

СОДЕРЖАНИЕ

Том 86, выпуск 7, 2021

Неканоническая активность эндоканнабиноидов и их рецепторов в центральных и периферических синапсах (обзор) <i>О.П. Балезина, Е.О. Тарасова, А.Е. Гайдуков</i>	947
COVID-19: мифы и реальность (обзор) <i>Л.В. Кордюкова, А.В. Шанько</i>	964
Пространственная структура и РНК-связывающие свойства Lsm-белка из <i>Halobacterium salinarum</i> <i>М.С. Фандо, А.О. Михайлина, Н.В. Леконцева, С.В. Тищенко, А.Д. Никулин</i>	985
Получение трансгенных эмбриональных стволовых клеток крысы с использованием системы CRISPR/Cpf1 для индуцируемого нокаута генов <i>В.В. Шерстюк, С.М. Закиян</i>	996
Участие карбоангидразы САНЗ в структурно-функциональной стабилизации водоокисляющего комплекса фотосистемы 2 из <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>А.К. Шукшина, В.В. Терентьев</i>	1006
Эффекты ингибиторов супероксиддисмутазы и глюкозы на гибель клеток и образование активных форм кислорода в листьях гороха <i>В.Д. Самуилов, Д.Б. Киселевский, Е.В. Дзюбинская, О.Ю. Фролова</i>	1018
Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (CDNF): структура, функции и терапевтический потенциал (обзор) <i>Д.В. Ерёмин, Т.В. Ильчибаева, А.С. Цыбко</i>	1027
Дефицит РТИР в В-лимфоцитах снижает запасание подкожного жира у мышей <i>Y. Xu, D. Zhu, Q. Yang, D. Su, and Y.Q. Chen</i>	1043
Состояния 1 и 2 в фотосинтетическом аппарате красных микроводорослей и цианобактерий <i>Ю.В. Большевцева, И.В. Тропин, И.Н. Стадничук</i>	1054
Неспецифический синтез нуклеиновых кислот в реакциях изотермической амплификации (обзор) <i>Н.В. Зырина, В.Н. Антипова</i>	1066
Изучение взаимодействия С-концевого домена белка muRif1 меченного МВР с G-квадруплексами ДНК с помощью поверхностного плазмонного резонанса <i>H. Ghadiri, S. Alavi, B. Dabirmanesh, and K. Khajeh</i>	1078
В ПОМОЩЬ АВТОРУ	
Точность в терминологии <i>А.А. Байков</i>	1087

CONTENTS

Vol. 86, Publ. 7, 2021

Noncanonical Activity of Endocannabinoids and Their Receptors in Central and Peripheral Synapses (Review) <i>O. P. Balezina, E. O. Tarasova, and A. E. Gaydukov</i>	947
COVID-19: Myths and Reality (Review) <i>L. V. Kordyukova and A. V. Shanko</i>	964
Structure and RNA-Binding Properties of LSM Protein from <i>Halobacterium salinarum</i> <i>M. S. Fando, A. O. Mikhaylina, N. V. Lekontseva, S. V. Tishchenko, and A. D. Nikulin</i>	985
Generation of Transgenic Rat Embryonic Stem Cells Using the CRISPR/Cpf1 System for Inducible Gene Knockout <i>V. V. Sherstyuk and S. M. Zakian</i>	996
Involvement of Carbonic Anhydrase CAH3 in Structural and Functional Stabilisation of the Water-Oxidizing Complex of Photosystem II from <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>A. K. Shukshina and V. V. Terentyev</i>	1006
Effects of Superoxide Dismutase Inhibitors and Glucose on Cell Death and Generation of Reactive Oxygen Species in Pea Leaves <i>V. D. Samuilov, D. B. Kiselevsky, E. V. Dzyubinskaya, and O. Yu. Frolova</i>	1018
Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor (CDNF): Structure, Functions, and Therapeutic Potential (Review) <i>D. V. Eremin, T. V. Ilchibaeva, and A. S. Tsybko</i>	1027
PTIP Deficiency in B Lymphocytes Reduces Subcutaneous Fat Deposition in Mice <i>Yaqin Xu, Doudou Zhu, Qin Yang, Dan Su, and Yong Q. Chen</i>	1043
State 1 and State 2 in the Photosynthetic Apparatus of Red Microalgae and Cyanobacteria <i>Yu. V. Bolychevtseva, I. V. Tropin, and I. N. Stadnichuk</i>	1054
Nonspecific Synthesis in the Reactions of Isothermal Nucleic Acid Amplification (Review) <i>N. V. Zyrina and V. N. Antipova</i>	1066
Characterization of Interaction of the MBP-Tagged muRif1-C-Terminal Domain with G-Quadruplex DNA by SPR <i>H. Ghadiri, S. Alavi, B. Dabirmanesh, and K. Khajeh</i>	1078
TO HELP AN AUTHOR	
Accuracy in Terminology <i>A. A. Baykov</i>	1087

УДК 577.25

НЕКАНОНИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭНДОКАННАБИНОИДОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В ЦЕНТРАЛЬНЫХ И ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ СИНАПСАХ

Обзор

© 2021 О.П. Балежина, Е.О. Тарасова, А.Е. Гайдуков*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: gaydukov@gmail.com

Поступила в редакцию 16.03.2021

После доработки 29.04.2021

Принята к публикации 29.04.2021

В обзоре рассмотрены новые аспекты активности и механизмов действия эндоканнабиноидов в центральных и периферических синапсах, отличные от их общеизвестной роли, как сигнальных молекул для ретроградного торможения секреции медиаторов с участием специфических пресинаптических рецепторов СВ1- и СВ2-типа. Описана способность эндогенных и синтетических каннабиноидов к смешённому агонизму, сопряжению СВ1 и СВ2 не только с каноническими G-белками G_i-типа, но и G_s-, G_q- и другими типами, а также с β-аррестинами, как триггерами дополнительных сигнальных каскадов в синапсах. Обсуждаются примеры неканонической тонической активности эндоканнабиноидов и их рецепторов и их роль в синапсах. Приводятся сведения об участии эндоканнабиноидов в процессах кратковременной и долговременной потенциации синаптической передачи в ЦНС, а также обнаруженные недавно облегчающие эффекты эндоканнабиноидов в периферических моторных синапсах млекопитающих в виде увеличения размера квантов ацетилхолина в нервных терминалях и других параметров передачи. Делается вывод, что эндоканнабиноидная сигнальная система имеет более широкий, чем представлялось ранее, диапазон модулирующих, причём разнонаправленных (тормозных и облегчающих), влияний на секрецию медиаторов. Переосмысление её потенциальных функциональных возможностей и механизмов действия с учётом неканонических свойств позволит более глубоко и разносторонне оценить и использовать эту систему как в норме, так и при патологиях нервной и других систем организма.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эндоканнабиноиды, рецепторы СВ1 и СВ2, β-аррестины, тонус эндоканнабиноидов, потенциация синаптической передачи.

DOI: 10.31857/S0320972521070010

ВВЕДЕНИЕ

Эндоканнабиноиды – специфическое семейство сигнальных молекул липидной природы (производных арахидоновой кислоты), образующихся в нейронах и других клетках благодаря активности специальных ферментов, синтезирующих эндоканнабиноиды из фосфолипидов клеточной мембраны. Согласно первоначальной парадигме, сформулированной вскоре после их открытия у животных в конце 80-х годов XX века (и общепризнанной до сих пор), ос-

новная роль эндоканнабиноидов, синтезируемых в постсинаптических структурах в ответ на активность центральных синапсов, заключается в последующем высвобождении и ретроградном пресинаптическом действии на эндоканнабиноидные рецепторы (СВ), что и приводит к торможению секреции медиаторов.

Наиболее известными и главными из числа синтезируемых в организме животных эндоканнабиноидов считаются арахидонилэтаноламин – анандамид (AEA) и 2-арахидоноил-глицерол (2-AG), хотя описан и ряд других эндо-

Принятые сокращения: АХ – ацетилхолин; ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; МПКП – миниатюрные потенциалы концевой пластинки; АС – аденилатциклаза; АЕА – арахидонилэтаноламин (анандамид); 2-AG – 2-арахидоноил-глицерол; СВ – эндоканнабиноидные рецепторы; DAG – диацилглицерол; DAGLα – диацилглицерол-липаза альфа; DSE – индуцированное деполяризацией подавление возбуждения; DSI – индуцированное деполяризацией подавление торможения; LTD – долговременная депрессия; LTP – долговременная потенциация; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; PKA – протеинкиназа А; PLC – фосфолипаза С; THC – дельта-9-тетрагидроканнабинол; WIN – (R)-(+)-[2,3-дигидро-5-метил-3-(4-морфолинилметил) пирроло [1,2,3-де]-1,4-бензоксазин-6-ил]-1-нафтalenилметанон мезилат.

* Адресат для корреспонденции.

каннабиноидов, которые количественно менее представлены в ЦНС и роль которых остаётся пока менее изученной.

Важной особенностью двух основных эндоканнабиноидов (AEA и 2-AG) является то, что их предшественники всегда находятся непосредственно в составе клеточной мембраны. Это облегчает образование эндоканнабиноидов из определенных фосфолипидов мембраны с помощью специфических ферментов: синтез AEA обеспечивает N-ацилфосфатидилэтаноламин-специфическая фосфолипаза D (NAPE-PLD), а 2-AG – диацилглицерол-липаза альфа (DAGL α). Из нервной и других тканей выделены и идентифицированы специфические мембранные каннабиноидные рецепторы двух основных типов – CB1 и CB2. Оба типа принадлежат к семейству

рецепторов, сцепленных с G-белками и содержащих 7 трансмембранных доменов. При этом 2-AG является полным агонистом обоих типов рецепторов, тогда как AEA – их частичным агонистом. Недавно описаны потенциально новые типы эндоканнабиноидных рецепторов, сопряжённые с G-белками, роль которых остаётся малоизученной [1]. В ЦНС представлен в основном CB1, тогда как CB2 локализован преимущественно на периферии, хотя в последнее время его присутствие и специфическая активность выявлены и обсуждаются и в ЦНС [2, 3]. Наряду с активацией классических CB-рецепторов, эндоканнабиноиды способны модулировать ряд подтипов каналов транзитного рецепторного потенциала (TRP), а также ядерные рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (PPAR) [4, 5].

Согласно канонической версии эндоканнабиноидной сигнализации, CB1 и CB2, являясь рецепторами с семью трансмембранными доменами, сопряжены с внутриклеточными тримерными периферическими G-белками с субъединицей G $\alpha_{i/o}$ -типа [6, 7]. Соответственно, при взаимодействии эндоканнабиноидов с CB-рецепторами сопряжённые G $_i$ -белки, активируясь, запускают сигнальные каскады, приводящие к ингибированию аденилатциклазы (AC), снижению уровня cAMP и активности протеинкиназы A (PKA) [8]. Одновременно при активации CB может происходить активация митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) нервных терминалей [9, 10]. В качестве конечных мишеней сигнальных каскадов, запускаемых при активации CB-рецепторов, описано снижение активности пресинаптических потенциал-зависимых Ca $^{2+}$ -каналов Ca $v_2.1$ и Ca $v_2.2$, обозначаемых также как P/Q- и N-тип соответственно, или увеличение пресинаптической калиевой проводимости за счёт усиления активности некоторых типов K $^+$ -каналов, в частности K $_A$ -типа или G-белок-связанных калиевых каналов входящего выпрямления [7, 11]. В обоих случаях реализация эффекта происходит вследствие взаимодействия $\beta\gamma$ -субъединиц активированного G $_i$ -белка с ионными каналами. Одновременно происходит снижение активности аденилатциклазы (AC) с участием α -субъединицы G $_i$ -белка [12]. Считается, что торможение пресинаптических кальциевых и/или активация калиевых каналов в конечном итоге и приводит к подавлению секреции медиатора в нервных терминалях синапсов в ответ на действие эндоканнабиноидов.

На рис. 1 суммированы механизмы образования и канонические сигнальные пути, обеспечивающие тормозные влияния эндоканнабиноидов на секрецию различных медиаторов – глу-

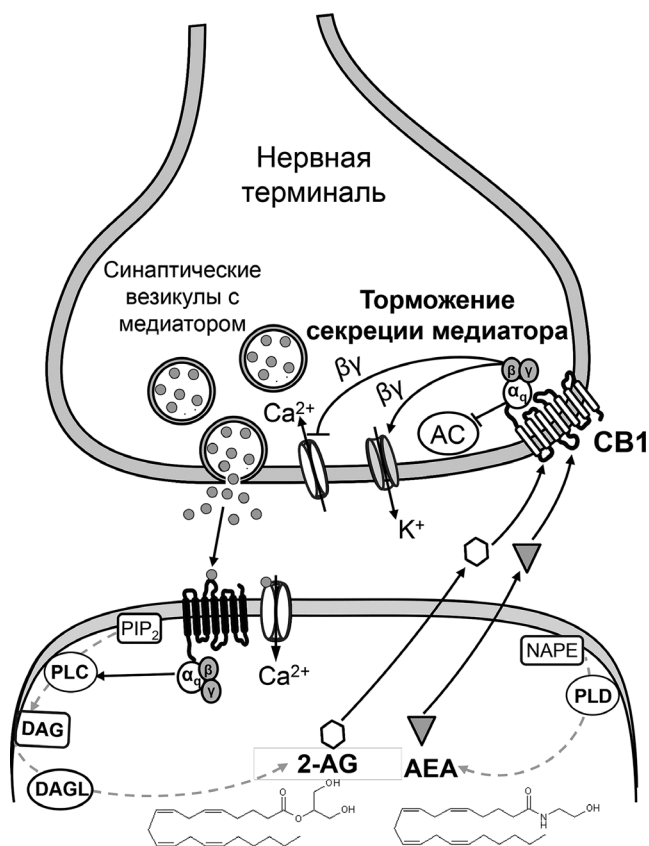


Рис. 1. Схема канонического тормозного действия эндоканнабиноидов в синапсах ЦНС. Обозначены пути синтеза 2-AG и AEA в постсинаптических структурах, высвобождение эндоканнабиноидов и действие на пресинаптические рецепторы CB1, запускающее сигнальные каскады, тормозящие секрецию медиаторов посредством модуляции пресинаптических потенциал-зависимых Ca $^{2+}$ - и K $^+$ -каналов и уменьшения активности AC. Условные обозначения: \leftarrow – активирующее влияние; \perp – тормозное влияние; α , β , γ – субъединицы G-белка; PIP $_2$ – фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат

тамата, дофамина, гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), ацетилхолина (АХ) – при активации пресинаптических СВ-рецепторов в разных синапсах.

ТОРМОЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭНДОКАННАБИНОИДОВ В СИНАПСАХ ЦНС

Краеугольным камнем эффектов эндоканнабиноидов в ЦНС до сих пор считается способность 2-AG ингибировать ГАМКергическое торможение синаптической передачи в гиппокампе и мозжечке. Этот эффект получил название «индуцированное деполяризацией подавление торможения» (DSI). Было показано, что деполяризация постсинаптических нейронов в ЦНС под действием медиатора вызывает выделение эндоканнабиноидов и опосредованное ими кратковременное ингибирование секреции ГАМК из тормозных пресинаптических бутонов в гиппокампе и мозжечке [6, 8]. Впоследствии в возбуждающих синапсах также было выявлено ретроградное торможение выброса возбуждающего медиатора глутамата, опосредуемое эндоканнабиноидами, и это явление получило название «индуцированное деполяризацией подавление возбуждения» (DSE) [13]. Таким образом, эндоканнабиноиды в ЦНС опосредуют ретроградное торможение секреции медиаторов независимо от того, тормозный это синапс или возбуждающий.

Синаптические эффекты эндоканнабиноидов в ЦНС традиционно связывают с их синтезом строго «по требованию» – в ответ на срабатывание синаптической передачи и постсинаптическое действие медиатора. Оно может приводить, во-первых, к деполяризации постсинаптической мембраны, повышению внутриклеточного Ca^{2+} и стимулированию ферментов, синтезирующих эндоканнабиноиды, что приводит в конечном итоге к развитию DSI или DSE. Во-вторых, при активации постсинаптических рецепторов, сцепленных с $G_{q/11}$ -белками (метаботропных глутаматных рецепторов группы I или мускариновых ацетилхолиновых рецепторов) с последующей активацией фосфолипазы $C\beta$ происходит синтез диацилглицерола (DAG). DAG затем деацилируется DAGL с образованием 2-AG, который диффундирует к пресинаптическим СВ-рецепторам и тормозит синаптическую передачу. Образование анандамида также может стимулироваться за счёт активности метаботропных глутаматных рецепторов [14, 15]. Такой механизм опосредованной эндоканнабиноидами кратковременной синап-

тической пластичности получил название «метаботропно-индуцированное подавление торможения/возбуждения» – MSI/MSE [16–19]. Оба типа индукции синтеза эндоканнабиноидов – и деполяризационно-кальциевый, и кальций-независимый метаботропный – часто сосуществуют в синапсах и обеспечивают выраженность ретроградного тормозного действия эндоканнабиноидов [20–24].

Продолжительность опосредованного эндоканнабиноидами ретроградного торможения выброса медиатора, т.е. депрессии синаптической передачи, может быть краткосрочной (STD) и проявляться в диапазоне нескольких десятков секунд или же быть долговременной (LTD) и длиться в течение десятков минут и даже часов. Во втором случае предполагается, что для индукции LTD необходима продолжительная (до нескольких минут) активация СВ-рецепторов эндоканнабиноидами, сопровождающаяся запуском долговременных механизмов торможения секреции медиатора в синапсах [6, 25, 26].

Среди классических эффектов эндоканнабиноидов в ЦНС – участие в регуляции памяти, обучения, болевой и другой сенсорной чувствительности, нейромоторного контроля, пищевого поведения и ряд других [27].

Общепринятым является представление о специфической тормозной активности эндоканнабиноидов, как уникальной системе отрицательной обратной связи в синапсах ЦНС. Принято считать, что такой контур отрицательной обратной связи динамически модулирует надёжность синапса, позволяя постсинаптическим нейронам тонко настраивать чувствительность их синаптических входов в зависимости от интенсивности поступающего паттерна афферентной стимуляции [6, 28]. Учитывая критический вклад эндоканнабиноидной системы в многочисленные психические и нейропатологические процессы [2, 29], эту систему принято также характеризовать как регулятор гомеостаза организма [3, 27].

НЕКАНОНИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭНДОКАННАБИНОИДОВ В СИНАПСАХ

Парадигма об уникальном ретроградном тормозном действии эндоканнабиноидов и их СВ-рецепторов в синапсах ЦНС в настоящее время претерпевает постепенную ревизию под натиском данных об атипичных, побочных или неканонических эндоканнабиноидных эффектах. В частности, недавно был введён новый термин эндоканнабиноидом, призванный отразить расширенную систему функционирования кан-

набиноидов в организме человека, которая включает, наряду с собственно каннабиноидами, несколько сигнальных молекул из числа N-ациламинов (N-ацилтаурин, N-ацилсеротонин, N-ацилдофамин и др.), биохимически связанных с эндоканнабиноидами, а также их рецепторы и ферменты метаболизма [29].

В данном обзоре мы ограничимся рассмотрением лишь некоторых из неканонических эффектов, а именно: примерами неканонической тонической активности эндоканнабиноидов в синапсах, наличием функциональной неоднозначности эффектов эндоканнабиноидов и многочисленных агонистов их рецепторов и, наконец, способности эндоканнабиноидов не тормозить, а облегчать синаптическую передачу, стимулируя выброс медиаторов в центральных и периферических синапсах. Более полное рассмотрение растущего спектра разнообразия неканонических проявлений активности эндоканнабиноидов и их рецепторов можно найти в ряде подробных обзоров последнего времени [3, 13, 27].

ТОНИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭНДОКАННАБИНОИДОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ СВ1 И СВ2 В СИНАПСАХ ЦНС

Согласно классической парадигме, специфический принцип действия эндоканнабиноидов в синапсах — срабатывание «по требованию», только в ответ на импульсную синаптическую активность, сопровождающуюся либо деполяризацией постсинаптической мембраны с последующим входом ионов Ca^{2+} , либо активацией медиаторами определённых метаболитных рецепторов, сцепленных с $G_{q/11}$ -белками, либо комбинацией этих двух механизмов. Во всех случаях это приводит к быстрому синтезу и высвобождению эндоканнабиноидов с последующей активацией пресинаптических СВ-рецепторов, опосредующих торможение секреции медиаторов [7, 30]. Учитывая импульсный фазный характер сигналов в синапсах, были приложены усилия для доказательства фазного характера генерации эндоканнабиноидных сигналов. Было показано, что не только выброс, но и предшествующий ему синтез эндоканнабиноидов может происходить фазно. Типичный пример приведён в работе, проводившейся на срезах гиппокампа [31], где в ответ на импульсную активность нейронов и действие глутамата быстро (фазно) возрастал синтез 2-AG с участием активизирующегося в ответ на постсинаптический вход ионов Ca^{2+} DAGL α . Причём быстрая (в течение минут) преапликация ингибито-

ра DAGL α OMDM-188 предотвращала развитие DSI — чувствительного к деполяризации ингибирования выброса медиатора, обусловленного 2-AG. Эти и подобные опыты доказывают факт ответного (по требованию) синтеза эндоканнабиноидов с помощью быстро активизирующихся ферментов, последующего высвобождения эндоканнабиноидов и их быстрого пресинаптического действия.

В литературе на протяжении последних 20 лет накоплены данные о наличии в ЦНС тонической или конститутивной активности эндоканнабиноидов и их рецепторов СВ1 и СВ2, существующей при отсутствии импульсной активности нейронов [32–34]. Одним из первых доказательств стала обнаруженная у антагонистов СВ-рецепторов способность при их аппликации в покое на сенсорные нервные окончания или синапсы в ЦНС приводить к возрастанию спайковой активности или учащению спонтанной секреции медиатора соответственно. Таким образом, действие антагонистов СВ-рецепторов в покое сопровождалось облегчением выброса медиаторов/комедиаторов в синапсах ЦНС или в нервных окончаниях первичных афферентов. Это наблюдали под действием высокоизбирательного антагониста СВ1 (SR141716A) или антагониста СВ2 (SR144528) [32]. Способность антагонистов СВ, считавшихся высокоизбирательными и нейтральными, инициировать спонтанную либо вызванную секреторную активность синапсов, причём в покое, привело к необходимости постулировать наличие особой формы тонической активности у самих рецепторов СВ1 и СВ2 при отсутствии активности синапсов и влияний на них эндоканнабиноидов. При этом для многих антагонистов СВ-рецепторов пришлось также признать их способность при связывании с тонически активными СВ-рецепторами выступать в роли обратных агонистов, так как они в этом случае оказывают самостоятельное и противоположное ингибирующему (обратное) облегчающее действие на секрецию медиаторов в синапсах. Действительно, получены доказательства того, что тоническая активность СВ1 и СВ2 может быть следствием особой конститутивно активной конформации рецептора, которая сама спонтанно сигнализирует (поддерживает тормозный сигнальный путь) даже при отсутствии лиганда [35–37]. В таких случаях действие на них лигандов, функционирующих как обратные агонисты/антагонисты, будет ослаблять эту тоническую тормозную активность и вызывать либо ослабление торможения синаптической передачи, либо активацию синапсов [36]. На срезах гиппокампа показано, что определенная доля СВ1 может принимать

конститутивно активную конформацию при отсутствии эндоканнабиноидов и тем самым постоянно притормаживать близкорасположенные потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы и секрецию ГАМК [34]. При этом действие на такие рецепторы обратного агониста/антагониста AM 251 приводит к ослаблению торможения выброса ГАМК. Важно отметить, что конститутивная активность (при отсутствии импульсной активности нейронов) уже выявлена в ЦНС у обоих типов СВ-рецепторов благодаря широкому тестированию и обнаружению эффектов, вызываемых антагонистами СВ-рецепторов, работающими в таком случае как обратные агонисты.

