, J., and Bearne, S.L. (2009) Kinetic characterization and quaternary structure of glutamate racemase from the periodontal *Anaerobe Fusobacterium* nucleatum, *Arch. Biochem. Biophys.*, **491**, 16–24, doi: 10.1016/j.abb.2009.009.
- Sheng, X., Liu, M., Liu, H., Tang, X., Xing, J., and Zhan, W. (2018) Identification of immunogenic proteins and evaluation of recombinant PDHA1 and GAPDH as potential vaccine candidates against *Streptococcus iniae* infection in flounder (*Paralichthys olivaceus*), *PLoS One*, **13**, e0195450, doi: 10.1371/journal.pone.0195450.
- Kim, M.S., Choi, S.H., and Kim, K.H. (2015) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from *Streptococcus iniae* shows potential as a subunit vaccine against various Streptococcal species, *J. Fish Pathol.*, 28, 9–15, doi: 10.7847/jfp.2015.28.1.009.
   Muhammad, M., Li, Y., Gong, S., Shi, Y., Ju, J., Zhao, B.,
- Muhammad, M., Li, Y., Gong, S., Shi, Y., Ju, J., Zhao, B., and Liu, D. (2019) Purification, characterization and inhibition of alanine racemase from a pathogenic strain of *Streptococcus iniae*, *Pol. J. Microbiol.*, **68**, 331–341, doi: 10.33073/pjm-2019-036.
- Song, J.-H., Ko, K.S., Lee, J.-Y., Baek, J.Y., Oh, W.S., Yoon, H.S., Jeong, J.-Y., and Chun, J. (2005) Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis, *Mol. Cells*, **19**, 365–374.

- Kimura, K., Tran, L.-S.P., and Itoh, Y. (2004) Roles and regulation of the glutamate racemase isogenes, racE and yrpC, in *Bacillus subtilis*, *Microbiology*, **150**, 2911–2920, doi: 10.1099/mic.0.27045-0.
- Li, Y., Mortuza, R., Milligan, D.L., Tran, S.L., Strych, U., Cook, G.M., and Krause, K.L. (2014) Investigation of the essentiality of glutamate racemase in *Mycobacterium smegmatis*, *J. Bacteriol.*, **196**, 4239–4244, doi: 10.1128/JB.02090-14.
- 32. Morayya, S., Awasthy, D., Yadav, R., Ambady, A., and Sharma, U. (2015) Revisiting the essentiality of glutamate racemase in *Mycobacterium tuberculosis*, *Gene*, 555, 269–276, doi: 10.1016/j.gene.2014.11.017.
- Mortuza, R., Aung, H.L., Taiaroa, G., Opel-Reading, H.K., Kleffmann, T., Cook, G.M., and Krause, K.L. (2018) Overexpression of a newly identified d-amino acid transaminase in *Mycobacterium smegmatis* complements glutamate racemase deletion, *Mol. Microbiol.*, 107, 198–213, doi: 10.1111/mmi.13877.
- Dougherty, T.J., Thanassi, J.A., and Pucci, M.J. (1993) The *Escherichia coli* mutant requiring D-glutamic acid is the result of mutations in two distinct genetic loci, *J. Bacteriol.*, 175, 111–116, doi: 10.1128/ib.175.1.111-116.1993.
- 175, 111–116, doi: 10.1128/jb.175.1.111-116.1993.
   Zhang, J., Liu, J., Ling, J., Tong, Z., Fu, Y., and Liang, M. (2016) Inactivation of glutamate racemase (MurI) eliminates virulence in *Streptococcus mutans*, *Microbiol. Res.*, 186, 1–8, doi: 10.1016/j.micres.2016.02.003.
- Malapati, P., Krishna, V.S., Nallangi, R., Meda, N., Srilakshmi, R.R., and Sriram, D. (2018) Lead identification and optimization of bacterial glutamate racemase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, 26, 177–190, doi: 10.1016/j.bmc.2017.11.031.
   Cabral, M.P., García, P., Beceiro, A., Rumbo, C., Pérez, A.,
- Cabral, M.P., García, P., Beceiro, A., Rumbo, C., Pérez, A., Moscoso, M., and Bou, G. (2017) Design of live attenuated bacterial vaccines based on D-glutamate auxotrophy, *Nat. Commun.*, 8, 15480, doi: 10.1038/ncomms15480.
- Tümmler, B. (2019) Emerging therapies against infections with *Pseudomonas aeruginosa*, *F1000Res.*, 8, doi: 10.12688/ f1000research.19509.1.

## SIGNIFICANCE OF GLUTAMATE RACEMASE FOR THE VIABILITY AND CELL WALL INTEGRITY OF Streptococcus iniae\*

### M. Muhammad<sup>1,2</sup>, J. Bai<sup>1</sup>, A. J. Alhassan<sup>3</sup>, H. Sule<sup>4</sup>, J. Ju<sup>1</sup>, B. Zhao<sup>1\*\*</sup>, and D. Liu<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China; E-mail: morui19-hebtu@qq.com, pqw1234@163.com

<sup>2</sup> Kano University of Science and Technology, Deprtment of Biochemistry, Wudil, Nigeria

<sup>3</sup> Bayero University, Department of Biochemistry, Kano, Nigeria

<sup>4</sup> Bayero University Kano, Department of Medical Laboratory Science, Kano, Nigeria

Received June 14, 2019 Revised September 19, 2019 Acceptad October 7, 2019

Streptococcus iniae is a pathogenic and a zoonotic bacterium responsible for human diseases and mortality of many fish species. Recently, this bacterium has demonstrated an increasing trend for antibiotics resistance, which has warranted a search for new approaches to tackle its infection. Glutamate racemase (MurI) is a ubiquitous enzyme of the peptidoglycan synthesis pathway that plays an important role in the cell wall integrity maintenance; however, the significance of this enzyme differs in different species. In this study, we knocked out the *MurI* gene in *S. iniae* in order to elucidate the role of glutamate racemase in maintaining cell wall integrity in this bacterial species. We also cloned, expressed, and purified MurI and determined its biochemical characteristics. Biochemical analysis revealed that the *MurI* gene in *S. iniae* encodes a functional enzyme with a molecular weight of 30 kDa, temperature optimum at  $35^{\circ}$ C, and pH optimum at 8.5. Metal ions, such as  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ , inhibited the enzyme activity. *MurI* was found to be essential for the viability and cell wall integrity of *S. iniae*. The optimal growth of the MurI-deficient *S. iniae* mutant can be achieved only by adding a high concentration of D-glutamate to the medium. Membrane permeability assay of the mutant showed an increasing extent of the cell wall damage with time upon D-glutamate starvation. Moreover, the mutant lost its virulence when incubated in fish blood. Our results demonstrated that the *MurI* knockout leads to the generation of *S. iniae* auxotroph with damaged cell walls.

Keywords: Streptococcus iniae, glutamate racemase, gene knockout, cell wall integrity biochemical characterizations