Однако в литературе широко обсуждается и другой альтернативный вариант, когда тоническая активность эндоканнабиноидов является следствием базальной активности ферментов их синтеза, резервного накопления эндоканнабиноидов в постсинаптических структурах, мобилизации и тонической утечки эндоканнабиноидов с последующей тонической активацией СВ1 или СВ2 [38, 39]. В этом случае канонические СВ-рецепторы оказываются в состоянии непрерывной доступности для эндоканнабиноидов, т.е. в состоянии подпороговой тонической активации.

Наиболее известным примером тонической генерации 2-AG в ЦНС остаётся выявленное на срезах гиппокампа тоническое притормаживание активности ГАМКергических интернейронов [34]. Показано также, что стимулирование ферментов деградации 2-AG и АЕА (моноацилглицерол-липазы и гидролазы амидов жирных кислот соответственно) приводит к ослаблению тонического тормозного действия эндоканнабиноидов на ГАМКергическую систему, что подтверждает факт тонической активности этих ферментов, служащей для контроля базальной выработки эндоканнабиноидов в определенных зонах мозга [40].

Для выбора между двумя версиями тонической активности — со стороны тонически высвобождаемых эндоканнабиноидов или конститутивной (независимой от действия эндоканнабиноидов) тонической активности пресинаптических СВ1 — предпринимается использование животных с нокаутированными генами липаз, лимитирующих синтез эндоканнабиноидов, что исключает их тоническую выработку и высвобождение [41], или используется сравнительный анализ эффектов обратных агонистов/антагонистов СВ по сравнению с эффектами нейтральных антагонистов рецепторов (которые уже разработаны и не вызывают эффектов, связанных с обратным агонизмом, например, NESS 0327, O-2654, O-2050) [37, 42, 43]. Еще одним экспериментальным способом является тестирование

утечки эндоканнабиноидов из проб тканей мозга, где также был установлен высокий уровень базальной активности эндоканнабиноидов и возможности их конститутивного синтеза и тонического выделения [44]. Наконец, на экспериментальных моделях нейропатологий у животных возможность тонической утечки эндоканнабиноидов также уже подтверждена. Показано, что развитие целого ряда патологий мозга (аутизм, болезнь Хантингтона и др.) может быть связано с долговременными нарушениями именно тонического эндоканнабиноидного контроля над высвобождением в мозге ГАМК [45–47]. В частности, именно повышенный тонический ретроградный сигналинг эндоканнабиноидов, обнаруживаемый при болезни Хантингтона в стриатуме и тормозящий там секрецию ГАМК, является, по мнению авторов, патофизиологическим признаком развившегося заболевания [46]. В другом случае также утверждается, что именно тонический сигналинг эндоканнабиноидов может быть компонентом патогенеза аутизма [47]. Причём для его реализации в синапсах корзинчатых клеток гиппокампа необходимо обязательное участие нейролигина-3 — постсинаптического белка клеточной адгезии. В чём именно заключается его роль в тонической эндоканнабиноидной секреции, пока неясно. Предполагается, что нейролигин-3 может участвовать в реализации тонической ретроградной секреторной машинерии, действующей в синапсах в разных отделах мозга посредством трансинаптического взаимодействия нейролигина с пресинаптическими нейрексинами [48–50]. Возможно, что в синапсах больных аутизмом нейрексин, находясь в трансинаптической сцепке в нейролигинами, способен каким-то образом регулировать тонический синтез 2-AG в постсинаптической клетке и способствовать его утечке [51].

Таким образом, наличие обеих форм срабатывания эндоканнабиноидов — по требованию или в виде базальной тонической утечки — можно считать доказанными и равноправными способами высвобождения и действия эндоканнабиноидов в ЦНС (рис. 2).

Относительный вклад и реальная физиологическая значимость тонической утечки эндоканнабиноидов в разных отделах мозга остаются пока мало изученными. В недавнем обзоре отмечается, что, например, в гиппокампе АЕА является проводником тонической активности, тогда как 2-AG обеспечивает чисто фазные эффекты эндоканнабиноидов [13]. Однако в других отделах ЦНС это соотношение, очевидно, может быть иным. При нейропатологиях именно нарушение тонической утечки каннабиноидов

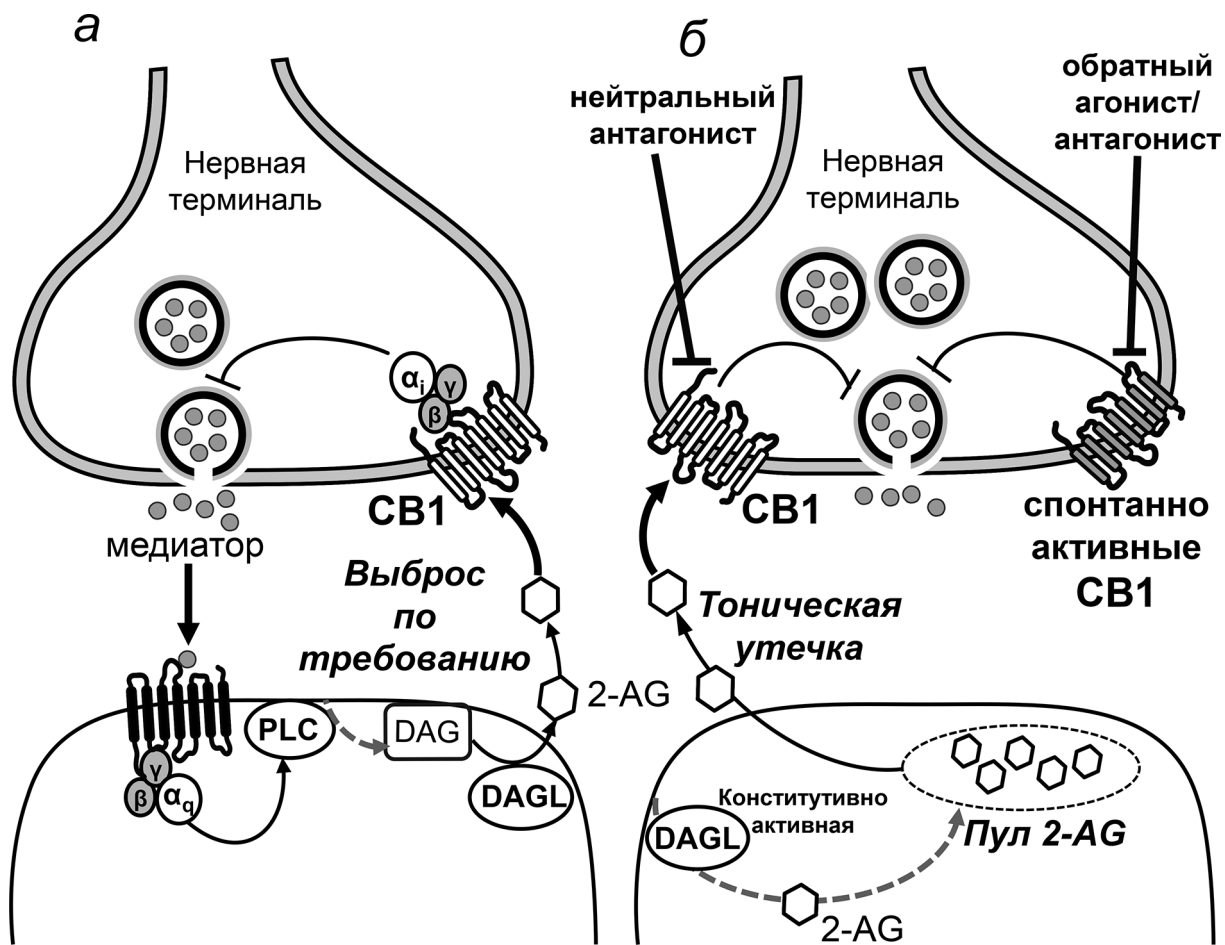


Рис. 2. Варианты активности эндоканнабиноидов: каноническая активность — в результате синтеза и действия эндоканнабиноидов строго по требованию, возникающая в ответ на постсинаптическое действие медиатора (а); неканоническая активность, подразумевающая утечку эндоканнабиноидов из предсуществующего пула и тоническую активацию CB-рецепторов, или наличие спонтанной постоянной активности CB-рецепторов при отсутствии их активации эндоканнабиноидом (б). Условные обозначения: ← — активирующее влияние, ⊥ — тормозное влияние, α, β, γ — субъединицы G-белка

дов может регулировать экспрессию СВ на пре-синаптических мембранах и, таким образом, влиять на фазные эффекты эндоканнабиноидов. Кроме того, высказывается мнение, что в случае уже описанной базальной утечки эндоканнабиноидов и тонической тормозной активности их рецепторов в области первичных болевых афферентов это может служить механизмом тонического контроля порога болевой чувствительности на периферии [32].

НЕКАНОНИЧЕСКОЕ СОПРЯЖЕНИЕ СВ-РЕЦЕПТОРОВ С G-БЕЛКАМИ, β-АРРЕСТИНАМИ И ГЕТЕРОРЕЦЕПТОРАМИ

В настоящее время возможность противоположно направленных и количественно широко

варьирующих влияний на секрецию медиатора при действии медиаторов/комедиаторов и других биологически активных молекул (гормонов, нейротрофинов и т.п.) считается их специфическим и характерным свойством. Эндоканнабиноиды, считавшиеся особой тормозной сигнальной системой, как оказалось, не являются исключением.

Взаимодействие СВ-рецепторов с разными типами G-белков. В литературе давно накапливаются сведения о том, что в некоторых синапсах ЦНС, обработанных коклюшным токсином (выключающим активность сцепленных с СВ1 канонических G_i -белков), стимуляция СВ1 может приводить к повышению уровня cAMP, что является (хотя и непрямым) доказательством возможной сцепки и активации эндоканнабиноидами G_s -белков и развития неканонических эффектов [52–55].

При исследовании широкого спектра эндогенных и экзогенных агонистов СВ-рецепторов на интактных животных и экспериментальных моделях нейропатологий установлено, что существует значительная функциональная селективность их действия, получившая название двойственного или смещённого агонизма [9, 56].

Смещённый агонизм был выявлен впервые у катехоламиновых G-белок-сцепленных рецепторов, но сейчас описан едва ли не у всех химических активных сигнальных систем, включая медиаторы и гормоны [57]. Эндоканнабиноиды, как оказалось, не являются исключением. В частности, выявлены определённые агонисты СВ1, эффекты которых свидетельствуют о возможной сцепке СВ1 не с G_i -белками (или не только с ними), но и с другими типами G-белков [58]. Широко применяемый в экспериментах синтетический агонист СВ-рецепторов WIN 55,212-2 (WIN) в случае его действия на СВ1 приводил к активации не $G_{i/0}$ -белка, а G_z -, $G_{q/11}$ - и $G_{12/13}$ -белков, что сопровождалось активацией изоформ фосфолипазы C (PLC) в кортикальных синапсах [59]. Аналогичный эффект описан недавно у WIN при его действии на моторные синапсы мыши, причём в таком случае это сопровождалось учащением спонтанной секреции медиатора [60]. Наконец, в недавней подробной работе, где тестировали 6 разных каннабиноидов – два эндогенных (2-AG и AEA) и 4 синтетических, включая WIN и CP55,940 – на культуре клеток, воспроизводивших активность нейронов стриатума и несущих на себе СВ-рецепторы, было показано, что разные агонисты, действуя на один и тот же СВ1, могут запускать в клетках разные каскады, активируя разные G-белки, включая G_s -белок [61]. Все это вынуждает постулировать функциональную неоднозначность как агонистов, так и самих СВ-рецепторов с точки зрения функциональных последствий их активации для нейрона. Это функциональное разнообразие эффектов, обозначаемое в литературе как смещённый агонизм, объясняется существованием разных конформационных состояний данного рецепторного белка, имеющего потенциальное сродство к разным G-белкам. Это, в свою очередь, означает, что в зависимости от химической природы действующего на СВ-рецептор агониста происходит стабилизация молекулы рецептора в определенном конформационном состоянии, имеющем сродство к пулу G-белков определенного субъединичного состава. Взаимодействие с определенным типом G-белков будет приводить к запуску последующего каскада, но не обязательно тормозящего секрецию медиатора. Сегодня считается, что срабатывание того или иного

G-белка и запуск определенного сигнального пути зависит, в первую очередь, от типа агониста, вызывающего стабилизацию рецептора в соответствующей конформации, и его последующее сопряжение с определенным типом G-белков [62–64] (рис. 3, а). Возможно, в такое комплексное проявление смещённого агонизма вносят вклад регуляторы G-белковой сигнализации (RGS) [65, 66].

В настоящее время лиганды, связывающиеся с СВ-рецепторами, принято подразделять на четыре химически разных класса. Это 1) эйкозаноиды (куда входят 2-AG и AEA), 2) выделенный из конопли рода *Sativa* классический фитоканнабиноид дельта-9-тетрагидроканнабинол (THC) и его производные, 3) неклассический синтетический агонист CP55,940 и 4) аминокилиндола WIN. В связи с обнаружившейся у лигандов СВ-рецепторов способности проявлять смещённый (функционально многозначный) агонизм в литературе высказывается мнение о возможности и необходимости поиска избирательно действующих лигандов (агонистов СВ-рецепторов) из числа уже известных синтетических каннабиноидов. Необходимо, чтобы такие лиганды вызывали бы только один, определенный желаемый эффект при связывании с СВ-рецепторами в ЦНС для их использования в определенных целях в клинике [67–70]. Продолжается активная разработка новых синтетических агонистов СВ-рецепторов. Недавно показано, что в присутствии коклюшного токсина, блокирующего сцепку $G_{i/0}$ -белков с рецепторами в клетках, высокие концентрации синтетических каннабиноидов WIN, CP55,940, JWH-018 и AV FUBINACA увеличивают концентрацию cAMP выше уровня, продуцируемого активатором AC форсколином [71, 72]. При этом THC, связываясь и действуя на те же СВ1 в аналогичных концентрациях, не вызывал подъёма уровня cAMP. Таким образом, представление о смещённом агонизме и разнообразии лигандов, способных, несмотря на связывание с одним и тем же типом СВ-рецепторов, индуцировать разнообразные сигнальные пути в клетках, включая активацию G_s -белков, получают все новые свидетельства.

Взаимодействие СВ-рецепторов с β -аррестинами. Анализ неоднозначных функциональных последствий при действии различных лигандов на СВ-рецепторы в ЦНС привёл к ещё одному неожиданному заключению, что СВ-рецепторы могут при их активации определёнными лигандами взаимодействовать не только с разными G-белками, но и с β -аррестинами. β -Аррестины – небольшое семейство цитоплазматических белков с молекулярной массой поряд-

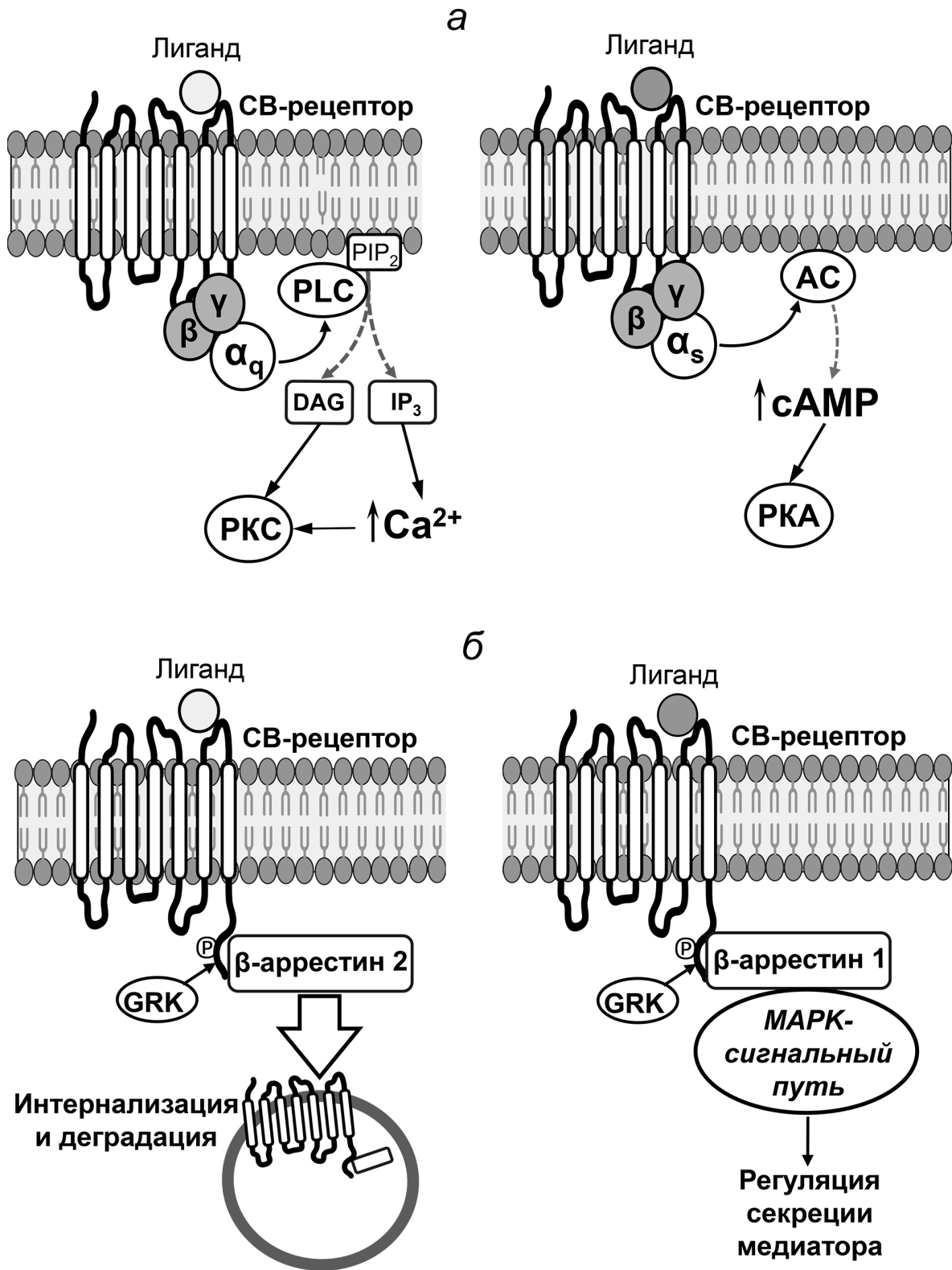


Рис. 3. Примеры возможных неканонических взаимодействий СВ-рецепторов: с G_q - или G_s -белками и запуском внутриклеточных каскадов, сопровождающихся атипичными ответами клеток на действие эндоканнабиноидов (а); с β -аррестинами 1 и 2 (б). Справа показана возможность взаимодействия СВ-рецепторов с β -аррестином 1, что приводит к запуску неканонических сигнальных каскадов. Условные обозначения: \leftarrow — активирующее влияние; \perp — тормозное влияние; α , β , γ — субъединицы G-белка; PIP_2 — фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат; IP_3 — инозитол-1,4,5-трисфосфат; GRK — киназа рецепторов, связанных с G-белками; P — фосфат

ка 50 кДа, способных связываться с цитоплазматическими участками G-белок-сцепленных рецепторов, что, во-первых, терминирует активацию G-белков за счёт инактивации рецептора, а во-вторых, может приводить к его дальнейшей интернализации. Как известно, в случае активации СВ-рецепторов агонистами происходит их последующее фосфорилирование киназами рецепторов, связанных с G-белками, что позволяет β -аррестинам — β -аррестину 1 и β -аррестину 2 — транслоцироваться к мембране и связываться с СВ-рецепторами на их цитоплазматических участках. В настоящее время известно, что оба типа β -аррестинов могут связываться с СВ1 и СВ2. При этом, видимо, связь с β -аррестином 2 приводит к десенситизации G-белок-сцепленных СВ-рецепторов и, возможно, их интернализации, т.е. удалению с поверхности мембраны, как это действительно показано в ряде случаев взаимодействия активированных СВ1 с β -аррестином [73] (рис. 3, б). Однако становится очевидно, что участие β -аррестинов в десенситизации и интернализации СВ — лишь одна из их функций в клетках [12, 70]. Обнаружилась способность β -аррестина 1 связываться с СВ1, опосредовать их дальнейшую активность, выступая в роли отдельного преобразователя сигнала, независимого от G-белков. В нейронах и нервных терминалях синапсов ЦНС β -аррестин 1 играет роль одного из каркасных белков, участвующих в создании мультибелковых примембранных комплексов, запускающих последующий сигналинг. Соответственно, прямое взаимодействие β -аррестина 1 с молекулой СВ1 может запускать сигнальный путь, связанный с активацией МАРК, и, в частности киназы, регулируемой экстраклеточным сигналом (Erk1/2), p38 и других [74–77] (рис. 3, б).

Более того, отмечается, что каннабиноидные лиганды, рекрутирующие присоединение β -аррестина 1 к СВ1, вызывают повышение активности G_s -белок-опосредованного сигнального каскада (на фоне коклюшного токсина) и возрастание уровня сАМР, действуя в концентрациях меньших на несколько порядков, чем когда эти же лиганды при связывании с СВ1 запускают активность G_i -белков [63]. Поэтому при рассмотрении последствий взаимодействия СВ-рецепторов с определенными лигандами в ЦНС необходимо учитывать ещё одно проявление смещённого агонизма — запуск независимых от активности G-белков сигнальных путей с участием β -аррестина 1 и последующей активацией МАРК (Erk1/2, p38) или системы АС/сАМР, приводящих к вариабельным функциональным последствиям [63, 73, 77]. Это, бесспорно, важ-

ное, но пока малоразработанное направление исследований неканонической активности эндоканнабиноидной системы тормозится отсутствием избирательных блокаторов связывания β -аррестинов 1 с СВ1, хотя в качестве претендента на эту роль уже обсуждается пептидный фрагмент одной из петель β -аррестина 1, у которого показано специфическое связывание с цитоплазматическим спиральным мотивом на С-конце белковой цепи молекулы СВ1 и способность разобщать связывание β -аррестина 1 с СВ1 [73].

Гетерорецепторные взаимодействия СВ-рецепторов. В добавление к набирающим популярность представлениям о присущем эндоканнабиноидным рецепторам и их агонистам многозначном смещённом агонизме, в последние годы стало очевидным ещё одно ярко выраженное у СВ-рецепторов свойство. Это тенденция к образованию гетерорецепторных комплексов с другими мембранными рецепторами, которые или также сцеплены с определёнными G-белками (опиоидные, аденозиновые, дофаминовые, серотониновые, рецепторы ангиотензина II и др.), или обладают киназной активностью (Trk-рецепторы нейротрофинов, рецепторы эпидермального фактора роста и др.) [3, 9].

Данные о коэкспрессии и взаимодействии СВ1 и других G-белок-сцепленных рецепторов на мембранах нейронов и терминалей синапсов демонстрируют неоднозначные функциональные последствия. В частности, при коэкспрессии СВ1 с μ -опиоидными рецепторами избирательная активация одного типа рецептора подавляла проявление избирательных эффектов активации другого [78]. В синапсах гиппокампа описано гетерорецепторное реципрокное взаимодействие между ГАМК_B-рецепторами и СВ1, когда уменьшение секреции медиатора при стимуляции одного рецептора подавлялось при подключении другого [79]. В дофаминергических терминалях выявили экспрессию СВ1 и дофаминовых D2-ауторецепторов. При этом раздельная избирательная активация СВ1 вызывала подавление выброса [³H]-дофамина, благодаря активации G_i -белка и угнетению активности АС. Однако при совместной активации с D2-ауторецепторами продемонстрировали сдвиг от активации G_i -белка и торможения выброса дофамина к доминированию активности G_s -белок-опосредованной сигнализации: подъём активности АС, возрастание уровня сАМР и увеличение активности РКА и усиление выброса секреции [³H]-дофамина на срезах мозга [55]. Обсуждается возможное участие RGS в реализации таких эффектов [66]. Говоря о гетерорецепторных взаимодействиях,

необходимо отметить, что растёт число примеров и трансактивации эндоканнабиноидов и СВ-рецепторов, когда в случае активации избирательными агонистами определённых постсинаптических рецепторных белков происходят изменения G_q -белок-опосредуемых сигнальных каскадов в постсинаптических структурах, увеличение постсинаптической концентрации ионов Ca^{2+} и параллельное повышение там синтеза эндоканнабиноидов и активности СВ-рецепторов [80]. Например, известна способность нейротрофического фактора мозга при действии на постсинаптические TrkB-рецепторы индуцировать высвобождение эндоканнабиноидов и их пресинаптическое действие [81]. В связи с этим фармакологический анализ неканонических эффектов агонистов СВ-рецепторов в синапсах ЦНС осложняется ещё и возможностью их не прямой активации и возможным параллельным соучастием других сигнализаторов в реализации наблюдаемых эффектов эндоканнабиноидов [12].

В случае взаимодействия между СВ1 и СВ2 в составе гетеродимерных комплексов обнаруживаются реципрокные антагонистические влияния СВ-рецепторов друг на друга. При тестировании связывания одного типа рецепторов со своим агонистом в составе комплекса СВ1–СВ2 наблюдалось сниженное связывание агониста за счёт влияний со стороны рецептора другого типа. Аналогично тормозилось связывание и второго рецептора с его агонистом. Такой двусторонний перекрестный антагонизм (взаимное подавление) активности в гетерорецепторных комплексах СВ1–СВ2 отражает существование дополнительного паттерна молекулярных взаимодействий СВ-рецепторов и возможности регуляции их активности [82, 83].

Внутриклеточные СВ-рецепторы и СВ-рецепторы астроцитов. К числу неканонических влияний каннабиноидов, бесспорно, относится и их возможность взаимодействовать и с внутриклеточными СВ1-рецепторами, выявленными на мембранах митохондрий [84–86], эндосом и лизосом нейронов [87]. В митохондриях СВ1-рецепторы сцеплены с G_i -белком, но поскольку этот каскад запускается не в цитоплазме, а в матриксе митохондрий, то он влияет на секрецию медиаторов опосредованно, через снижение продукции АТФ. В этом случае активация митохондриальных СВ1-рецепторов может проявляться в развитии краткосрочной депрессии передачи в гиппокампе, а при более длительной активности синапсов – в нарушении процессов формирования памяти [88, 89]. В эндосомах и лизосомах нейронов коры и гиппокампа удалось пока выявить только СВ2-рецепторы. При

их активации происходит опосредуемое IP_3 -рецепторами увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция, что свидетельствует об их неканоническом сопряжении с G_q -белками [90, 91]. Увеличение концентрации кальция в цитоплазме, в свою очередь, вызывает открытие Ca^{2+} -активируемых хлорных каналов, что снижает возбудимость нейронов [92]. Таким образом, уже известна возможность атипичной внутриклеточной локализации СВ-рецепторов, и их неканоническая активность специфически влияет на синаптическую передачу и нейрональную активность в ЦНС.

Наконец, следует упомянуть и о возможных последствиях активации астроцитарных СВ1-рецепторов, выявленных как на наружной [93, 94], так и на митохондриальной мембранах этих клеток [95–97]. Если в нервных терминалях активация СВ1 запускает G_i -белок-опосредованные сигнальные каскады, тормозящие секрецию медиатора, то активация выделяющимися нейрональными эндоканнабиноидами астроцитарных СВ1 повышает концентрацию ионов Ca^{2+} в цитоплазме астроцитов, что обеспечивает секрецию глутамата (глутамата, D-серина, аденозина), включая и эндоканнабиноиды [98, 99]. Предполагается, что, в отличие от относительно локализованного ретроградного действия эндоканнабиноидов в синапсах, пространственно-временной характер СВ1-индуцируемых кальциевых сигналов в астроцитах с последующим выбросом глутамата способен вызвать модулирование синаптической передачи в большом количестве синапсов, расположенных далеко от места изначального выделения эндоканнабиноидов [100]. Кроме того, под действием эндоканнабиноидов астроциты, в зависимости от выделяемых ими глутамата и их рецепторов на пре- и/или постсинаптической мембранах, могут опосредованно вовлекаться в реализацию различных форм синаптической пластичности, причём как тормозящих, так и усиливающих секрецию медиаторов [99–103].

ОБЛЕГЧАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЭНДОКАННАБИНОИДНОЙ СИСТЕМЫ НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЕРЕДАЧУ В ЦЕНТРАЛЬНЫХ И ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ СИНАПСАХ

Центральные синапсы. Факты облегчающего, а не тормозного действия эндоканнабиноидов и их рецепторов на секрецию медиаторов в синапсах ЦНС известны давно. Однако они остаются малочисленными и, как правило, предполагают

дополнительные условия для своего проявления [104]. Такими условиями, в частности, считаются случаи гетерорецепторного взаимодействия СВ-рецепторов с дофаминовыми D2-рецепторами в синапсах стриатума, когда, наряду с хорошо известным эффектом активации G_i -белка в терминалях при действии экзогенных агонистов СВ-рецепторов и торможением секреции дофамина, совместная аппликация агонистов СВ-рецепторов и D2-рецепторов сопровождается сдвигом механизма внутриклеточной сигнализации (вызываемой агонистами СВ-рецепторов) от активации G_i -белков в сторону активации G_s -белков, повышения уровня активности АС-каскада и усиления выброса дофамина [105, 106]. Также в литературе часто встречается утверждение, что случаи участия эндоканнабиноидов в долговременной потенциации передачи (LTP) в гиппокампе или стриатуме есть не что иное, как растормаживание и облегчение передачи глутаматергических синапсов. Оно происходит вследствие подавления эндоканнабиноидами тормозного действия ГАМК на выброс глутамата при гетеросинаптических взаимодействиях, т.е. является результатом проявления DSI [107].

Однако имеются свидетельства настоящих облегчающих эффектов эндоканнабиноидов в синапсах ЦНС, когда эндоканнабиноиды, ретроградно действуя в синапсах, работающих в гомосинаптическом режиме, непосредственно облегчают в них выброс медиатора. Так, при анализе активности глутаматергических кортикостриарных синапсов на срезах мозга мышей применяли сдвоенную стимуляцию пост- и пресинаптических структур синапсов с регистрацией возбуждающих постсинаптических потенциалов. Варьирование числа, частоты и продолжительности сдвоенных стимулов позволило выявить условия развития синаптической пластичности в зависимости от временного интервала между пре- и постсинаптическими импульсами, когда синапсы работали в режиме или LTD, или LTP. Оказалось, что проявление разных типов синаптической пластичности зависело от уровня и паттерна синтезируемых и действующих в синапсах эндоканнабиноидов. Авторы показали, что при формировании кратковременных, но высококонцентрированных транзистентов эндоканнабиноидов, создаваемых в синапсах определёнными режимами стимуляции, наблюдается LTP. Тогда как при продолжительных, но умеренных уровнях повышения концентрации эндоканнабиноидов в синапсах наблюдается развитие LTD. Обнаруженная LTP действительно была обусловлена именно секрецией эндоканнабиноидов, поскольку индук-

ция LTP предотвращалась блокированием СВ1 и не наблюдалась у мышей с нокаутом генов СВ-рецепторов [108]. Было также показано, что случаи разнонаправленного действия эндоканнабиноидов (поддержка депрессии или потенциации передачи) могут быть связаны с балансом активности пресинаптических РКА и кальцийнейрина, регулируемых пресинаптическим действием соответствующих концентраций эндоканнабиноидов в терминалях, а также могут зависеть от паттерна активности DAGL α в постсинаптических структурах [108, 109].

Способность эндогенных каннабиноидов вызывать LTP описана и в синапсах гиппокампа [110]. На срезах гиппокампа использовали режимы высокочастотной стимуляции, приводящие к слабо- или сильно выраженной LTP. Оказалось, что выброс эндоканнабиноидов, происходящий в этих условиях в синапсах, может увеличивать сильную LTP и тормозить индукцию слабо выраженной LTP. По мнению авторов, выброс эндоканнабиноидов и их действие играет роль высокочастотных фильтров, контролирующих в сильно шумящих нейронных сетях ЦНС соотношение полезный сигнал/шум при интенсивной работе синапсов [111].

Таким образом, исследования последних лет показывают, что неканонические облегчающие эффекты эндоканнабиноидов в ЦНС, по-видимому, действительно проявляются и могут быть обнаружены экспериментально. Однако это требует использования определенных временных и частотных параметров активности синапсов, близких к нормальным физиологическим, обеспечивающих соответствующие паттерны синтеза и концентрационных профилей эндоканнабиноидов в синапсах [108,111]. В любом случае представление о присутствии неканонической активности эндоканнабиноидов, облегчающей синаптическую передачу и секрецию медиаторов в синапсах ЦНС, обретает в последнее время все больше доказательств и сторонников [13, 107, 108, 111].

Периферические синапсы. К числу периферических органов, обладающих эндоканнабиноидной системой, относится, среди прочих, и скелетная мускулатура. В скелетных мышцах описана экспрессия не только СВ1 и СВ2, но и ферментов, ответственных за синтез и деградацию эндоканнабиноидов [112–114]. Показано, что выброс из сокращающейся мышцы эндоканнабиноидов может приводить к присущим им локальным эффектам с участием СВ-рецепторов как на уровне самих мышечных волокон [115–117], так, возможно, и моторных синапсов [118, 119].

Первые попытки выявить роль эндоканнабиноидов в нервно-мышечных синапсах разных позвоночных датируются концом XX и началом XXI столетия [120–122]. Было выявлено традиционное, преимущественно тормозное действие этих сигнальных молекул на секрецию АХ в моторных синапсах холоднокровных [123, 124]. Однако уже в самой ранней работе отмечалось увеличение амплитуды спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и их частоты без изменения вызванного выброса АХ при аппликации ТНС [120].

В последние годы добавились новые свидетельства неканонической активности каннабиноидов, облегчающей секрецию АХ в моторных синапсах. Так, при тестировании эффектов WIN на моторных синапсах диафрагмы мыши был обнаружен значительный (на 50% и более) прирост частоты МПКП [60]. Эффект был связан с активацией СВ1 и запуском пресинаптического сигнального каскада с участием PLC, протеинкиназы С и депонированного Ca^{2+} из рианодинчувствительных Ca^{2+} -депо. Облегчающие спонтанную секрецию эффекты WIN в моторных синапсах выглядят неожиданными, учитывая, что в синапсах ЦНС торможение экзогенными кан-

набиноидами вызванной активности обычно сопровождается также подавлением и их спонтанной активности [125, 126]. На том же классическом экспериментальном объекте – моторных синапсах диафрагмы мыши – также удалось обнаружить целый ряд неканонических облегчающих воздействий на параметры спонтанной секреции АХ при тонической аппликации двух эндоканнабиноидов – АЕА и 2-АГ. Выяснилось, что, несмотря на активацию одного и того же типа пресинаптических рецепторов, СВ1, АЕА и 2-АГ вызывали изменения разных параметров МПКП, отражающих спонтанную секрецию АХ: АЕА стимулировал возрастание частоты МПКП на 75%, предотвращаемое блокированием L-типа Ca^{2+} -каналов и ингибированием PKA, но не PLC. 2-АГ же вызывал прирост размера квантов АХ и амплитуды МПКП на 50%, предотвращавшийся везамиколом – ингибитором везикулярного транспортёра АХ [127]. По-видимому, не совпадающие по эффектам специфические рецепторные влияния АЕА и 2-АГ, направленные на разные параметры квантовой секреции АХ, предполагают вовлечение разных сигнальных путей и финальных мишеней этих путей в моторных нервных терминалах (рис. 4).

Такая двойственность эффектов при активации одних и тех же рецепторов при действии разных агонистов может быть проявлением смещённого агонизма при активации СВ1, возможность которого при действии эндоканнабиноидов сейчас активно обсуждается. Что касается увеличения размера квантов АХ при действии 2-АГ, то аналогичный эффект установлен и в работе, где длительная аппликация агонистов СВ1 на моторные синапсы диафрагмы мыши также приводила к значительному приросту амплитуды МПКП, который не наблюдался при предварительном блокировании везикулярного транспорта АХ. Было выявлено увеличение размеров холинергических везикул спустя 2–4 часа после начала нанесения каннабиноидов на мышцу [118]. Потенцирование размера квантов медиаторов на пресинаптическом уровне путём усиления накачки медиаторов в везикулу сегодня хорошо известно как в синапсах ЦНС, так и на периферии [128, 129]. Считается, что это один из специфических пресинаптических механизмов потенциации синаптической передачи, осуществляемый с участием различных нейромодуляторов. Однако участие эндоканнабиноидов в таком механизме облегчения передачи сигнала в синапсах является новым, ранее не известным неканоническим свойством этих сигнализаторов, заслуживающим дальнейшего изучения.

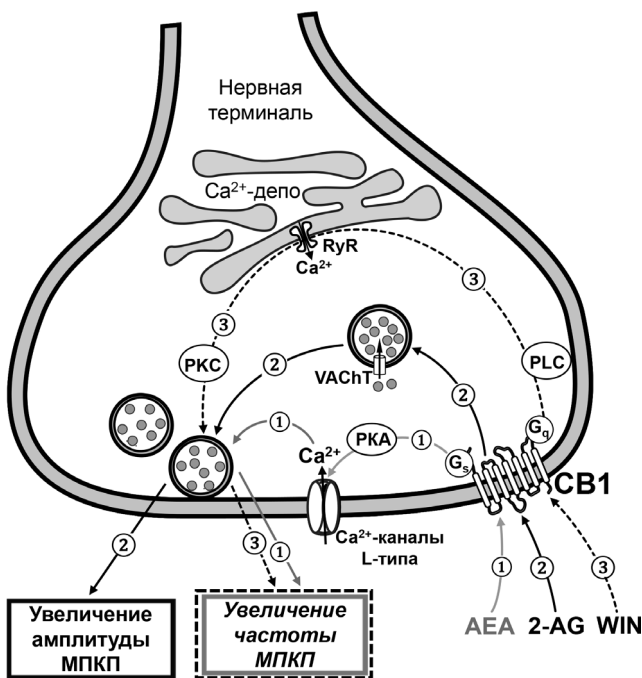


Рис. 4. Схема возможности запуска в моторных синапсах млекопитающих разных сигнальных каскадов при активации СВ1 тремя разными агонистами: АЕА – 1, 2-АГ – 2, и WIN – 3, что приводит к потенциации разных параметров спонтанной секреции квантов АХ. Условные обозначения: ← – активирующее влияние, RyR – рианодиновые рецепторы, VACHT – везикулярный ацетилхолиновый транспортёр

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ данных литературы свидетельствует о наличии большого разнообразия мишеней и сигнальных каскадов, запускаемых эндоканнабиноидами в синапсах ЦНС и на периферии. Характерный для эндоканнабиноидов и их рецепторов смещённый агонизм, а также функциональное и структурное взаимодействие с другими рецепторами значительно расширяет спектр активности эндоканнабиноидов и позволяет охарактеризовать их как плеiotропные сигнальные молекулы, способные оказывать разнообразные тормозные и облегчающие влияния на секрецию медиаторов. Способность к разнонаправленной вариабельной модуляции секреции медиаторов, обнаруживаемая у эндоканнабиноидов, демонстрирует принципиальное сходство этой, на первый взгляд, уникальной молекулярной сигнальной системы с другими системами химической модуляции секреции

в синапсах. Переосмысление потенциальных функциональных возможностей и механизмов действия эндоканнабиноидов с учётом их неканонических свойств позволит более глубоко и разносторонне понять и оценить роль этой сигнальной системы в норме и использовать направленные изменения ее модулирующего потенциала при патологиях нервной и других систем организма.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00616a).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Morales, P., and Reggio, P. H. (2017) An update on Non-CB1, Non-CB2 cannabinoid related G-protein-coupled receptors, *Cannabis Cannabinoid Res.*, **2**, 265-273, doi: 10.1089/can.2017.0036.
- Zou, S., and Kumar, U. (2018) Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 833, doi: 10.3390/ijms19030833.
- Haspula, D., and Clark, M. A. (2020) Cannabinoid receptors: an update on cell signaling, pathophysiological roles and therapeutic opportunities in neurological, cardiovascular, and inflammatory diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7693, doi: 10.3390/ijms21207693.
- Muller, C., Morales, P., and Reggio, P. H. (2019) Cannabinoid ligands targeting TRP channels, *Front. Mol. Neurosci.*, **11**, 487, doi: 10.3389/fnmol.2018.00487.
- Lago-Fernandez, A., Zarzo-Arias, S., Jagerovic, N., and Morales, P. (2021) Relevance of peroxisome proliferator activated receptors in multitarget paradigm associated with the endocannabinoid system, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 1001, doi: 10.3390/ijms22031001.
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto, Y., Uchigashima, M., and Watanabe, M. (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission, *Physiol. Rev.*, **89**, 309-380, doi: 10.1152/physrev.00019.2008.
- Castillo, P. E., Younts, T. J., Chávez, A. E., and Hashimoto, Y. (2012) Endocannabinoid signaling and synaptic function, *Neuron*, **76**, 70-81, doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.020.
- Rozov, A. V., Valiullina, F. F., and Bolshakov, A. P. (2017) Mechanisms of long-term plasticity of hippocampal GABAergic synapses, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 257-263, doi: 10.1134/S0006297917030038.
- Turu, G., and Hunyady, L. (2010) Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor, *J. Mol. Endocrinol.*, **44**, 75-85, doi: 10.1677/JME-08-0190.
- Dalton, G. D., and Howlett, A. C. (2012) Cannabinoid CB1 receptors transactivate multiple receptor tyrosine kinases and regulate serine/threonine kinases to activate ERK in neuronal cells, *Br. J. Pharmacol.*, **165**, 2497-2511, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01455.x.
- Kreitzer, A. C., and Regehr, W. G. (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells, *Neuron*, **29**, 717-727, doi: 10.1016/S0896-6273(01)00246-X.
- Fletcher-Jones, A., Hildick, K. L., Evans, A. J., Nakamura, Y., Henley, J. M., and Wilkinson, K. A. (2020) Protein interactors and trafficking pathways that regulate the cannabinoid type1 receptor (CB1R), *Front. Mol. Neurosci.*, **13**, 108, doi: 10.3389/fnmol.2020.00108.
- Augustin, S. M., and Lovinger, D. M. (2018) Functional relevance of endocannabinoid-dependent synaptic plasticity in the central nervous system, *ACS Chem. Neurosci.*, **9**, 2146-2161, doi: 10.1021/acscchemneuro.7b00508.
- Huang, G. Z., and Woolley, C. S. (2012) Estradiol acutely suppresses inhibition in the hippocampus through a sex-specific endocannabinoid and mGluR-dependent mechanism, *Neuron*, **74**, 801-808, doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.035.
- Tabatadze, N., Huang, G., May, R. M., Jain, A., and Woolley, C. S. (2015) Sex differences in molecular signaling at inhibitory synapses in the hippocampus, *J. Neurosci.*, **35**, 11252-11265, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1067-15.2015.
- Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A., and Kano, M. (2001) Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors, *Neuron*, **31**, 463-475, doi: 10.1016/S0896-6273(01)00375-0.
- Kim, J., Isokawa, M., Ledent, C., and Alger, B. E. (2002) Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus, *J. Neurosci.*, **22**, 10182-10191, doi: 10.1523/jneurosci.22-23-10182.2002.
- Straiker, A., and Mackie, K. (2007) Metabotropic suppression of excitation in murine autaptic hippocampal neurons, *J. Physiol.*, **578**, 773-785, doi: 10.1113/jphysiol.2006.117499.

19. Ohno-Shosaku, T., and Kano, M. (2014) Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **29**, 1-8, doi: 10.1016/j.conb.2014.03.017.
20. Varma, N., Carlson, G. C., Ledent, C., and Alger, B. E. (2001) Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus, *J. Neurosci.*, **21**, RC188, doi: 10.1523/jneurosci.21-24-j0003.2001.
21. Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Fukudome, Y., Shosaku, J., Tsubokawa, H., Taketo, M. M., et al. (2003) Postsynaptic M1 and M3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signalling in the hippocampus, *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 109-116, doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02732.x.
22. Hashimoto-dani, Y., Ohno-Shosaku, T., Watanabe, M., and Kano, M. (2007) Roles of phospholipase C β and NMDA receptor in activity-dependent endocannabinoid release, *J. Physiol.*, **584**, 373-380, doi: 10.1113/jphysiol.2007.137497.
23. Ramikie, T. S., Nyilas, R., Bluett, R. J., Gamble-George, J. C., Hartley, N. D., et al. (2014) Multiple mechanistically distinct modes of endocannabinoid mobilization at central amygdala glutamatergic synapses, *Neuron*, **81**, 1111-1125, doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.012.
24. Colmers, P. L. W., and Bains, J. S. (2018) Presynaptic mGluRs control the duration of endocannabinoid-mediated DSI, *J. Neurosci.*, **38**, 10444-10453, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1097-18.2018.
25. Ohno-Shosaku, T., Tanimura, A., Hashimoto-dani, Y., and Kano, M. (2012) Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission, *Neuroscientist*, **18**, 119-132, doi: 10.1177/1073858410397377.
26. Chevalere, V., Takahashi, K. A., and Castillo, P. E. (2006) Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS, *Annu. Rev. Neurosci.*, **29**, 37-76, doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112834.
27. Lutz, B. (2020) Neurobiology of cannabinoid receptor signaling, *Dialogues Clin. Neurosci.*, **22**, 207-222, doi: 10.31887/DCNS.2020.22.3/blutz.
28. Katona, I., and Freund, T. F. (2008) Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease, *Nat. Med.*, **14**, 923-930, doi: 10.1038/nm.f1869.
29. Cristino, L., Bisogno, T., and Di Marzo, V. (2020) Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders, *Nat. Rev. Neurol.*, **16**, 9-29, doi: 10.1038/s41582-019-0284-z.
30. Piomelli, D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling, *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 873-884, doi: 10.1038/nrn1247.
31. Hashimoto-dani, Y., Ohno-Shosaku, T., Tanimura, A., Kita, Y., Sano, Y., Shimizu, T., et al. (2013) Acute inhibition of diacylglycerol lipase blocks endocannabinoid-mediated retrograde signalling: evidence for on-demand biosynthesis of 2-arachidonoylglycerol, *J. Physiol.*, **591**, 4765-4776, doi: 10.1113/jphysiol.2013.254474.
32. Richardson, J. D. (2000) Cannabinoids modulate pain by multiple mechanisms of action, *J. Pain*, **1**, 2-14, doi: 10.1016/S1526-5900(00)90082-8.
33. Howlett, A. C., Reggio, P. H., Childers, S. R., Hampson, R. E., Ulloa, N. M., and Deutsch, D. G. (2011) Endocannabinoid tone versus constitutive activity of cannabinoid receptors, *Br. J. Pharmacol.*, **163**, 1329-1343, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01364.x.
34. Lee, S. H., Ledri, M., Tóth, B., Marchionni, I., Henstridge, C. M., Dudok, B., et al. (2015) Multiple forms of endocannabinoid and endovanilloid signaling regulate the tonic control of GABA release, *J. Neurosci.*, **35**, 10039-10057, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4112-14.2015.
35. Kenakin, T. P. (2004) Allosteric modulators: the new generation of receptor antagonist, *Mol. Interv.*, **4**, 222-229, doi: 10.1124/mi.4.4.6.
36. Szabó, G. G., Lenkey, N., Holderith, N., András, T., Nusser, Z., and Hájós, N. (2014) Presynaptic calcium channel inhibition underlies CB1 cannabinoid receptor-mediated suppression of GABA release, *J. Neurosci.*, **34**, 7958-7963, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0247-14.2014.
37. Pertwee, R. G. (2005) Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors, *Life Sci.*, **76**, 1307-1324, doi: 10.1016/j.lfs.2004.10.025.
38. Kim, J., and Alger, B. E. (2010) Reduction in endocannabinoid tone is a homeostatic mechanism for specific inhibitory synapses, *Nat. Neurosci.*, **13**, 592-600, doi: 10.1038/nn.2517.
39. Thibault, K., Carrel, D., Bonnard, D., Gallatz, K., Simon, A., Biard, M., et al. (2013) Activation-dependent subcellular distribution patterns of CB1 cannabinoid receptors in the rat forebrain, *Cereb. Cortex*, **23**, 2581-2591, doi: 10.1093/cercor/bhs240.
40. Manza, P., Yuan, K., Shokri-Kojori, E., Tomasi, D., and Volkow, N. D. (2020) Brain structural changes in cannabis dependence: association with MAGL, *Mol. Psychiatry*, **25**, 3256-3266, doi: 10.1038/s41380-019-0577-z.
41. Tanimura, A., Yamazaki, M., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M., Kawata, S., Abe, M., et al. (2010) The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase α mediates retrograde suppression of synaptic transmission, *Neuron*, **65**, 320-327, doi: 10.1016/j.neuron.2010.01.021.
42. Ruiu, S., Pinna, G. A., Marchese, G., Mussinu, J. M., Saba, P., Tambaro, S., et al. (2003) Synthesis and characterization of NESS 0327: a novel putative antagonist of the CB1 cannabinoid receptor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **306**, 363-370, doi: 10.1124/jpet.103.049924.
43. Canals, M., and Milligan, G. (2008) Constitutive activity of the cannabinoid CB1 receptor regulates the function of co-expressed μ -opioid receptors, *J. Biol. Chem.*, **283**, 11424-11434, doi: 10.1074/jbc.M710300200.
44. Hillard, C. J. (2018) Circulating endocannabinoids: from whence do they come and where are they going? *Neuropsychopharmacology*, **43**, 155-172, doi: 10.1038/npp.2017.130.
45. Chen, K., Ratzliff, A., Hilgenberg, L., Gulyás, A., Freund, T. F., et al. (2003) Long-term plasticity of endocannabinoid signaling induced by developmental febrile seizures, *Neuron*, **39**, 599-611, doi: 10.1016/S0896-6273(03)00499-9.
46. Dvorzhak, A., Semtner, M., Faber, D. S., and Grantyn, R. (2013) Tonic mGluR5/CB1-dependent suppression of inhibition as a pathophysiological hallmark in the striatum of mice carrying a mutant form of huntingtin, *J. Physiol.*, **591**, 1145-1166, doi: 10.1113/jphysiol.2012.241018.
47. Földy, C., Malenka, R. C., and Südhof, T. C. (2013) Autism-associated neuroigin-3 mutations commonly disrupt tonic endocannabinoid signaling, *Neuron*, **78**, 498-509, doi: 10.1016/j.neuron.2013.02.036.
48. Alger, B. E., and Kim, J. (2011) Supply and demand for endocannabinoids, *Trends Neurosci.*, **34**, 304-315, doi: 10.1016/j.tins.2011.03.003.
49. Speed, H. E., Masiulis, I., Gibson, J. R., and Powell, C. M. (2015) Increased cortical inhibition in autism-linked neuroigin-3R451C mice is due in part to loss of endocannabinoid signaling, *PLoS One*, **10**, e0140638, doi: 10.1371/journal.pone.0140638.
50. Martella, G., Meringolo, M., Trobiani, L., De Jaco, A., Pisani, A., and Bonsi, P. (2018) The neurobiological bases of autism spectrum disorders: the R451C-neuroigin3 mutation hampers the expression of long-term synaptic depression in the dorsal striatum, *Eur. J. Neurosci.*, **47**, 701-708, doi: 10.1111/ejn.13705.
51. Anderson, G. R., Aoto, J., Tabuchi, K., Földy, C., Covey, J., et al. (2015) β -Neurexins control neural circuits

- by regulating synaptic endocannabinoid signaling, *Cell*, **162**, 593-606, doi: 10.1016/j.cell.2015.06.056.
52. Glass, M., and Felder, C. C. (1997) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a G(s) linkage to the CB1 receptor, *J. Neurosci.*, **17**, 5327-5333, doi: 10.1523/jneurosci.17-14-05327.1997.
 53. Abadji, V., Lucas-Lenard, J. M., Chin, C. N., and Kendall, D. A. (1999) Involvement of the carboxyl terminus of the third intracellular loop of the cannabinoid CB1 receptor in constitutive activation of G(s), *J. Neurochem.*, **72**, 2032-2038, doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0722032.x.
 54. Calandra, B., Portier, M., Kernéis, A., Delpech, M., Carillon, C., et al. (1999) Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor, *Eur. J. Pharmacol.*, **374**, 445-455, doi: 10.1016/S0014-2999(99)00349-0.
 55. Kearn, C. S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K., and Glass, M. (2005) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol. Pharmacol.*, **67**, 1697-1704, doi: 10.1124/mol.104.006882.
 56. Glass, M., and Northup, J. K. (1999) Agonist selective regulation of Gproteins by cannabinoid CB1 and CB2 receptors, *Mol. Pharmacol.*, **56**, 1362-1369, doi: 10.1124/mol.56.6.1362.
 57. Wootten, D., Christopoulos, A., Marti-Solano, M., Babu, M. M., and Sexton, P. M. (2018) Mechanisms of signalling and biased agonism in Gprotein-coupled receptors, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 638-653, doi: 10.1038/s41580-018-0049-3.
 58. Varga, E., Georgieva, T., Tumati, S., Alves, I., Salamon, Z., et al. (2010) Functional selectivity in cannabinoid signaling, *Curr. Mol. Pharmacol.*, **1**, 273-284, doi: 10.2174/1874467210801030273.
 59. Diez-Alarcia, R., Ibarra-Lecue, I., Lopez-Cardona, Á. P., Meana, J., Gutierrez-Adán, A., et al. (2016) Biased agonism of three different cannabinoid receptor agonists in mouse brain cortex, *Front. Pharmacol.*, **7**, 415, doi: 10.3389/fphar.2016.00415.
 60. Gaydukov, A. E., Dzhahaloniya, I. Z., Tarasova, E. O., and Balezina, O. P. (2020) The participation of endocannabinoid receptors in the regulation of spontaneous synaptic activity at neuromuscular junctions of mice, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.*, **14**, 7-16, doi: 10.1134/S1990747819060059.
 61. Laprairie, R. B., Bagher, A. M., Kelly, M. E. M., Dupré, D. J., and Denovan-Wright, E. M. (2014) Type1 cannabinoid receptor ligands display functional selectivity in a cell culture model of striatal medium spiny projection neurons, *J. Biol. Chem.*, **289**, 24845-24862, doi: 10.1074/jbc.M114.557025.
 62. Kenakin, T., and Christopoulos, A. (2013) Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **12**, 205-216, doi: 10.1038/nrd3954.
 63. Finlay, D. B., Cawston, E. E., Grimsey, N. L., Hunter, M. R., Korde, A., et al. (2017) Gas signalling of the CB1 receptor and the influence of receptor number, *Br. J. Pharmacol.*, **174**, 2545-2562, doi: 10.1111/bph.13866.
 64. Di Marzo, V. (2018) New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **17**, 623-639, doi: 10.1038/nrd.2018.115.
 65. Song, C., Anderson, G. R., Sutton, L. P., Dao, M., and Martemyanov, K. A. (2018) Selective role of RGS9-2 in regulating retrograde synaptic signaling of indirect pathway medium spiny neurons in dorsal striatum, *J. Neurosci.*, **38**, 7120-7131, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0493-18.2018.
 66. O'Brien, J. B., Wilkinson, J. C., and Roman, D. L. (2019) Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins as drug targets: progress and future potentials, *J. Biol. Chem.*, **294**, 18571-18585, doi: 10.1074/jbc.REV119.007060.
 67. Ibsen, M. S., Connor, M., and Glass, M. (2017) Cannabinoid CB1 and CB2 receptor signaling and bias, *Cannabis Cannabinoid Res.*, **2**, 48-60, doi: 10.1089/can.2016.0037.
 68. Morales, P., Goya, P., and Jagerovic, N. (2018) Emerging strategies targeting CB2 cannabinoid receptor: biased agonism and allosterism, *Biochem. Pharmacol.*, **157**, 8-17, doi: 10.1016/j.bcp.2018.07.031.
 69. Wouters, E., Walraed, J., Banister, S. D., and Stove, C. P. (2019) Insights into biased signaling at cannabinoid receptors: synthetic cannabinoid receptor agonists, *Biochem. Pharmacol.*, **169**, 113623, doi: 10.1016/j.bcp.2019.08.025.
 70. Al-Zoubi, R., Morales, P., and Reggio, P. H. (2019) Structural insights into CB1 receptor biased signaling, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 1837, doi: 10.3390/ijms20081837.
 71. Sachdev, S., Banister, S. D., Santiago, M., Bladen, C., Kassiou, M., and Connor, M. (2020) Differential activation of Gprotein-mediated signaling by synthetic cannabinoid receptor agonists, *Pharmacol. Res. Perspect.*, **8**, e00566, doi: 10.1002/prp2.566.
 72. Patel, M., Finlay, D. B., and Glass, M. (2021) Biased agonism at the cannabinoid receptors – evidence from synthetic cannabinoid receptor agonists, *Cell. Signal.*, **78**, 109865, doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109865.
 73. Ibsen, M. S., Finlay, D. B., Patel, M., Javitch, J. A., Glass, M., and Grimsey, N. L. (2019) Cannabinoid CB1 and CB2 receptor-mediated arrestin translocation: species, subtype, and agonist-dependence, *Front. Pharmacol.*, **10**, 350, doi: 10.3389/fphar.2019.00350.
 74. DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J., and Shenoy, S. K. (2007) β -Arrestins and cell signaling, *Annu. Rev. Physiol.*, **69**, 483-510, doi: 10.1146/annurev.physiol.69.022405.154749.
 75. Nobles, K. N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A. K., Lam, C. M., et al. (2011) Distinct phosphorylation sites on the β 2-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin, *Sci. Signal.*, **4**, ra51, doi: 10.1126/scisignal.2001707.
 76. Delgado-Peraza, F., Ahn, K. H., Noguera-Ortiz, C., Mungrue, I. N., Mackie, K., et al. (2016) Mechanisms of biased β -arrestin-mediated signaling downstream from the cannabinoid 1 receptor, *Mol. Pharmacol.*, **89**, 618-629, doi: 10.1124/mol.115.103176.
 77. Morales, P., Bruix, M., and Jiménez, M. A. (2020) Structural insights into β -arrestin/CB1 receptor interaction: Nmr and cd studies on model peptides, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8111, doi: 10.3390/ijms21218111.
 78. Rios, C., Gomes, I., and Devi, L. A. (2006) μ opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neurogenesis, *Br. J. Pharmacol.*, **148**, 387-395, doi: 10.1038/sj.bjp.0706757.
 79. Cinar, R., Freund, T. F., Katona, I., Mackie, K., and Szucs, M. (2008) Reciprocal inhibition of G-protein signaling is induced by CB1 cannabinoid and GABAB receptor interactions in rat hippocampal membranes, *Neurochem. Int.*, **52**, 1402-1409, doi: 10.1016/j.neuint.2008.02.005.
 80. Turu, G., Várnal, P., Gyombolai, P., Szidonya, L., Offertaler, L., et al. (2009) Paracrine transactivation of the CB1 cannabinoid receptor by AT1 angiotensin and other Gq/11 protein-coupled receptors, *J. Biol. Chem.*, **284**, 16914-16921, doi: 10.1074/jbc.M109.003681.
 81. Wu, Y., Liu, Q., Guo, B., Ye, F., Ge, J., and Xue, L. (2020) BDNF activates postsynaptic TrkB receptors to induce endocannabinoid release and inhibit presynaptic calcium

- influx at a calyx-type synapse, *J. Neurosci.*, **40**, 8070-8087, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2838-19.2020.
82. Callén, L., Moreno, E., Barroso-Chinea, P., Moreno-Delgado, D., Cortés, A., et al. (2012) Cannabinoid receptors CB 1 and CB 2 form functional heteromers in brain, *J. Biol. Chem.*, **287**, 20851-20865, doi: 10.1074/jbc.M111.335273.
 83. Navarro, G., Varani, K., Reyes-Resina, I., de Medina, V. S., Rivas-Santisteban, R., et al. (2018) Cannabigerol action at cannabinoid CB1 and CB2 receptors and at CB1-CB2 heteroreceptor complexes, *Front. Pharmacol.*, **9**, 632, doi: 10.3389/fphar.2018.00632.
 84. Bénard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenço, J., Bellocchio, L., et al. (2012) Mitochondrial CB1 receptors regulate neuronal energy metabolism, *Nat. Neurosci.*, **15**, 558-564, doi: 10.1038/nn.3053.
 85. Hebert-Chatelain, E., Reguero, L., Puente, N., Lutz, B., Chaouloff, F., et al. (2014) Cannabinoid control of brain bioenergetics: exploring the subcellular localization of the CB1 receptor, *Mol. Metab.*, **3**, 495-504, doi: 10.1016/j.molmet.2014.03.007.
 86. Koch, M., Varela, L., Kim, J. G., Kim, J. D., Hernández-Nuño, F., et al. (2015) Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding, *Nature*, **519**, 45-50, doi: 10.1038/nature14260.
 87. Rozenfeld, R., and Devi, L. A. (2008) Regulation of CB1 cannabinoid receptor trafficking by the adaptor protein AP-3, *FASEB J.*, **22**, 2311-2322, doi: 10.1096/fj.07-102731.
 88. Hebert-Chatelain, E., Desprez, T., Serrat, R., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., et al. (2016) A cannabinoid link between mitochondria and memory, *Nature*, **539**, 555-559, doi: 10.1038/nature20127.
 89. Djeungoue-Petga, M. A., and Hebert-Chatelain, E. (2017) Linking mitochondria and synaptic transmission: the CB1 receptor, *BioEssays*, **39**, 1700126, doi: 10.1002/bies.201700126.
 90. Den Boon, F. S., Chameau, P., Schaafsma-Zhao, Q., Van Aken, W., Bari, M., et al. (2012) Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 3534-3539, doi: 10.1073/pnas.1118167109.
 91. Brailoiu, G. C., Deliu, E., Marcu, J., Hoffman, N. E., Console-Bram, L., et al. (2014) Differential activation of intracellular versus plasmalemmal CB2 Cannabinoid receptors, *Biochemistry*, **53**, 4990-4999, doi: 10.1021/bi500632a.
 92. Jong, Y. J. I., Harmon, S. K., and O'Malley, K. L. (2018) Intracellular GPCRs play key roles in synaptic plasticity, *ACS Chem. Neurosci.*, **9**, 2162-2172, doi: 10.1021/acchemneuro.7b00516.
 93. Navarrete, M., and Araque, A. (2008) Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication, *Neuron*, **57**, 883-893, doi: 10.1016/j.neuron.2008.01.029.
 94. Metna-Laurent, M., and Marsicano, G. (2015) Rising stars: modulation of brain functions by astroglial type-1 cannabinoid receptors, *Glia*, **63**, 353-364, doi: 10.1002/glia.22773.
 95. Stella, N. (2010) Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas, *Glia*, **58**, 1017-1030, doi: 10.1002/glia.20983.
 96. Gutiérrez-Rodríguez, A., Bonilla-Del Río, I., Puente, N., Gómez-Urquijo, S. M., Fontaine, C. J., et al. (2018) Localization of the cannabinoid type-1 receptor in subcellular astrocyte compartments of mutant mouse hippocampus, *Glia*, **66**, 1417-1431, doi: 10.1002/glia.23314.
 97. Jimenez-Blasco, D., Busquets-Garcia, A., Hebert-Chatelain, E., Serrat, R., Vicente-Gutierrez, C., et al. (2020) Glucose metabolism links astroglial mitochondria to cannabinoid effects, *Nature*, **583**, 603-608, doi: 10.1038/s41586-020-2470-y.
 98. Hegyi, Z., Oláh, T., Koszeghy, A., Pisticelli, F., Holló, K., et al. (2018) CB1 receptor activation induces intracellular Ca²⁺ mobilization and 2-arachidonoylglycerol release in rodent spinal cord astrocytes, *Sci. Rep.*, **8**, 10562, doi: 10.1038/s41598-018-28763-6.
 99. Smith, N. A., Bekar, L. K., and Nedergaard, M. (2020) Astrocytic endocannabinoids mediate hippocampal transient heterosynaptic depression, *Neurochem. Res.*, **45**, 100-108, doi: 10.1007/s11064-019-02834-0.
 100. Covelo, A., and Araque, A. (2016) Lateral regulation of synaptic transmission by astrocytes, *Neuroscience*, **323**, 62-66, doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.02.036.
 101. Navarrete, M., and Araque, A. (2010) Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes, *Neuron*, **68**, 113-126, doi: 10.1016/j.neuron.2010.08.043.
 102. Robin, L. M., Oliveira da Cruz, J. F., Langlais, V. C., Martin-Fernandez, M., Metna-Laurent, M., et al. (2018) Astroglial CB1 receptors determine synaptic D-serine availability to enable recognition memory, *Neuron*, **98**, 935-944.e5, doi: 10.1016/j.neuron.2018.04.034.
 103. Carlsen, E. M. M., Falk, S., Skupio, U., Robin, L., Zottola, A. C. P., et al. (2021) Spinal astroglial cannabinoid receptors control pathological tremor, *Nat. Neurosci.*, **24**, 658-666, doi: 10.1038/s41593-021-00818-4.
 104. Busquets-Garcia, A., Bains, J., and Marsicano, G. (2018) CB1 receptor signaling in the brain: extracting specificity from ubiquity, *Neuropsychopharmacology*, **43**, 4-20, doi: 10.1038/npp.2017.206.
 105. Eldeeb, K., Leone-Kabler, S., and Howlett, A. C. (2016) CB1 cannabinoid receptor-mediated increases in cyclic AMP accumulation are correlated with reduced Gi/o function, *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, **27**, 311-322, doi: 10.1515/jbcp-2015-0096.
 106. Bagher, A. M., Laprairie, R. B., Toguri, J. T., Kelly, M. E. M., and Denovan-Wright, E. M. (2017) Bidirectional allosteric interactions between cannabinoid receptor1 (CB1) and dopamine receptor2 long (D2L) heterotetramers, *Eur. J. Pharmacol.*, **813**, 66-83, doi: 10.1016/j.ejphar.2017.07.034.
 107. Piette, C., Cui, Y., Gervasi, N., and Venance, L. (2020) Lights on endocannabinoid-mediated synaptic potentiation, *Front. Mol. Neurosci.*, **13**, 132, doi: 10.3389/fnmol.2020.00132.
 108. Cui, Y., Prokin, I., Xu, H., Delord, B., Genet, S., et al. (2016) Endocannabinoid dynamics gate spike-timing dependent depression and potentiation, *ELife*, **5**, e13185, doi: 10.7554/eLife.13185.
 109. Shonesy, B. C., Wang, X., Rose, K. L., Ramikie, T. S., Cavener, V. S., et al. (2013) CaMKII regulates diacylglycerol lipase- α and striatal endocannabinoid signaling, *Nat. Neurosci.*, **16**, 456-463, doi: 10.1038/nn.3353.
 110. Xu, J. Y., Zhang, J., and Chen, C. (2012) Long-lasting potentiation of hippocampal synaptic transmission by direct cortical input is mediated via endocannabinoids, *J. Physiol.*, **590**, 2305-2315, doi: 10.1113/jphysiol.2011.223511.
 111. Silva-Cruz, A., Carlström, M., Ribeiro, J. A., and Sebastião, A. M. (2017) Dual influence of endocannabinoids on long-term potentiation of synaptic transmission, *Front. Pharmacol.*, **8**, 921, doi: 10.3389/fphar.2017.00921.
 112. Cavuoto, P., McAinch, A. J., Hatzinikolas, G., Janovská, A., Game, P., and Wittert, G. A. (2007) The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **364**, 105-110, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.09.099.
 113. Crespillo, A., Suárez, J., Bermúdez-Silva, F. J., Rivera, P., Vida, M., et al. (2011) Expression of the cannabinoid sys-

- tem in muscle: effects of a high-fat diet and CB1 receptor blockade, *Biochem. J.*, **433**, 175-185, doi: 10.1042/BJ20100751.
114. Hutchins-Wiese, H. L., Li, Y., Hannon, K., and Watkins, B. A. (2012) Hind limb suspension and long-chain omega-3 PUFA increase mRNA endocannabinoid system levels in skeletal muscle, *J. Nutr. Biochem.*, **23**, 986-993, doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.05.005.
 115. Maccarrone, M., Bab, I., Bíró, T., Cabral, G. A., Dey, S. K., et al. (2015) Endocannabinoid signaling at the periphery: 50years after THC, *Trends Pharmacol. Sci.*, **36**, 277-296, doi: 10.1016/j.tips.2015.02.008.
 116. Oláh, T., Bodnár, D., Tóth, A., Vincze, J., Fodor, J., et al. (2016) Cannabinoid signalling inhibits sarcoplasmic Ca²⁺ release and regulates excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle, *J. Physiol.*, **594**, 7381-7398, doi: 10.1113/JP272449.
 117. Heinitz, S., Basolo, A., Piomelli, D., Krakoff, J., and Piaggi, P. (2018) Endocannabinoid anandamide mediates the effect of skeletal muscle sphingomyelins on human energy expenditure, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **103**, 3757-3766, doi: 10.1210/jc.2018-00780.
 118. Morsch, M., Protti, D. A., Cheng, D., Braet, F., Chung, R. S., et al. (2018) Cannabinoid-induced increase of quantal size and enhanced neuromuscular transmission, *Sci. Rep.*, **8**, 4685, doi: 10.1038/s41598-018-22888-4.
 119. Ge, D., Odierna, G. L., and Phillips, W. D. (2020) Influence of cannabinoids upon nerve-evoked skeletal muscle contraction, *Neurosci. Lett.*, **725**, 134900, doi: 10.1016/j.neulet.2020.134900.
 120. Hoekman, T. B., Dettbarn, W. D., and Klausner, H. A. (1976) Actions of δ 9-tetrahydrocannabinol on neuromuscular transmission in the rat diaphragm, *Neuropharmacology*, **15**, 315-319, doi: 10.1016/0028-3908(76)90135-0.
 121. Kumbaraci, N. M., and Nastuk, W. L. (1980) Effects of Δ 9-tetrahydrocannabinol on excitable membranes and neuromuscular transmission, *Mol. Pharmacol.*, **17**, 344-349.
 122. Turkanis, S. A., and Karler, R. (1986) Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neuromuscular transmission in the frog, *Neuropharmacology*, **25**, 1273-1278, doi: 10.1016/0028-3908(86)90147-4.
 123. Newman, Z., Malik, P., Wu, T. Y., Ochoa, C., Watsa, N., and Lindgren, C. (2007) Endocannabinoids mediate muscarine-induced synaptic depression at the vertebrate neuromuscular junction, *Eur. J. Neurosci.*, **25**, 1619-1630, doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05422.x.
 124. Silveira, P. E., Silveira, N. A., de Cássia Morini, V., Kushmerick, C., and Naves, L. A. (2010) Opposing effects of cannabinoids and vanilloids on evoked quantal release at the frog neuromuscular junction, *Neurosci. Lett.*, **473**, 97-101, doi: 10.1016/j.neulet.2010.02.026.
 125. Melis, M., Pistis, M., Perra, S., Muntoni, A. L., Pillolla, G., and Gessa, G. L. (2004) Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors, *J. Neurosci.*, **24**, 53-62, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4503-03.2004.
 126. Zhu, P. J., and Lovinger, D. M. (2005) Retrograde endocannabinoid signaling in a postsynaptic neuron/synaptic bouton preparation from basolateral amygdala, *J. Neurosci.*, **25**, 6199-6207, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1148-05.2005.
 127. Тарасова Е. О., Хоткина Н. А., Гайдуков А. Е., Балезина О. П. (2021) Потенциация спонтанной секреции ацетилхолина в моторных синапсах мыши под действием 2-арахидоноилглицерина и анандамида, *Вестник Московского Университета. Серия 16. Биология*, **76**, 3-9.
 128. Edwards, R. H. (2007) The neurotransmitter cycle and quantal size, *Neuron*, **55**, 835-858, doi: 10.1016/j.neuron.2007.09.001.
 129. Балезина О. П., Гайдуков А. Е. (2018) Пресинаптическая регуляция размера квантов медиатора, *Успехи физиологических наук*, **49**, 20-44, doi: 10.7868/s0301179818020029.

NONCANONICAL ACTIVITY OF ENDOCANNABINOIDS AND THEIR RECEPTORS IN CENTRAL AND PERIPHERAL SYNAPSES

Review

O. P. Balezina, E. O. Tarasova, and A. E. Gaydukov*

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; E-mail: gaydukov@gmail.com

This review focuses on new aspects of endocannabinoid functions and mechanisms of activity in central and peripheral synapses, different from the general viewpoint that endocannabinoids are retrograde signaling molecules, which inhibit neurotransmitter release by activating specific presynaptic endocannabinoid receptors CB1 and CB2. Biased agonism of the endogenous and synthetic cannabinoids as well as ability of the CB-receptors to couple not only with classical G_i-proteins, but also with G_s- and G_q-proteins and, moreover, with β -arrestins (thereby triggering additional signaling pathways in synapses) are described here in detail. Examples of noncanonical tonic activity of endocannabinoids and their receptors and their role in synaptic function are also presented. The role of endocannabinoids in short-term and long-term potentiation of neurotransmitter release in central synapses and their facilitating effect on quantal size and other parameters of acetylcholine release in mammalian neuromuscular junctions are highlighted in this review. In conclusion, it is stated that the endocannabinoid system has a wider range of various multidirectional modulating effects (both potentiating and inhibiting) on neurotransmitter release than initially recognized. Re-evaluation of the functions of endocannabinoid system with consideration of its noncanonical features will lead to better understanding of its role in the normal and pathological functioning of the nervous system and other systems of the body, which has an enormous practical value.

Keywords: endocannabinoids, CB1 and CB2-receptors, β -arrestin, endocannabinoid tonus, synaptic transmission facilitation

COVID-19: МИФЫ И РЕАЛЬНОСТЬ

Обзор

© 2021 Л.В. Кордюкова^{1*}, А.В. Шанько^{2,3}

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

² ООО ФОРТ, Департамент науки, 119435 Москва, Россия

³ НИИ вирусологии имени Д.И. Ивановского, «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098 Москва, Россия

Поступила в редакцию 07.04.2021

После доработки 28.04.2021

Принята к публикации 28.04.2021

COVID-19, новое респираторное заболевание человека, жертвами которого за год пандемии стали около 3 млн человек, является глобальным вызовом здравоохранению во всем мире. Вызвавший его инфекционный агент – новый коронавирус SARS-CoV-2 – имеет ряд существенных структурных отличий от других коронавирусов, что делает его более патогенным и способным быстро распространяться. В настоящем обзоре мы рассмотрим важные характеристики основного поверхностного антигена SARS-CoV-2 (шиповидного S-белка), такие как: (1) способность рецептор-связывающего домена (RBD) переходить из положения «стоя» («открытая» префузионная конформация) в положение «лежа» («закрытая» префузионная конформация) для ускользания от нейтрализующих антител; (2) использование преимуществ высокого сродства связывания RBD в открытой конформации с рецептором – ангиотензинпревращающим ферментом 2 человека для эффективного входа в клетку; (3) преактивация S-белка внутриклеточными фуриноподобными протеазами для распространения вируса по разным типам клеток. Мы рассмотрим взаимодействие S-белка с клеточными рецепторами, корецепторами и антагонистами и опишем гипотетический механизм дестабилизации гомотримерной структуры «шипа», запускающий слияние оболочки вириона с мембраной клетки при физиологическом значении pH и опосредующий вход вирусного нуклеокапсида в цитоплазму. Крайне важным с практической точки зрения, особенно при производстве вакцин, является обнаруженное свойство перехода префузионной конформации S-белка в постфузионную на поверхности вирионов в случае инактивации их такими реагентами, как β-пропиолактон. Мы также сравним несколько особенностей COVID-19 и S-белка вируса SARS-CoV-2 со вспышками тяжелого гриппа, вызванными высокопатогенными штаммами вируса гриппа А подтипов H5 и H7, и структурными характеристиками молекул гемагглютинина этих штаммов. В конце обзора коротко перечислены перспективные и внедренные в практику анти-вирусные и патогенетические средства терапии COVID-19; рассмотрены традиционные и инновационные вакцины, недавно одобренные для профилактики заболевания, и их молекулярно-иммунологические особенности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: COVID-19, SARS-CoV-2, S-белок, структура, вирус гриппа, гемагглютинин, вакцины.

DOI: 10.31857/S0320972521070022

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемия заболевания с симптомами атипичной пневмонии началась в городе Ухань (провинция Хубей, Китай) зимой 2019 года. Причиной позднее был признан новый коронавирус человека (2019-nCoV, 2019 novel coronavirus), он

же – SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2). В феврале 2020 года Всемирная организация здравоохранения назвала данное заболевание «COVID-19» (COronaVirus Disease 2019). Эпидемия стала глобальной и перешла в пандемию. Большинство пациентов, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, испы-

Принятые сокращения: крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; крио-ЭТ – криоэлектронная томография; МНС – комплекс гистосовместимости; СТ – cytoplasmic tail (цитоплазматический домен); ТМ – трансмембранный; ACE2 – angiotensin converting enzyme 2 (ангиотензинпревращающий фермент 2); COVID-19 – COronaVirus Disease 2019 (новое коронавирусное заболевание 2019); ERGIC – компартмент эндоплазматического ретикулаума и аппарата Гольджи; HA – гемагглютинин; IFN – интерферон; RBD – рецептор-связывающий домен; RBM – рецептор-связывающий мотив; SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром 2).

* Адресат для корреспонденции.

тывают легкие или умеренные симптомы, которые исчезают через 6–10 дней. Однако почти у 20% пациентов болезнь протекает с серьезными осложнениями, включая атипичную двустороннюю пневмонию и острый респираторный дистресс-синдром, что чревато высокой летальностью [1]. На 5 апреля 2021 г. людские потери от COVID-19 исчисляются 2,85 млн при 131 млн заболевших (приблизительно 1–3% летальности по данным Всемирной Организации Здравоохранения: <https://covid19.who.int/> [2]). Для сравнения ежегодные вспышки сезонного гриппа, по некоторым оценкам, уносят 250 000–500 000 жизней ежегодно [3], а смертность во время пандемии гриппа подтипа H1N1 в 2009 году составила от 151 700 до 575 400 человек [4].

Оболочечные РНК-содержащие вирусы семейства Coronaviridae, как болезнетворные агенты, впервые выделены у человека в 60-х годах прошлого века. Четыре представителя коронавируса, инфицирующие человека (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HKU1), вызывают в большинстве случаев мягкие заболевания верхних дыхательных путей, но могут быть причиной серьезных инфекций у маленьких детей и пожилых людей [5]. Смертельные вспышки, причиной которых явились члены этого семейства, зарегистрированы гораздо позже. Высокопатогенный вирус SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus) стал причиной вспышки атипичной пневмонии в 2002 г., а в 2012 г. вирус MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus) привел к возникновению нового заболевания – так называемого ближневосточного респираторного синдрома. Смертность, по некоторым данным, составила 9,5% в случае атипичной пневмонии и 34,4% – в случае MERS [6]. К счастью, оба заболевания распространились на относительно небольшом географическом ареале.

В настоящем обзоре мы коснемся классификации коронавируса и отличий SARS-CoV-2 от других коронавируса человека; дадим основные характеристики всех его структурных компонентов. Основное внимание будет уделено структурному анализу шиповидного (спайкового, S) белка SARS-CoV-2, который является главной иммуногенной мишенью и поэтому находится в центре внимания при разработке вакцин [7]. Будут рассмотрены его взаимодействия с клеточными рецепторами, корцепторами и антагонистами, описан гипотетический механизм дестабилизации, запускающий слияние оболочки вириона с мембраной клетки при физиологическом значении pH и проникновение генома вируса в цитоплазму для его последующей репликации.

Тяжелое течение COVID-19, характеризующееся совокупностью патогенетических факторов, имеет сходство с гриппом, но только не сезонным, а тяжелым, вызываемым разнообразными представителями другого семейства оболочечных вирусов – Orthomyxoviridae, в частности, пандемическими штаммами 2009 г. подтипа H1N1 и вызвавшими вспышки «птичьего» гриппа подтипами H5N1 и H7N9. При этом очевидны параллели в некоторых структурных элементах поверхностных белков этих вирусов, геммагглютинаина (HA) вируса гриппа и S-белка SARS-CoV-2, а также в характере протекания заболевания, которые будут отмечены.

В конце обзора будут затронуты проблемы блокады вирусной инфекции и перечислены используемые стратегии терапии COVID-19. В отдельном разделе мы остановимся на принципах вакцинопрофилактики COVID-19 и рассмотрим особенности как классических, так и инновационных вакцин, одобренных для практического применения.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОРОНАВИРУСОВ

Семейство Coronaviridae включает вирусы, поражающие разных хозяев, включая птиц и млекопитающих. Это семейство относится к порядку Nidovirales, и в нем выделяют 2 подсемейства. Подсемейство Orthocoronavirinae включает все виды коронавируса, инфицирующих человека, и имеет 4 рода: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, *Deltacoronavirus* (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Род *Betacoronavirus* включает 4 подрода (по более ранней классификации – линии): *Embecovirus* (линия A), *Sarbecovirus* (линия B), *Merbecovirus* (линия C) и *Nobecovirus* (линия D) [8]. Вирусы HCoV-229E и HCoV-NL63 (род *Alphacoronavirus*), HCoV-OC43 и HCoV-HKU1 (род *Betacoronavirus*) могут вызывать у человека респираторные заболевания средней тяжести. Вирус SARS-CoV-2 принадлежит к роду *Betacoronavirus* и подроду *Sarbecovirus*. К этому же подроду относится близкородственный вирус SARS-CoV (SARS-CoV-1), в то время как вирус MERS-CoV принадлежит к подроду *Merbecovirus*.

Сферические или слабо полиморфные вирионы коронавируса диаметром 80–120 нм окружены липопротеиновой оболочкой и имеют шиповидные выступы на поверхности [9, 10], по форме напоминающие зубцы царской короны, что и дало семейству соответствующее название (рис. 1, а). По морфологии вирионы коронавируса сходны с вирионами вируса гриппа,

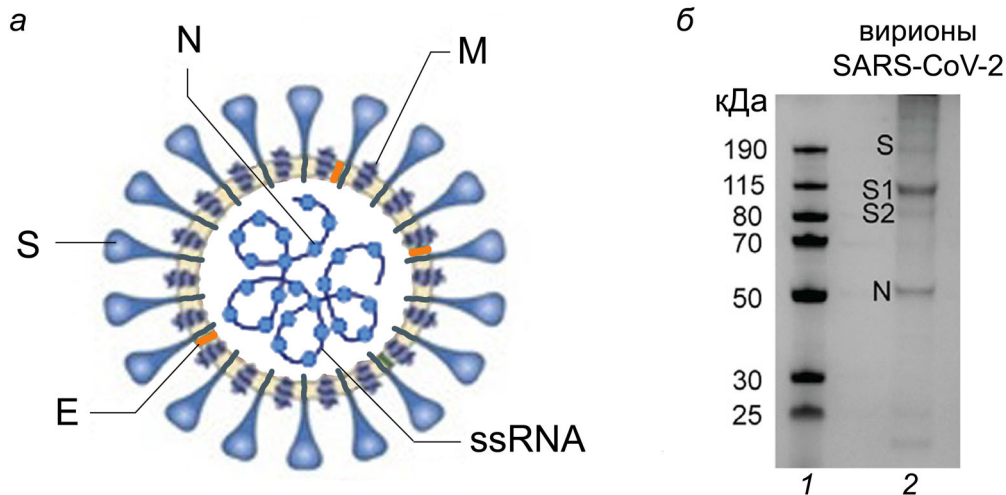


Рис. 1. Строение вириона SARS-CoV-2 и структурные белки. *а* – Схема вириона с указанием локализации структурных белков (S, N, M, E) и геномной одноцепочечной +РНК (ssRNA). Обозначения структурных белков: S – шиповидный белок, E – белок оболочки, M – мембранный белок, N – нуклеокапсидный белок. *б* – Электрофоретический анализ в SDS-ПААГ очищенных вирионов. 1 – молекулярные веса белковых маркеров; 2 – мажорные структурные белки (S, его субъединицы S1, S2 после протеолитической активации; N). Адаптировано с разрешением из статьи Yao et al. [9]. Авторское право Elsevier, 2020. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

но несут «шипы» только одного типа – гомотримеры S-белка [11, 12], в то время как два типа шипов (гомотримеры гемагглютинаина и гомотетрамеры нейраминидазы (NA)) различают у вирионов вирусов гриппа А и В [13, 14].

Геном коронавирусов представляет собой однонитевую молекулу РНК позитивной полярности (+РНК) размером от ~27 до 32 Кб (29,3 Кб – у SARS-CoV-2). Это самый большой и достаточно сложно организованный геном среди всех РНК-содержащих вирусов (для сравнения геном вируса гриппа весит 13,5 Кб). РНК коронавирусов кодирует 28–29 белков, в том числе 4 или 5 структурных белков. Вирусы человека HCoV-229E, HCoV-NL63, SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV имеют четыре структурных белка: S – шиповидный белок (Spike), E – белок оболочки (Envelope), M – мембранный белок (Membrane), N – нуклеокапсидный белок (Nucleoprotein) (рис. 1, *а*). В составе вирионов HCoV-OC43 и HCoV-NKU1 присутствует пятый структурный белок, HE – гемагглютинин-эстераза (Hemagglutinin-Esterase).

Белок S (шиповидный белок) коронавирусов с молекулярной массой ~175 кДа [15] представляет собой мембранный белок типа I, включающий большой гликозилированный N-концевой эктодомен, один трансмембранный (ТМ) домен и C-концевой внутривирионный (цитоплазматический, СТ) домен [11, 12]. S-белок связывается с рецепторами на поверхности клеток и играет ключевую роль в определении тканевого

тропизма вируса; опосредует слияние мембраны вириона с мембраной клетки хозяина, обеспечивая вход вирусного генома в цитоплазму; участвует в сборке вирионов. На электрофореграмме после разделения белков нативных вирионов в денатурирующих условиях S-белок представлен частично в виде нерасщепленного (неактивного) S-белка и в большей пропорции – в виде двух его субъединиц (S1 и S2) (рис. 1, *б*). Эпитопы S-белка служат основными антигенами, которые стимулируют образование нейтрализующих антител и становятся важными мишенями для цитотоксических лимфоцитов.

Белок M (мембранный) (~25–30 кДа) содержит 3 ТМ-домена [16, 17]. Он имеет небольшой N-концевой гликозилированный эктодомен и гораздо более протяженный C-концевой эндодомен, который уходит на 6–8 нм вглубь вирусной частицы [17, 18]. Мембранный протеин определяет форму вириона и обеспечивает контакт между разными структурными белками при его сборке [16, 19]. Исследования с помощью криоэлектронной томографии (крио-ЭТ) показали, что M-белок существует в виде димера, может принимать две разные конформации и способствует искривлению мембраны, что важно при формировании дочерних вирионов.

Белок N (нуклеокапсидный) (~46–48 кДа) ассоциирован с вирусной +РНК, образуя нуклеокапсид. Этот белок может участвовать в регуляции синтеза РНК вируса и взаимодействует с белком M при почковании вируса [16]. В N-бел-

ке предсказано несколько антигенных эпитопов; он считается одним из важных антигенов коронавируса [20].

Белок Е (белок оболочки) (~8–12 кДа) трансмембранный белок типа III, который имеет небольшой N-концевой эктодомен (~16 а.о.), один ТМ-домен и СТ-домен, включающий ~37–50 а.о. Этот белок сходен по функции с белком М2 вируса гриппа: он имеет випоринную активность (образует пентамерный ионный канал в липидной мембране), а также участвует в сборке вирусных частиц и их отпочковывании [16]. Три консервативных остатка цистеина S-ацилированы, что важно для сборки вирионов [21–23]. Белки Е и М влияют на внутриклеточный транспорт белка S, его протеолиз и N-гликозилирование [24].

Белок НЕ (гемагглютинин-эстераза) входит в структуру только некоторых β-коронавирусов, в частности вирусов человека HCoV-OC43 и HKU1, а также вирусов птиц рода *Deltacoronavirus*. Часть НЕ-белка связывается с нейраминной кислотой на поверхности клетки хозяина и, вероятно, способствует начальной адсорбции вируса мембраной. Эстераза отщепляет ацетильные группы от нейраминной кислоты. Гены, кодирующие НЕ-белки коронавируса, имеют гомологичные последовательности с генами, кодирующими гликопротеин гемагглютинин-эстераза-фьюжен (HEF) вируса гриппа С.

Геном SARS-CoV-2 кодирует 16 неструктурных белков (nsP1–nsP16) и 8 вспомогательных (accessory) белков, вовлечённых в биогенез новых вирусных частиц [25]. Среди них укажем РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), обеспечивающую репликацию вирусной РНК; две протеиназы – PLpro (papain-like cysteine protease) и 3CLpro/Mpro (chemotrypsin-like protease/main protease), отвечающие за аутолитическое расщепление вирусных полипротеинов на функциональные фрагменты.

ЭВОЛЮЦИЯ И ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ КОРОНАВИРУСОВ

Множественные выравнивания нуклеотидных последовательностей различных коронавируса показывают, что наиболее близкими родственными для вируса SARS-CoV-2 могут быть коронавирусы, инфицирующие летучую мышь. Однако заражение человека вирусом летучей мыши напрямую представляется маловероятным, поскольку его связывание с человеческим рецептором ACE2 малоэффективно [26]. Вопрос о промежуточном хозяине при зоонозном заносе нового коронавируса в человеческую популя-

цию по-прежнему остается спорным [27]. Некоторые филогенетические исследования указывают, что промежуточным хозяином могут быть панголины. Так, показано, что рецептор-связывающий мотив (RBM) шиповидного белка SARS-CoV-2 может быть получен путем рекомбинации с вирусом панголина [28, 29].

Беспрецедентный анализ более 200 000 последовательностей полных геномов SARS-CoV-2 показал, что среди множества мутаций «очищающего» отбора (purifying selection) встречаются несколько мутаций, которые можно объяснить давлением положительного отбора (positive selection). Это – замена 614G в шиповидном белке и несколько замен в нуклеокапсидном белке (в частности, 203K) [30]. Множественные замены в N-белке, по-видимому, важны для адаптации нового вируса SARS-CoV-2 к человеку [30].

Интересны биоинформатические данные анализа так называемой внутренней неупорядоченности (intrinsic disorder) в N- и M-белках у разных коронавируса [31]. Авторы показали, что SARS-CoV-2 располагает удивительно «жесткой» (состоящей из высокоупорядоченных белков) защитной оболочкой. По-видимому, из-за таких характеристик вирион вируса SARS-CoV-2 очень устойчив в слюне и других жидкостях организма и во внешней среде [31].

Жизненный цикл коронавируса начинается с входа вируса в клетку. Предполагают два возможных пути: (1) слияние вирусной оболочки с плазматической мембраной клетки (по-видимому, это основной путь); (2) эндоцитоз с последующим слиянием вирусной оболочки с мембраной эндосомы. В обоих случаях рецепторную функцию и функцию слияния мембран выполняет белок S.

У вируса гриппа за вход в клетку отвечает гемагглютинин, который, как и S-белок коронавируса, является гликопротеином типа I. Гемагглютинин связывается с белками и липидами клеточной поверхности, несущими сиаловые кислоты. Известно, что перестройка HA, необходимая для слияния мембран, запускается в эндолизосоме клетки при кислом значении pH. В отличие от вирусов гриппа у бетакоронавирусов слияние мембран происходит при физиологическом (нейтральном) значении pH. Соответственно, триггером дестабилизации и перестройки S-белка SARS-CoV-2 должны быть иные факторы. Отдельные этапы, инициирующие этот процесс, и гипотетический механизм дестабилизации будут рассмотрены ниже.

Репликация коронавирусной РНК происходит в специализированных структурах вблизи ядра, включающих везикулы с двойной мембра-

ной, в которых при помощи крио-ЭТ визуализованы нити двуспиральной РНК [9, 32]. В заражённой клетке детектированы два типа организации рибонуклеопротеидных комплексов (РНП): шарообразные структуры, сгруппированные гексагонально по типу «яйца в гнезде» (один шар в центре, шесть вокруг него), либо в виде пирамиды из четырех шаров [9]. Статистический анализ показал, что гексагональная и тетраэдральная упаковка соответствуют сферическим и эллипсоидным вирионам соответственно. Отдельные шаровидные структуры соединены между собой более тонкими нитевидными перемычками. Такой способ упаковки при сохранении высокой стерической гибкости позволяет включить необычайно большой геном коронавируса во внутренний объём вириона диаметром 80–100 нм [9, 32].

Синтез N-белка и растворимых неструктурных белков коронавирусов происходит в цитоплазме, а синтез мембранных белков — на мембранах эндоплазматического ретикула. Собранные в люменальных цистернах тримеры S-белка, по всей видимости, участвуют в организации сайтов баддинга в промежуточном компартменте эндоплазматического ретикула и аппарата Гольджи (ERGIC) [32]. Дочерние вирионы отпочковываются от цистерн ERGIC и далее попадают во внеклеточную среду путём экзоцитоза.

Распознавание рецепторов является первым этапом вирусной инфекции и ключевой детерминантой тропизма клеток и тканей хозяина. Основным рецептором для SARS-CoV-2, как и для близко родственного вируса SARS-CoV, является белок ACE2 (angiotensin converting enzyme 2); также в русскоязычной литературе используется термин АПФ2 (ангиотензинпревращающий фермент 2). АПФ2 — трансмембранный белок типа I, фермент дипептидилкарбокси-peптидаза (КФ:3.4.17.23), который содержит около 805 а.о. и включает один цинк-связывающий домен [33]. Полноразмерная молекула ACE2 включает N-концевой пептидазный домен и C-концевой коллектрино-подобный домен, содержащий α -спиральный ТМ-домен и СТ-домен (~40 а.о.).

Показано, что SARS-CoV-2 связывается с ACE2 с 10–20-кратной аффинностью по сравнению с SARS-CoV [11, 34]. Рецепторную функцию для коронавирусов выполняет пептидазный домен, но пептидазная активность для этого не нужна [33]. ACE2 преимущественно экспрессируется в лёгких, сердце, почках, яичках и желудочно-кишечном тракте. В лёгких молекулы ACE2 найдены в клетках альвеолярного эпителия типа II, они также присутствуют в

эпителии бронхов и экспрессируются в эндотелии сосудов. На основании доступной структурной информации было постулировано, что два аллеля ACE2 rs73635825 (S19P) и rs143936283 (E329G) могут придавать устойчивость к инфекции SARS-CoV-2 [35].

Физиологическая функция ACE2 заключается в преобразовании ангиотензина I в ангиотензин (1-9) и ангиотензина II в ангиотензин (1-7). Ангиотензин (1-9) связывается с рецептором Mas, что приводит к расширению сосудов и противовоспалительному эффекту. Это действие противоположно действию ACE, который превращает ангиотензин I в ангиотензин II. Ангиотензин II вызывает сужение сосудов и провоспалительные эффекты через рецептор ангиотензина II первого типа [33]. Можно предположить, что связывание вирусом молекул ACE2 будет сдвигать равновесие в сторону накопления ангиотензина II и, соответственно, сужения сосудов и развития воспалительных реакций. Данные процессы могут способствовать развитию тромбозов, хотя точный механизм образования тромбов в сосудах до сих пор неясен.

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ШИПОВИДНОГО БЕЛКА SARS-CoV-2

S-белок SARS-CoV-2 формирует гомотримеры по поверхности вирионов (рис. 2, *a–e*). Мономер содержит 1273 а.о. (UniProt ID P0DTC2). После протеолитического отщепления сигнального пептида (SP) белок включает две функциональные субъединицы, S1 (а.о. 13–685) и S2 (а.о. 686–1273).

Дистальная субъединица S1 способствует стабилизации префузионного (pre-fusion, «до слияния») состояния S2-субъединицы, заякоренной в мембрану вириона. В то время как S1 отвечает за рецепцию, S2 отвечает за слияние. Субъединица S1 содержит N-концевой домен (NTD) и C-концевой домен (CTD, он же рецептор-связывающий домен, RBD, а.о. 319–541). NTD имеет топологию галектинов человека — галактозосвязывающих лектинов [29]. RBD содержит две подобласти: основную структуру (5-цепочечный антипараллельный β -лист) и собственно RBM (а.о. 437–508), который определяет специфичность связывания. Показано, что мотив (Gly-Val-Glu-Gly) в составе RBM (а.о. 482–485) обеспечивает более эффективный контакт RBD-домена SARS-CoV-2 с ACE2 по сравнению с вирусом SARS-CoV [37].

Сайты активации S-белка клеточными протеазами. Для обеспечения функции входа в клетку S-белок должен быть активирован — расщеплён

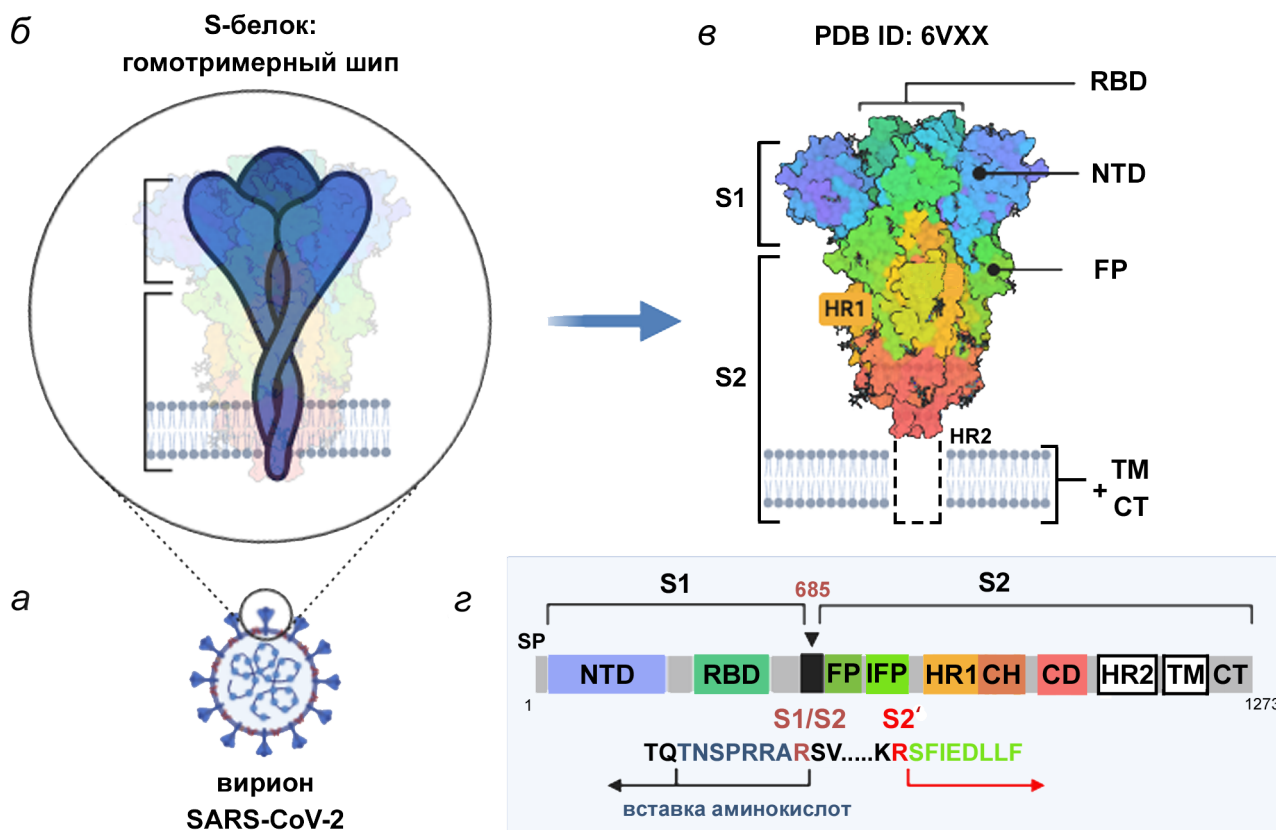


Рис. 2. Структура шиповидного белка S. а – Схема вириона с «шипами» S-белка; б – схема гомотримерного шипа, заколенного в мембрану вириона; в – 3D-структура шипа в «закрытой» конформации по данным крио-ЭМ (PDB ID 6VXX [12]); г – схема мономера S-белка с указанием функциональных доменов и сайтов протеолитической активации. S1 и S2 – субъединицы S-белка; S1/S2 – фуриновый сайт расщепления; SP – сигнальный пептид; NTD – N-концевой домен; RBD – рецептор-связывающий домен; FP – пептид слияния; IFP – «внутренний» пептид слияния, появляющийся после расщепления S2-субъединицы в сайте S2' [36]; HR1 и HR2 (Heptad Repeats 1 и 2) – специализированные повторы в аминокислотной последовательности; TM – трансмембранный домен; CT – цитоплазматический домен. Схема создана с использованием шаблона BioRender.com

протеазами на две субъединицы, S1 и S2, которые в случае коронавируса остаются нековалентно связанными. Наиболее заметная вариация, отличающая аминокислотную последовательность S-белка вируса SARS-CoV-2 от шиповидного белка его «предшественника» (коронавируса летучих мышей BetaCoV/RaTG13/2013), а также от вируса SARS-CoV, возникает из-за вставки дополнительных положительно заряженных аминокислотных остатков в сайт S1/S2 (рис. 2, г) [12, 29, 36]. Вместо одиночного остатка аргинина появляется сайт «(682)R-R-A-R(685)↓», удобный для распознавания фуриноподобными протеазами, локализованными в аппарате Гольджи клетки [12, 36]. Гидролиз фурином происходит в процессе биосинтеза белка в клетке, и, таким образом, дочерние вирионы SARS-CoV-2 получают пред-активированный S-белок (но часть молекул в составе вириона могут остаться нерасщепленными – неактивны-

ми, что видно по данным электрофоретического анализа, рис. 1, б). Это свойство значительно повышает патогенный потенциал вируса, который приобретает способность инфицировать разные типы клеток в организме, помимо эпителия верхних дыхательных путей, где присутствует много экстраклеточных трипсин-подобных протеаз.

Поскольку фурины в больших количествах экспрессируются в лёгких, оболочечные вирусы, инфицирующие дыхательные пути, могут успешно использовать эту конвертазу для активации своего поверхностного гликопротеина. Фуриновый сайт R-X-R/K-R ранее обнаружен между субъединицами HA1 и HA2 высокопатогенных штаммов вируса гриппа А птиц и человека подтипов H5 и H7 [38]. Полиосновные сайты протеолиза также найдены в поверхностных гликопротеинах некоторых вирусов семейства Paramyxoviridae, инфицирующих человека (ви-

рус кори, паротита, респираторный синцитиальный вирус (RSV), патогенного штамма вируса болезни Ньюкасла (NDV); вирусов Эболы и Марбург; вируса желтой лихорадки; HIV-1 и ряда опасных для человека вирусов из семейства Herpesviridae [38, 39].

У всех коронавирусов S-белок после связывания с рецептором ACE2 расщепляется на внутреннем участке S2', расположенном непосредственно перед последовательностью «S-F-I-E-D-L-L-F» – «внутренним» пептидом слияния [29, 36] (рис. 2, з). Расщепление в сайте S2' является сигналом для необратимых конформационных изменений S-белка, промотирующих процесс слияния мембран. Протеолитическое расщепление осуществляет главным образом сериновая мембранная протеиназа TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2). Помимо TMPRSS2, S-белок вируса SARS-CoV-2 может быть активирован и другими клеточными протеазами, в том числе катепсинами B и L (эндосомальными цистеиновыми протеазами), фурином, эластазой. Тем не менее считают, что только активность TMPRSS2 абсолютно необходима для распространения вируса SARS-CoV-2. Ранее была отмечена важная роль протеазы TMPRSS2 в патогенезе вируса гриппа А [40].

Посттрансляционные модификации. Поверхность гомотримерного шипа интенсивно гликозилирована [9, 11, 12, 41–43]. В молекуле S-белка SARS-CoV-2 картированы 22 сайта N-гликозилирования (66 сайтов в гомотримере), несущие протяжённые углеводные цепочки, и 2 сайта O-гликозилирования (T323/S325), которые оказались на 99% немодифицированными в природном белке [41, 42]. Состав сахаров в углеводных цепочках, связанных с N- и O-сайтами гликозилирования, определён с помощью масс-спектрометрического анализа (LC-MS/MS) [9, 43]. Он варьирует в зависимости от типа клеток, где выращивали вирус, а также может различаться у природного и рекомбинантного белков [9]. Разветвлённость цепочек оказалась даже более высокой, чем было предсказано первоначально [12]. Пять N-связанных гликанов экспонированы в среду даже в постфузионной конформации шипа, которая не играет значительную роль в «ускользании» вируса от иммунитета хозяина [44].

Помимо обильного гликозилирования, влияющего на антигенные характеристики, S-белок содержит липидную модификацию, которая вовлечена в процессы слияния мембран и сборки вирионов – пальмитоилирование (S-ацилирование) консервативных остатков цистеина остатками высших жирных кислот. Мономер S-белка вируса SARS-CoV-2 содержит кластер из

10 ацилированных остатков цистеина (30 остатков в гомотримере) в составе внутривирионного сегмента, включающего 39 а.о. [21] (рис. 3, а). Обнаружено, что остатки жирных кислот стабилизируют S-белок. Кроме того, они организуют домены со специфическим «рафтовым» составом липидов, богатым сфингомиелинами и холестеринном, уже в компартменте ERGIC, где происходит созревание дочерних вирионов. В незаражённой клетке этот компартмент не содержит высоких концентраций холестерина [21]. Замена остатков цистеина в СТ-доме на остатки аланина приводит к драматическому изменению характеристик S-белка и снижению инфекционности вирусных частиц [21]. Наиболее функционально значимыми оказались два остатка цистеина, ближайшие к липидной мембране. Предполагают, что их модификация облегчает навешивание остатков жирных кислот на удалённые от мембраны С-концевые остатки цистеина, поскольку её выполняет встроенный в мембрану фермент из семейства ZDHHC-ацилтрансфераз [21]. Эта липидная модификация характерна и для других коронавирусов (число сайтов S-ацилирования варьирует от 6 до 10). Есть данные о том, что модификация жирными кислотами необходима для формирования полноценных вирионов [21, 45, 46].

Ранее показано, что делеция всех трёх сайтов ацилирования НА вируса гриппа А подавляет репродукцию вируса, а удаление одного или двух сайтов, ближайших к С-концу молекулы, приводит к его аттенуации [48]. Нашей группой с помощью МАЛДИ-времяпролётной масс-спектрометрии было показано, что гемагглютинины трех типов вируса гриппа (А, В и С), а также гликопротеины ряда других оболочечных вирусов дифференциально S-ацилированы двумя типами высших жирных кислот: остаток стеарата (C18:0) может присоединяться только к остатку цистеина, расположенному на границе ТМ- и СТ-доменов, в то время как остатки цистеина в СТ-доме связывают исключительно остатки пальмитатов (C16:0) [49–52] (рис. 3, б). Сохраняется ли такая закономерность в случае S-белка коронавирусов, еще предстоит определить.

3D-структура «шипа» и его взаимодействие с рецептором ACE2. На конец марта 2021 г. в базе данных PDB представлено более ста PDB-entries 3D-структур S-белка SARS-CoV-2. Среди них – структуры водорастворимого эктодомена, свободного и в комплексе с рецептором ACE2; структуры полноразмерного рекомбинантного белка, а также структуры «шипов» на поверхности вирионов. Детектированы несколько вариантов 3D-структур префузионной конформа-

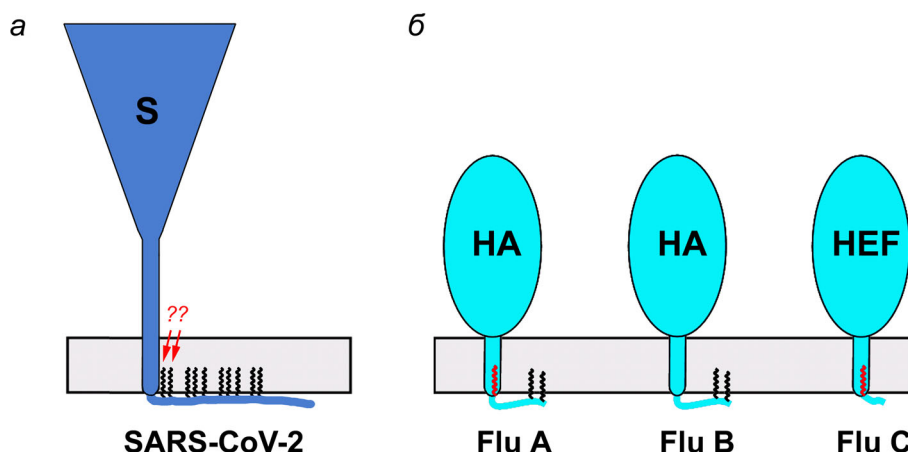


Рис. 3. Липидная модификация высшими жирными кислотами S-белка SARS-CoV-2 (а) и гемагглютининов вируса гриппа А, В и С (б). HA – гемагглютинин; HEF – гемагглютинин-эстераза-фьюжен. Остатки ковалентно связанных остатков жирных кислот изображены как черные (пальмитаты, C16:0) либо красные (стеараты, C18:0) зигзагообразные линии для одного мономера гомотримерного шипа. Стрелками указаны два остатка жирных кислот, которые гипотетически могут связывать стеараты. Соотношения размеров HA и S приблизительно соблюдены (высота шипа S ~25 нм [32]; высота шипа HA ~13,5 нм [47])

ции и одна постфузионная (post-fusion, «после слияния»). Для стабилизации префузионной структуры изолированного S-белка в S2-субъединицу после последовательности HR1 вводят два остатка пролина в позициях 986 и 987, удаляют полиосновный сайт расщепления фурином, а последовательности TM- и CT-доменов заменяют на искусственный домен (foldon, trimerization domain) [11, 53].

Ключевой особенностью 3D-структуры эктодомена S-белка в префузионной конформации является подвижность его RBD-домена, что даёт возможность переключаться между «закрытой» конформацией шипа (RBD в положении «лежа»), имеющей значение для ускользания от нейтрализующих антител [54], и «открытой» конформацией (один RBD в положении «стоя»), инициирующей связывание с молекулой ACE2, каскад перестроек S-белка и, в конечном итоге, слияние мембран. Разнообразие детектированных префузионных структур особенно велико в работе, в которой анализировали смесь эктодомена S-белка и водорастворимого фрагмента ACE2 [55]. Были описаны 9 различных конформаций гомотримерного шипа с RBD-доменами в разных положениях (до и после связывания с рецептором ACE2), в том числе представлен эктодомен S-белка с двумя открытыми/одним закрытым RBD, хотя доля таких структур была невысокой [55], а также детектирована S1-субъединица в комплексе с ACE2.

Предложена следующая гипотетическая схема взаимодействия гомотримерного шипа S-белка на поверхности вириона с клеточными рецепторами. Для инициации связывания хотя бы

один из RBD должен находиться в положении «стоя». Такой RBD может связаться с пептидазным доменом молекулы ACE2. Это связывание инициирует «открытие» RBD соседнего мономера, его связывание со вторым ACE2-рецептором, а затем третьего RBD с третьим рецептором. Последовательные стадии связывания RBD-доменов каждого из трех мономеров шипа S-белка с пептидазными доменами молекул ACE2 приводят в конечном итоге к «сбрасыванию» субъединиц S1, «раскрыванию» гомотримерного комплекса и экспозиции сайтов S2' в составе S2-субъединиц, до этого спрятанных в глубине шипа. Таким образом, появляется доступ для мембранной протеазы TMPRSS2, которая расщепляет полипептидную цепь по этому сайту [55] и, как результат, высвобождается «внутренний» пептид слияния (рис. 2, з).

Последующий структурный переход префузионной формы в постфузионную приводит к суперпозиции пептида слияния и TM-домена на одном конце длинной структуры, центрированной вокруг трехспирального пучка [44]. Подробно механизм слияния мембран при инфицировании клеток SARS-CoV-2 пока не изучен, но по аналогии с другими вирусами, использующими для входа в клетку фузионные белки I-типа, можно предположить, что при встраивании пептидов слияния в мембрану-мишень образуется мембранная пора, которая последовательно расширяется и пропускает вирусный нуклеокапсид в цитоплазму клетки [56].

Коррецепторы и антагонисты. Обнаружены и другие связывающие детерминанты для гликопротеина S на поверхности клетки, которые мо-

гут способствовать разработке эффективной противовирусной терапии. Показано, что S-белок вируса SARS-CoV-2 взаимодействует с гепарансульфатом посредством RBD, что способствует образованию «открытой» конформации шипа и, таким образом, усиливает его связывание с ACE2 [57]. Гепарансульфат можно позиционировать в качестве корцептора («host attachment factor»). Такой эффект не наблюдался в случае других коронавирусов человека – SARS-CoV-1 и MERS-CoV [57].

Антагонистом рецепции SARS-CoV-2 на клеточной мембране, как недавно было обнаружено, является незаменимая линолевая кислота (linoleic acid, C18:2) [58]. С помощью криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) показано, что RBD-домены акцептируют свободную линолевую кислоту в трех композитных связывающих карманах. Примечательно, что в S-белке, связавшем линолевую кислоту, RBM упорядочен и спрятан на границе раздела между тремя RBD-доменами, тогда как в ранее описанных крио-ЭМ-структурах, в том числе в комплексе S-белка с ACE2, он неупорядочен [11, 12]. Связывание линолевой кислоты стабилизирует «закрытую» конформацию S-белка, что приводит к снижению взаимодействия вируса с ре-

цептором ACE2 *in vitro* [58]. Интересно, что в клетках человека добавка линолевой кислоты синергирует с препаратом ремдесивир [58].

Топография шипов на поверхности вирионов. Формы шипов в конформациях до и после слияния существенно различаются, что облегчает их распознавание на поверхности вирионов даже при не очень высоком разрешении крио-ЭМ (рис. 4). В то время как в префузионном состоянии шип имеет форму «цепы» (flail, перевернутой пирамиды) (рис. 4, а), в постфузионном состоянии он более узкий и имеет форму иглы (рис. 4, б).

Вирионы несут в среднем 24 ± 9 тримеров S-белка [10] (по другим оценкам: ~ 40 тримеров [41] и $\sim 5-60$ тримеров [9]). Приблизительно 97% «шипов» на поверхности вирионов, фиксированных формалином (насыщенным раствором формальдегида, сшивающего белки), находились в конформации «пре-фьюжен», а 3% – в конформации «пост-фьюжен» [10]. Эти конформации не образовывали кластеры, а были распределены равномерно на поверхности вирионов. Интересно, что после концентрирования вирусных частиц по стандартному протоколу с применением ультрацентрифугирования на их поверхности детектировали шипы только в

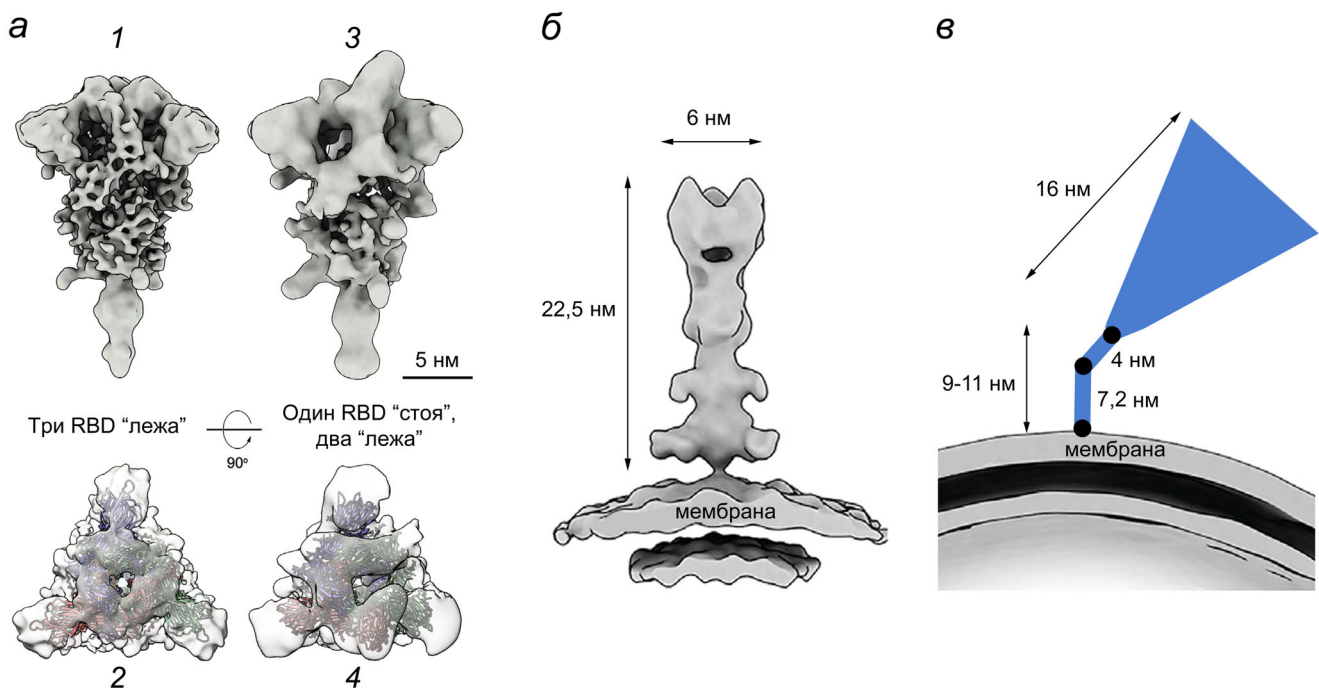


Рис. 4. Крио-ЭМ структуры гомотримерного шипа S-белка на поверхности вирионов SARS-CoV-2. а – Префузионная конформация: 1 и 2 – «закрытая» («цеп»; три RBD в положении «лежа»); 3 и 4 – «открытая» (один RBD в положении «стоя», два других – в положении «лежа»); показаны проекции сбоку (1, 3) и сверху (2, 4); б – постфузионная конформация («игла»); в – схематичное изображение наклоненного шипа за счёт шарниров в тонком стебле (черные кружки) [41]. Размеры и масштабный штрих указаны согласно опубликованным ранее работам [9, 16, 41]. Адаптировано с разрешения из статьи Yao et al. [9]. Авторское право Elsevier, 2020

закрытой префузионной конформации, но если содержащую вирус среду только осветляли при помощи низкоскоростного центрифугирования, то встречалась и закрытая, и открытая конформации [10]. Вероятно, хрупкая открытая конформация не выдерживает процедуры ультрацентрифугирования и разрушается.

При инактивации вирионов β -пропиолактоном, связывающим нуклеиновую кислоту вируса, ситуация кардинально отличалась от описанной выше: доля шипов в префузионной конформации составляла всего 24% против 76% в конформации «пост-фьюжен» [59]. Вирионы, несущие на своей поверхности большое количество шипов в постфузионной конформации, значительно ослаблены в плане возможности проникновения в клетку. Находясь в составе инактивированных вакцин, такие вирионы, скорее всего, будут инициировать выработку так называемых не-нейтрализующих, либо субнейтрализующих антител [60], не способных нейтрализовать живой вирус. При наихудшем сценарии такие антитела могут способствовать развитию феномена антителозависимого усиления инфекции (АЗУИ; в английской аббревиатуре – ADE, antibody dependent enhancement) при попадании нативного вируса в организм [59].

Крио-ЭТ-анализ показал, что большинство шипов S-белка находятся под углом к мембране вириона (в среднем угол составлял $\sim 50^\circ$ относительно нормали к поверхности; иногда достигал 90°) [10, 41] (рис. 4 в). Такие наклоны во всех направлениях могут обеспечиваться несколькими достаточно гибкими шарнирами в области длинного (9–11 нм) и тонкого стебля шипа [41]. Высокая подвижность шипа должна помогать вирусной частице «сканировать» поверхность клетки-хозяина для поиска наиболее «подходящих» участков для прикрепления. Для сравнения ножка шипа HA вируса гриппа гораздо короче (1,8–2 нм [47]). Подвижность шипа HA была отмечена ранее [61, 62], но она менее выражена по сравнению с шипом SARS-CoV-2.

Мутационная изменчивость S-белка. Возникновение новых генетических линий и вариантов вызывает наибольшее беспокойство, особенно при производстве вакцин, нацеленных на выработку иммунитета к определенной антигенной детерминанте S-белка. Так, мутация D614G, присутствующая во всех генетических линиях SARS-CoV-2 [63] и приводящая к исчезновению солевого мостика с остатком K854 [10], ведёт к увеличению скорости репродукции вируса и заразности (увеличению показателя R_0 – basic reproduction number) что, вероятно, и привело к возникновению пандемии [63–65]. Мутация N501Y в эпитопе S-белка

привела к возникновению новых генетических вариантов вируса с увеличенным сродством к ACE2. На момент написания обзора таких генетических вариантов (variants of concern), вызывающих серьезное беспокойство по поводу повышенной инфекционности и тяжести течения заболевания, зафиксировано несколько. Основные: (1) 202012/01 или 501Y.V1, так называемый «британский» вариант, на 50% более инфекционный; (2) 501Y.V2 – Южно-Африканский вариант, виновный в уменьшении эффективности вакцин; (3) 501Y.V3 – Бразильский вариант, имеющий профиль мутаций, близкий к Южно-Африканскому варианту. Генетическая линия B.1.351, к которой относится вариант 501Y.V2, помимо мутации N501Y, несёт также мутации E484K и K417N. Все три мутации расположены в RBD [66]; а N501Y и E484K – в области RBM и потенциально могут влиять на сродство вируса к ACE2-рецептору. Важной в контексте инфекционности вируса может быть мутация P681H линии B.1.1.7, непосредственно примыкающая к участку расщепления молекулы S-белка фурином (<https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>). Проводятся исследования для понимания взаимосвязи возникающих мутаций с эффективностью вакцин. В частности, показано, что группа мутаций E484K + N501Y + D614G не снижает существенно способность антител, продуцируемых в результате действия вакцины BTN162b2, нейтрализовать вирус [67].

Подробный трекер вновь появляющихся мутаций и генетических вариантов SARS-CoV-2, по результатам многочисленных данных, представлен на сайте «The NY Times» (<https://www.nytimes.com/interactive/2021/health/coronavirus-variant-tracker.html>), а также в глобальной базе филогенетических данных GISAID (www.gisaid.org). Анализ частоты быстроменяющихся вариантов позволяет сделать предположение, что вирус SARS-CoV-2 в недалёком будущем может приблизиться по разнообразию к сезонному гриппу, что не может не отразиться на стратегии производства вакцин в сторону преобладания поливалентных.

ПАТОГЕНЕЗ COVID-19

Развитие COVID-19 у инфицированного человека можно разделить на три стадии [68]. Стадия I характеризуется первичным связыванием вируса с ACE2-рецепторами клеток респираторного эпителия в верхних дыхательных путях,

участием протеазы TMPRSS2 в праймировании S-белка; на этой стадии вирус может быть обнаружен с помощью ПЦР-теста в назальных смывах; детектируется низкая вирусная нагрузка и слабый иммунный ответ. Стадия II характеризуется высвобождением провоспалительных цитокинов, интерферонов (IFN) β , γ , эпителиальными клетками. Во время стадии III отмечаются гипервоспаление, высокая вирусная нагрузка; вирус достигает альвеол в лёгких, наблюдается апоптоз эпителиальных клеток и в конечном итоге развивается острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) (acute respiratory distress syndrome, ARDS), который характеризуется системной дисфункцией органов [68]. Наблюдается снижение лимфоцитов в периферической крови – лимфопения [69].

Накопление фактических данных свидетельствует о том, что несбалансированная и неконтролируемая реакция врожденного иммунитета лежит в основе прогрессирования COVID-19. Эндотелий легочных капилляров после его активации начинает экспрессировать цитокины и молекулы сосудистой адгезии, которые могут усилить цитокиновый шторм и способствовать тромбозу сосудов. Среди провоспалительных цитокинов, гиперпродукция которых может привести к дисфункции эндотелия, следует упомянуть интерлейкин 6 (IL-6) и фактор некроза опухоли (TNF) [1]. IL-6 способствует повышению проницаемости сосудов и секреции провоспалительных цитокинов самими эндотелиальными клетками, тем самым усиливая высвобождение цитокинов [1].

В тяжёлых случаях COVID-19 массивная эндотелиальная дисфункция, обширная коагулопатия и тромбоз, вызванный системой комплемента, могут привести к развитию системной микроангиопатии и тромбозам; эти осложнения опасны для жизни и в конечном итоге могут привести к полиорганной недостаточности, включая миокардиты, сердечную недостаточность, отёки лёгочной ткани, гипоксию и поражения почек [1]. Нарушение функции почек связано со значительно повышенным риском смерти у тяжелобольных пациентов [1]. Протекающие COVID-19 с осложнениями могут способствовать таким заболеваниям, как диабет и хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ), при которой наблюдается повышенная экспрессия рецепторов ACE2 [68]. Факторами риска считают пожилую возраст и гиповитаминоз D [70]. Работы на мышах указывают на гормонально-модулированную повышенную экспрессию ACE2 у самцов [70], что может указывать на возможность более тяжёлого течения COVID-19 у мужчин.

Центральная парадигма иммунитета заключается в том, что опосредованные интерферонами противовирусные реакции предшествуют провоспалительным, оптимизируя защиту хозяина и сводя к минимуму коллатеральные повреждения [71]. По-видимому, для COVID-19 эта парадигма неприменима. Исследуя временные паттерны IFN и воспалительных цитокинов у 32 пациентов с COVID-19 средней и тяжёлой степени, госпитализированных по поводу пневмонии и наблюдаемых в связи с развитием дыхательной недостаточности, авторы обнаружили, что уровни IFN- λ и IFN типа I одновременно снижались, а их подъём откладывался и при этом индуцировался только у части пациентов, когда состояние больных становилось критическим. Напротив, провоспалительные цитокины, такие как TNF, IL-6 и IL-8, продуцировались раньше интерферонов у всех пациентов и сохранялись в течение длительного времени. Более высокие концентрации IFN- λ у пациентов с COVID-19 коррелировали с более низкой вирусной нагрузкой в бронхиальных аспиратах и более быстрым вирусным клиренсом. Для сравнения у 16 больных гриппом, госпитализированных по поводу пневмонии со сходными клинико-патологическими характеристиками, как у пациентов с COVID-19, и у 24 не госпитализированных пациентов, имеющих более лёгкие симптомы гриппа, IFN- λ и IFN I-типа были достоверно индуцированы ранее на более высоких уровнях и независимо от тяжести заболевания, в то время как провоспалительные цитокины вырабатывались только в острой стадии. Измененные цитокиновые паттерны у пациентов с COVID-19 коррелировали с более длительной госпитализацией и более высокой частотой тяжёлого заболевания и смертности по сравнению с гриппом. Эти данные указывают на разбалансированный противовирусный ответ у больных COVID-19, способствующий длительному присутствию вируса в организме, гипервоспалению и дыхательной недостаточности [72].

Целый спектр тяжёлых патологических состояний, таких как двусторонняя пневмония, поражения сердца и печени был ранее описан для вспышек заболевания гриппом A/H5N1 и A/H7N9 и во время пандемии A/H1N1 в 2009 году [14]. Новые данные указывают на то, что дисфункция эндотелия, индуцированная инфекцией SARS-CoV-2, отличается от воздействия вируса гриппа A/H1N1 пандемических штаммов 2009 года. В случае COVID-19 развивается пироптоз, приводящий к гибели эндотелиальных клеток и способствующий усилению провоспалительных стимулов и тромбогенных событий [73]. Очевидно, что клиническая кар-

тина тяжёлых форм гриппа отличается от развития тяжёлого COVID-19 (хотя прослеживаются некоторые параллели, такие, как запуск цитокинового шторма). При сезонном гриппе тяжёлых дисфункций иммунитета, как правило, не наблюдается.

Морфометрические исследования показали, что стенки лёгочных артерий у больных COVID-19 в два раза толще (а просвет сосудов, соответственно, тоньше), чем у больных пандемическим штаммом вируса гриппа H1N1 2009 года [74]. Появляются данные, что именно S-белок может запускать сигнальные каскады, разрушающе действующие на клетки [74], и способствовать развитию тяжёлого патологического состояния, называемого «гипертонией лёгочных артерий» (pulmonary arterial hypertension) [75]. Учитывая, что S-белок SARS-CoV-2 является основным антигенным компонентом вакцин, крайне важно, по мнению авторов, провести дальнейшие эксперименты для изучения его возможного воздействия на клетки лёгочных артерий и других тканей/органов, таких как системные сосуды, сердце и мозг [75].

ТЕРАПИЯ COVID-19

Потенциальные противовирусные препараты и терапевтические антитела. Противовирусные препараты, направленные на подавление других вирусных инфекций, гипотетически могут быть перепрофилированы для борьбы с COVID-19 [76, 77]. Ключевыми белковыми компонентами SARS-CoV-2, по отношению к которым были предприняты попытки подобрать противовирусный препарат, являются S-белок, РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp) и вирусная протеаза Mpro. Наиболее известен препарат ремдесивир (Remdesivir) – синтетический аналог аденозина, который связывается с RdRp, блокируя синтез вирусной РНК [78]. Препарат производства компании «Gilead Sciences» (США) не показал каких-либо заметных отклонений от плацебо при лечении болезни средней и тяжёлой степени [79], однако есть данные, подтверждающие, что применение ремдесивира способствует улучшению на ранних стадиях COVID-19; препарат разрешён для экстренного применения в 50 странах (<https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapeutic-management/>).

Препараты камистад мезилат (Camostat mesylate) [80] и нафамистад (Nafamostat) [81] ингибируют мембранную протеазу TMPRSS2. Сходный потенциал воздействия на протеазы имеют коммерчески доступные препараты талampiциллин, лурасидон, рубитек, лопразолам

(Talampicillin, Lurasidone, Rubitecan, Loprazolam) [82]; триазавирин (Triazavirin) обладает противовирусной активностью, подавляет Mpro [83–85]. Изучается воздействие на SARS-CoV-2 препаратов, заявленных как противовирусные (Favipiravir, Ivermectin, Ribavirin) [64]; другие средства, на которые ранее возлагались надежды (Lopinavir, Ritonavir, Hydroxychloroquine), в настоящий момент считаются неэффективными и ушли из рассмотрения.

Авторы ряда фундаментальных исследований предлагают перспективные противовирусные стратегии, которые пока позиционируются как идеи. Так, с целью подавления слияния вирусной и клеточной мембран предлагают использовать синтетический липопептид с аминокислотной последовательностью HR2-домена, который блокирует конформационную перестройку S-белка [86]; нокдаун ацилтрансферазы ZDHHC20, ацилирующей S-белок, должен уменьшать репродукцию вирусных частиц и их инфекционность [21]. Для ограничения инфекции назначают препараты интерферонов типа I; также с целью снижения возможных побочных эффектов от их прямого введения предложена стратегия активации так называемых интерферон-стимулируемых генов (interferon stimulated genes, ISGs), кодирующих, в частности, IFITM (IFN-induced transmembrane proteins) или CH25H (cholesterol 25-hydroxylase) [87].

Новые терапевтические возможности открывает факт ингибирования связывания S-белка с ACE2 экзогенным гепарином и его производными, не являющимися антикоагулянтами [57]. Антагонисты связывания вируса с гепарансульфатом на поверхности клетки предлагается использовать в комбинированной противовирусной терапии [57, 88, 89].

Нейтрализующие антитела были одними из первых противовирусных средств, использованных во время пандемии COVID-19 [12, 90, 91]. Моноклональные антитела, выделенные от выздоравливающего пациента, проявили нейтрализующие способности, блокируя контакт между RBD S-белка и клеточным рецептором ACE2 [91]. Недостатком терапии антителами может быть возникновение мутаций в RBD [92]. Использование взаимодополняющих антител, узнающих разные эпитопы RBD, повышает блокирующий эффект при клиническом применении и минимизирует ускользание вируса от иммунного ответа [91].

Купирование патогенетических процессов. Спустя год от начала пандемии можно констатировать, что большинство противовирусных препаратов пока не смогли улучшить клинические исходы при тяжёлом COVID-19; напротив,

терапевтические вмешательства, нацеленные на патологические реакции организма пациента, включающие гипериммунный ответ, активацию комплемента и системный тромбоз, оказались более перспективными [1]. Некоторые препараты используются в клинической практике в России.

Дексаметазон (Dexamethasone) – синтетический глюкокортикостероидный препарат, используемый для лечения ревматических заболеваний, ряда кожных заболеваний, тяжёлых аллергических состояний, астмы, ХОБЛ, отёка мозга, а также вместе с антибиотиками при туберкулезе [2, 64].

Артлегиа (Олокизумаб, Olokizumab) – препарат производства компании «Р-Фарма» (Россия), моноклональное антитело, непосредственно ингибирующее интерлейкин-6 (IL-6) и первоначально разработанное компанией «UCB Pharma» (Бельгия) для терапии ревматоидного артрита [93].

Противовоспалительные антитела в сочетании с молекулами антикоагулянтов используют для ограничения коагулопатий и разрушительной цитокиновой сигнализации, запускаемой SARS-CoV-2 [94].

ПРИНЦИПЫ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ

Вакцинопрофилактика на сегодняшний день является единственной мерой по сдерживанию распространения коронавирусной инфекции. По состоянию на февраль 2021 года в мире насчитывалось около 289 кандидатных вакцин против SARS-CoV-2, около 70 из которых находятся на той или иной стадии клинических испытаний (<https://www.who.int/teams/blueprint/covid-19>). В настоящий момент мы являемся свидетелями новой технологической революции вакцинопроизводства, которая распространяется по всему миру [95]. Среди разрешенных к применению вакцин против SARS-CoV-2 есть как традиционные инактивированные и рекомбинантные, так и инновационные, ранее не применявшиеся вакцины, основанные на доставке генетического материала, кодирующего целевой антиген [53]. Принцип использования ДНК или РНК в качестве вакцин копирует естественный процесс транскрипции, трансляции и экспрессии протеинов клетки.

Вакцины на основе РНК. За годы исследований по созданию эффективной РНК-вакцины были опробованы различные варианты РНК, сохраняющие при этом структуру из нескольких базовых элементов, которые также присутству-

ют во внутриклеточной мРНК: КЭП-структура (7-methyl guanosine); 5'-UTR; участок, кодирующий целевой белок (в случае COVID-19 – S-белок вируса SARS-CoV-2); 3'-UTR и участок полиаденирования. С момента попадания РНК-вакцины в клетки организма и до формирования иммунного ответа происходит множество сигнальных каскадов и событий, которые можно разделить на три типа, каждый из которых требует определенного подхода и решений по его успешной реализации: (1) доставка РНК в клетки и преодоление клеточного барьера, (2) индукция интерферонов или самоадьювантный эффект и (3) процессирование антигенов для систем комплекса гистосовместимости классов I и II (МНС-I и МНС-II).

На первом этапе прохождения мРНК через плазматическую мембрану основную роль играют системы защиты РНК от деградации РНКазами в межклеточном пространстве и кровотоке, а также эффективность самой доставки. РНК является отрицательно заряженным полианионом и не может пассивно диффундировать через мембрану. Для преодоления этого барьера необходим активный транспорт. Для его реализации предложена доставка в виде липоплекса – комплекса нуклеиновых кислот и липидов, попадающего в клетку путем эндоцитоза [96–100]. Липидные составы, которые были протестированы на доставку мРНК, обычно состоят из катионного или ионизируемого липида и липидов для стабилизации структуры, таких как фосфолипиды, холестерин или полиэтиленгликоль-липид (ПЭГ-липид). Катионные липиды обычно включают для обеспечения образования комплексов с отрицательно заряженными молекулами мРНК, и их можно разделить в соответствии с rK_a аминокислотной группы на липиды постоянного заряда, такие как DOTMA (1,2-ди-О-октедеценил-3-триметиламинопропан), DOTAP (1,2-диолеилокси-3-триметиламинопропан), DC-холестерин (холестерил-3-бета-карбоксамидоэтилен-N-диметиламин) и рН-зависимые ионизируемые липиды. Последние в условиях низкого значения рН имеют положительный заряд, что облегчает образование комплекса с молекулами РНК. В условиях физиологического рН заряд комплексов варьирует от нейтрального до умеренно катионного, что снижает их токсичность, препятствует неспецифическим взаимодействиям с белками сыворотки крови и продлевает время циркуляции в крови [101, 102].

Технология липофекции при внутрикожных инъекциях описана во множестве статей, в том числе с использованием мРНК против вирусов гриппа А/Н10N8 и А/Н7N9, для лечения диабе-

та II-го типа, против вируса Денге [103–105]. Основа этой технологии – получение липидных наночастиц размером 80–120 нм. Структура частиц липоплекса разнообразна и варьирует от ламеллярной до сферической и гексагональной, сохраняя при этом распределение нитей ДНК/РНК и бислоёв липидов (рис. 5). Пионером в производстве новой вакцины против вируса SARS-CoV-2 на основе мРНК является американская компания «Moderna», которая уже создавала прототипы мРНК-вакцин против вируса Zika [98, 106], вируса гриппа [107] и RSV [108]. Для создания липоплекса липиды растворяют в спирте в соответствующих молярных соотношениях и смешивают с РНК в буфере с низким значением pH (~4,0) с использованием миксера для микрофлюидики [98].

Основными мишенями при вакцинировании должны стать антиген-презентирующие клетки, например дендритные клетки (ДК), т.к. они являются связующим звеном между восприятием антигенов и выработкой Т-клеточного и В-клеточного иммунного ответа. Репрезентация антигенов дендритными клетками может происходить либо из цитоплазмы, что включает презентацию антигенных пептидов в молекулах главного комплекса гистосовместимости класса I, либо из лизосом, которые несут фрагменты антигенов, захваченных с помощью эндоцитоза, – презентация МНС класса II. МНС I- и II-классов затем распознаются рецепторами Т-клеток CD8⁺ или CD4⁺ соответственно.

Главным триггером в череде иммуномодулирующих эффектов РНК-вакцины после её попадания в клетку является индукция интерферонов или самоадьювантный эффект, который, в зависимости от последствий, может иметь двойственное значение. В целом острые реакции IFN типа I опосредуют плейотропные и воспалительные эффекты как при врождённом, так и при адаптивном иммунных ответах [110, 111]. Известно, что передача сигналов IFN типа I индуцирует созревание ДК, улучшает процессинг и презентацию антигена и усиливает миграцию ДК в зоны трансфицированных клеток [112], но также может привести к тяжёлым аутоиммунным последствиям, таким как системная красная волчанка и диабет I-го типа [113, 114]. Обход этой проблемы завязан на структуре мРНК, которая используется в качестве вакцины и является одним из ключевых элементов в балансе уровня экспрессии целевых протеинов и опосредованного IFN воспаления и аутоиммунной реакции.

Первой мРНК-вакциной против новой коронавирусной инфекции стала вакцина BNT162b2, разработанная немецкой компани-

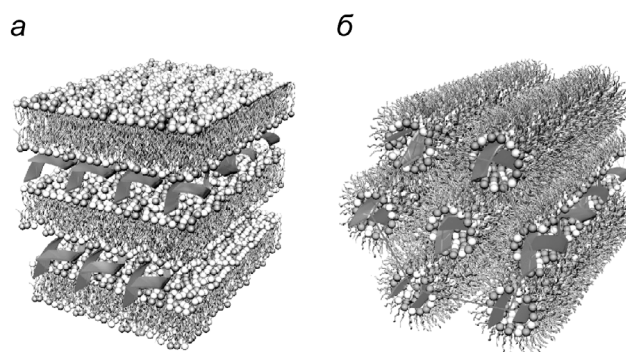


Рис. 5. Варианты структуры липоплекса. *а* – Многослойная ламеллярная структура; *б* – инвертированная гексагональная структура. Адаптировано с разрешением из обзора Ewert et al. [109]. Авторское право Taylor & Francis, 2005

ей «BioNTech» и американской компанией «Pfizer». По результатам клинических исследований, в которых приняло участие 43 998 пациентов, эффективность вакцины BNT162b2 составила около 95% («ClinicalTrials.gov/NCT04368728, Pfizer/BioNTech»). Второй мРНК-вакциной, разработанной компанией «Moderna» совместно с Национальным Институтом Здравоохранения НИИ, является вакцина mRNA-1273. По результатам фазы III клинических испытаний, в которой участвовало 28 207 пациентов, эффективность новой вакцины составила 94,5% («ClinicalTrials.gov/NCT04470427, Moderna»). Обе РНК-вакцины являются двухдозовыми, вводятся внутримышечно с промежутком 3–4 недели, температура транспортировки от –25 °C до –15 °C.

Вакцины на основе аденовирусов (Ad-vectored). С момента открытия возможности применения аденовирусов как генно-инженерного средства в начале 90-х годов прошлого столетия, модифицированные аденовирусы широко применяются при разработке эффективного способа внутриклеточной доставки генного материала и создании прототипов вакцин [115]. В геном аденовируса с помощью методов молекулярного клонирования встраивают участок ДНК, кодирующий целевой протеин, для выработки иммунного ответа (в случае COVID-19 – это S-белок вируса SARS-CoV-2). Для этих целей используют репликационно-дефектные модифицированные аденовирусы (векторы), основой которых являются наименее распространенные (rare species) или отсутствующие в человеческой популяции типы, например вирус человека Ad26 или вирусы приматов (chimpanzees or non-human primates), для обхода ранее приобретенного иммунитета к аденовирусам. При использовании аденовирусных векторов целевой протеин экспрессируется в клетках организма в

среднем две недели с пиком на второй–третий день, что вполне достаточно для выработки иммунного ответа [116].

Современные репликационно-дефектные аденовирусы могут размножаться только на специальном клеточном субстрате, в специальных клетках линий НЕК 293 или PER.C6 (packaging cell lines), которые несут всю 5'-концевую часть генома, включая E1, ITR, *цис*-действующие последовательности упаковки и последовательности белка IX. Существование аденовирусных векторов в виде молекулярных клонов в плазмидах позволяет манипулировать с конструкцией, а также наращивать их в клетках *Escherichia coli*, а использование в конструкции сильного цитомегаловирусного промотора позволяет достичь значительного уровня экспрессии целевых генов по сравнению с другими генно-инженерными способами внутриклеточной доставки кодирующего материала [117].

После попадания в клетку хозяина аденовирусная частица распаковывается, а ДНК вируса посредством транспорта по микротрубочкам попадает в ядро, где служит матрицей для самовоспроизведения. Поскольку жизненный цикл аденовируса дикого типа является внехромосомным, Ад-векторы, по умолчанию, воспринимаются как неинтегрирующие. Однако ряд модельных экспериментов на мышах показал возможность рекомбинации между вектором и хромосомной ДНК [118]. Это направление исследований должно быть продолжено для изучения долгосрочных эффектов и биобезопасности векторных вакцин.

Особое внимание исследователей приковано к иммунному ответу, приобретаемому к самой аденовирусной частице. Существуют многочисленные данные, подтверждающие значительное падение выработки антител на целевой белок при повторной иммунизации одним и тем же вектором [119]. Данное явление ставит серьезные препоны для аденовирусных векторов при разработке стратегии вакцинации, особенно в свете перспективы становления COVID-19 сезонным заболеванием с чередой сменяемости активно циркулирующих вариантов.

К моменту написания обзора в мире уже зарегистрировано и выпущено на рынок несколько вакцин на основе аденовирусной доставки генного материала. В основе двухдозовой вакцины «Спутник V», зарегистрированной в России как «Гам-КОВИД-Вак», лежит гетерологичный векторный подход к доставке целевого гена, кодирующего S-белок SARS-CoV-2, на основе двух типов аденовируса: Ad26 и Ad5. По результатам фазы III клинических испытаний вакцина показала эффективность 91,6% против

COVID-19, а также хорошую переносимость у более чем 16 500 участников клинических испытаний [120].

Компания «AstraZeneca» совместно с Оксфордским университетом разработала и выпустила на рынок вакцину AZD1222 на основе аденовирусного вектора шимпанзе ChAdOx1. По результатам фазы III расширенных клинических исследований вакцина эффективна на 79% против заражения SARS-CoV-2 и на 100% – против развития тяжёлых форм COVID-19 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04516746?term=NCT04516746&draw=2&rank=1>). Однодозовые вакцины разработаны и выпущены компанией «Janssen Biotech, Inc.» на базе вектора Ad26 с эффективностью от 61% до 72% (в зависимости от страны, где проводились клинические исследования) и компанией «CanSino Biologics» на базе аденовирусного вектора Ad5 с эффективностью 65,28%.

Инактивированные цельновирионные и расщепленные вакцины. Ещё одним типом вакцин против SARS-CoV-2, разработанных и одобренных региональными регуляторами, является инактивированная цельновирионная или (как усовершенствованный вариант) расщепленная вакцина, в которой инактивированные вирионы вируса дополнительно разрушаются детергентами, например Triton X-100. Несколько препаратов производства компаний «Sinopharm», «Sinovac» и ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН разрешены для иммунизации ограниченного контингента людей. Несмотря на незначительные различия в технологическом процессе, основное внимание при производстве данного типа вакцин должно быть уделено конформации S-белка в итоговом препарате в связи с инактивацией живого вируса β -пропиолактоном, о чём уже упомянуто выше. Так как неконтролируемое применение инактивирующих агентов может в конечном счёте привести к выработке не-нейтрализующих антител.

Пептидные вакцины. Первая синтетическая пептидная вакцина «ЭпиВакКорона» против нового коронавируса, которая представляет собой суспензию для внутримышечного введения, содержащую композицию химически синтезированных пептидных иммуногенов S-белка SARS-CoV-2, конъюгированных с белком-носителем и адсорбированных на гидроксиде алюминия, была представлена ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Первые данные об этой вакцине недавно были опубликованы [121]. В настоящее время проводятся I–II фазы клинических испытаний вакцины. Позиционируется, что вакцина «ЭпиВакКорона» на

основе пептидов имеет низкую реактогенность, является иммуногенным и безопасным продуктом. Дальнейшие исследования необходимы для оценки её эффективности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Год назад внезапно возникшая и стремительно развивающаяся пандемия COVID-19 породила много домыслов и слухов относительно патогенности нового коронавируса и его происхождения. В настоящий момент специалисты полагают, что вероятность появления SARS-CoV-2 в результате лабораторных манипуляций с родственным коронавирусом ничтожно мала [122]. Генетические данные неопровержимо показывают, что SARS-CoV-2 не является производным от какого-либо ранее использовавшегося вирусного остова. К такому же выводу склоняются эксперты ВОЗ, опубликовавшие 30 марта 2021 г. отчетный доклад о результатах расследования специальной комиссии в Китае (<https://www.who.int/publications/i/item/who-convended-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>). Основной гипотезой появления вспышки нового коронавирусного заболевания, лежавшей в основе пандемии, считают зооноз – перенос вируса от животного к человеку.

За истекший 2020 год накоплен огромный экспериментальный материал относительно шиповидного белка SARS-CoV-2. Разнообразие полученных 3D-структур позволяет выделить несколько ключевых особенностей S-белка, определяющих специфику патогенеза вируса: (1) «закрытая» префузионная конформация шипа может быть использована вирусом для ускользания от иммунитета; (2) высокое сродство связывания RBD в «открытой» конформации с рецептором ACE2 человека важно для эффективной рецепции на клеточной поверхности; (3) предварительная активация (прайминг) S-белка фуриноподобными протеазами позволяет вирусу распространяться по разным типам клеток. Эти знания заложили основу как для поиска антивирусных препаратов, так и для конструирования вакцин. Тем не менее очень многие аспекты, связанные с механизмами репликации вируса, его разрушительным патогенетическим действи-

ем на организм и возможностями терапии требуют дальнейшего изучения.

Пандемия COVID-19 внесла столько нового в сферу глобального здравоохранения, сколько никакая угроза до этого. Введены в практику новые типы вакцин, а само вакцинирование 7 миллиардов человек является до сих пор невиданным вызовом человечеству по координации совместных усилий. Один из ключевых вопросов на будущее заключается в том, насколько силен Т-клеточный иммунитет у переболевших COVID-19 и у вакцинированных пациентов. Данные о долгосрочных эффектах вакцинации пока находятся на стадии накопления. Однако ранние данные от пациентов, перенёсших новое коронавирусное заболевание, являются многообещающими. Они демонстрируют высокие показатели памяти как у CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клеток по отношению к нескольким белкам SARS-CoV-2, включая не только S-белок, но и нуклеопротеин и мембранный белок [123]. Дальнейший мониторинг выздоровевших пациентов должен дать представление о защитной способности иммунной памяти – гуморальной и клеточной. Имеет важное значение и понимание того, как формируется Т-клеточная память у пациентов, которые испытывают лёгкие симптомы COVID-19 по сравнению с тяжёлой болезнью.

Заканчивая обзор на позитивной ноте, хочется надеяться, что мутационная изменчивость в будущем приведёт к ослаблению нового коронавируса, и тогда по аналогии с гриппом вероятны регулярные сезонные вспышки коронавирусного заболевания с более лёгким течением, с которыми человечество сможет справляться без таких серьёзных потерь, какие сопровождали сезон 2020–2021.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-14-50441).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Perico, L., Benigni, A., Casiraghi, F., Ng, L. F. P., Renia, L., and Remuzzi, G. (2021) Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19, *Nat. Rev. Nephrol.*, **17**, 46-64, doi: 10.1038/s41581-020-00357-4.
2. Asselah, T., Durantel, D., Pasmant, E., Lau, G., and Schinazi, R. F. (2021) COVID-19: discovery, diagnostics and drug development, *J. Hepatol.*, **74**, 168-184, doi: 10.1016/j.jhep.2020.09.031.

3. Paget, J., Spreuwenberg, P., Charu, V., Taylor, R. J., Iuliano, A. D., et al. (2019) Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: new burden estimates and predictors from the GLaMOR Project, *J. Glob. Health*, **9**, 020421, doi: 10.7189/jogh.09.020421.
4. Dawood, F. S., Iuliano, A. D., Reed, C., Meltzer, M. I., Shay, D. K., et al. (2012) Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study, *Lancet Infect. Dis.*, **12**, 687-695, doi: 10.1016/S1473-3099(12)70121-4.
5. Cui, J., Li, F., and Shi, Z.-L. (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses, *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 181-192, doi: 10.1038/s41579-018-0118-9.
6. Petrosillo, N., Viceconte, G., Ergonul, O., Ippolito, G., and Petersen, E. (2020) COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? *Clin. Microbiol. Infect.*, **26**, 729-734, doi: 10.1016/j.cmi.2020.03.026.
7. Henderson, R., Edwards, R. J., Mansouri, K., Janowska, K., Stalls, V., et al. (2020) Controlling the SARS-CoV-2 spike glycoprotein conformation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 925-933, doi: 10.1038/s41594-020-0479-4.
8. Khan, M., Adil, S. F., Alkhatlan, H. Z., Tahir, M. N., Saif, S., et al. (2020) COVID-19: a global challenge with old history, epidemiology and progress so far, *Molecules*, **26**, 39, doi: 10.3390/molecules26010039.
9. Yao, H., Song, Y., Chen, Y., Wu, N., Xu, J., et al. (2020) Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus, *Cell*, **183**, 730-738.e13, doi: 10.1016/j.cell.2020.09.018.
10. Ke, Z., Otonari, J., Qu, K., Cortese, M., Zila, V., et al. (2020) Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions, *Nature*, **588**, 498-502, doi: 10.1038/s41586-020-2665-2.
11. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., et al. (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation, *Science*, **367**, 1260-1263, doi: 10.1126/science.abb2507.
12. Walls, A. C., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., and Veesler, D. (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein, *Cell*, **181**, 281-292.e6, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
13. Harris, A., Cardone, G., Winkler, D. C., Heymann, J. B., Brecher, M., et al. (2006) Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 19123-19127, doi: 10.1073/pnas.0607614103.
14. Jiang, C., Yao, X., Zhao, Y., Wu, J., Huang, P., et al. (2020) Comparative review of respiratory diseases caused by coronaviruses and influenza A viruses during epidemic season, *Microbes Infect.*, **22**, 236-244, doi: 10.1016/j.micinf.2020.05.005.
15. Zeng, R., Ruan, H. Q., Jiang, X. S., Zhou, H., Shi, L., et al. (2004) Proteomic analysis of SARS associated coronavirus using two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry and one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by mass spectrometric analysis, *J. Proteome Res.*, **3**, 549-555, doi: 10.1021/pr034111j.
16. Malik, Y. A. (2020) Properties of coronavirus and SARS-CoV-2, *Malays. J. Pathol.*, **42**, 3-11.
17. Mahtarin, R., Islam, S., Islam, Md. J., Ullah, M. O., Ali, M. A., and Halim, M. A. (2020) Structure and dynamics of membrane protein in SARS-CoV-2, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1-14, doi: 10.1080/07391102.2020.1861983.
18. Nal, B., Chan, C., Kien, F., Siu, L., Tse, J., et al. (2005) Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E, *J. Gen. Virol.*, **86**, 1423-1434, doi: 10.1099/vir.0.80671-0.
19. Neuman, B. W., Kiss, G., Kunding, A. H., Bhella, D., Baksh, M. F., et al. (2011) A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology, *J. Struct. Biol.*, **174**, 11-22, doi: 10.1016/j.jsb.2010.11.021.
20. Wang, J., Ji, J., Ye, J., Zhao, X., Wen, J., et al. (2003) The structure analysis and antigenicity study of the N protein of SARS-CoV, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **1**, 145-154, doi: 10.1016/s1672-0229(03)01018-0.
21. Mesquita, F. S., Abrami, L., Sergeeva, O., Turelli, P., Kunz, B., et al. (2021) S-acylation controls SARS-Cov-2 membrane lipid organization and enhances infectivity, *BioRxiv*, doi: 10.1101/2021.03.14.435299.
22. Lopez, L. A., Riffle, A. J., Pike, S. L., Gardner, D., and Hogue, B. G. (2008) Importance of conserved cysteine residues in the coronavirus envelope protein, *J. Virol.*, **82**, 3000-3010, doi: 10.1128/JVI.01914-07.
23. Boscarino, J. A., Logan, H. L., Lacny, J. J., and Gallagher, T. M. (2008) Envelope protein palmitoylations are crucial for murine coronavirus assembly, *J. Virol.*, **82**, 2989-2999, doi: 10.1128/JVI.01906-07.
24. Boson, B., Legros, V., Zhou, B., Siret, E., Mathieu, C., et al. (2021) The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100111, doi: 10.1074/jbc.RA120.016175.
25. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., and Thiel, V. (2021) Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2, *Nat. Rev. Microbiol.*, **19**, 155-170, doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.
26. Wrobel, A. G., Benton, D. J., Xu, P., Roustan, C., Martin, S. R., et al. (2020) SARS-CoV-2 and bat RaTG13 spike glycoprotein structures inform on virus evolution and furin-cleavage effects, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 763-767, doi: 10.1038/s41594-020-0468-7.
27. Luan, J., Lu, Y., Jin, X., and Zhang, L. (2020) Spike protein recognition of mammalian ACE2 predicts the host range and an optimized ACE2 for SARS-CoV-2 infection, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **526**, 165-169, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.047.
28. Li, X., Giorgi, E. E., Marichannegowda, M. H., Foley, B., et al. (2020) Emergence of SARS-CoV-2 through recombination and strong purifying selection, *Sci. Adv.*, **6**, eabb9153, doi: 10.1126/sciadv.abb9153.
29. Sun, J., He, W. T., Wang, L., Lai, A., Ji, X., et al. (2020) COVID-19: epidemiology, evolution, and cross-disciplinary perspectives, *Trends Mol. Med.*, **26**, 483-495, doi: 10.1016/j.molmed.2020.02.008.
30. Rochman, N. D., Wolf, Y. I., Faure, G., Mutz, P., Zhang, F., and Koonin, E. (2020) Ongoing global and regional adaptive evolution of SARS-CoV-2, *BioRxiv*, doi: 10.1101/2020.10.12.336644.
31. Goh, G. K. -M., Dunker, A. K., Foster, J. A., and Uversky, V. N. (2020) Shell disorder analysis predicts greater resilience of the SARS-CoV-2 (COVID-19) outside the body and in body fluids, *Microb. Pathog.*, **144**, 104177, doi: 10.1016/j.micpath.2020.104177.
32. Klein, S., Cortese, M., Winter, S. L., Wachsmuth-Melm, M., Neufeldt, C. J., et al. (2020) SARS-CoV-2 structure and replication characterized by *in situ* cryo-electron tomography, *Nat. Commun.*, **11**, 5885, doi: 10.1038/s41467-020-19619-7.
33. Pillay, T. S. (2020) Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein, *J. Clin. Pathol.*, **73**, 366-369, doi: 10.1136/jclinpath-2020-206658.

34. Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., et al. (2020) Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2, *Cell*, **181**, 894-904.e9, doi: 10.1016/j.cell.2020.03.045.
35. Hussain, M., Jabeen, N., Raza, F., Shabbir, S., Baig, A. A., Amanullah, A., and Aziz, B. (2020) Structural variations in human ACE2 may influence its binding with SARS-CoV-2 spike protein, *J. Med. Virol.*, **92**, 1580-1586, doi: 10.1002/jmv.25832.
36. Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G., and Decroly, E. (2020) The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade, *Antiviral Res.*, **176**, 104742, doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104742.
37. Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., et al. (2020) Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2, *Nature*, **581**, 221-224, doi: 10.1038/s41586-020-2179-y.
38. Steinhauer, D. A. (1999) Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus, *Virology*, **258**, 1-20, doi: 10.1006/viro.1999.9716.
39. Klenk, H.-D., and Garten, W. (1994) Host cell proteases controlling virus pathogenicity, *Trends Microbiol.*, **2**, 39-43, doi: 10.1016/0966-842x(94)90123-6.
40. Bertram, S., Glowacka, I., Steffen, I., Köhl, A., and Pöhlmann, S. (2010) Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin: proteolytic activation of influenza virus, *Rev. Med. Virol.*, **20**, 298-310, doi: 10.1002/rmv.657.
41. Turoňová, B., Sikora, M., Schürmann, C., Hagen, W. J. H., Welsch, S., et al. (2020) *In situ* structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges, *Science*, **370**, 203-208, doi: 10.1126/science.abd5223.
42. Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., and Crispin, M. (2020) Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike, *Science*, **369**, 330-333, doi: 10.1126/science.abb9983.
43. Shajahan, A., Supekar, N. T., Gleinich, A. S., and Azadi, P. (2020) Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2, *Glycobiology*, **30**, 981-988, doi: 10.1093/glycob/cwaa042.
44. Cai, Y., Zhang, J., Xiao, T., Peng, H., Sterling, S. M., et al. (2020) Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein, *Science*, **369**, 1586-1592, doi: 10.1126/science.abd4251.
45. Petit, C. M., Chouljenko, V. N., Iyer, A., Colgrove, R., Farzan, M., et al. (2007) Palmitoylation of the cysteine-rich endodomain of the SARS-coronavirus spike glycoprotein is important for spike-mediated cell fusion, *Virology*, **360**, 264-274, doi: 10.1016/j.virol.2006.10.034.
46. Veit, M. (2012) Palmitoylation of virus proteins, *Biol. Cell*, **104**, 493-515, doi: 10.1111/boc.201200006.
47. Serebryakova, M. V., Kordyukova, L. V., Semashko, T. A., Ksenofontov, A. L., Rudneva, I. A., et al. (2011) Influenza virus hemagglutinin spike neck architectures and interaction with model enzymes evaluated by MALDI-TOF mass spectrometry and bioinformatics tools, *Virus Res.*, **160**, 294-304, doi: 10.1016/j.virusres.2011.07.002.
48. Veit, M., Serebryakova, M. V., and Kordyukova, L. V. (2013) Palmitoylation of influenza virus proteins, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 50-55, doi: 10.1042/BST20120210.
49. Kordyukova, L. V., Serebryakova, M. V., Polyansky, A. A., Kropotkina, E. A., Alexeevski, A. V., et al. (2011) Linker and/or transmembrane regions of influenza A/group-1, A/group-2, and type B virus hemagglutinins are packed differently within trimers, *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 1843-1854, doi: 10.1016/j.bbamem.2011.03.005.
50. Kordyukova, L. V., Serebryakova, M. V., Baratova, L. A., and Veit, M. (2010) Site-specific attachment of palmitate or stearate to cytoplasmic versus transmembrane cysteines is a common feature of viral spike proteins, *Virology*, **398**, 49-56, doi: 10.1016/j.virol.2009.11.039.
51. Kordyukova, L. V., Serebryakova, M. V., Baratova, L. A., and Veit, M. (2008) S acylation of the hemagglutinin of influenza viruses: mass spectrometry reveals site-specific attachment of stearic acid to a transmembrane cysteine, *J. Virol.*, **82**, 9288-9292, doi: 10.1128/JVI.00704-08.
52. Serebryakova, M. V., Kordyukova, L. V., Baratova, L. A., and Markushin, S. G. (2006) Mass spectrometric sequencing and acylation character analysis of C-terminal anchoring segment from influenza A hemagglutinin, *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester)*, **12**, 51-62, doi: 10.1255/ejms.792.
53. Chakraborty, S., Mallajosyula, V., Tato, C. M., Tan, G. S., and Wang, T. T. (2021) SARS-CoV-2 vaccines in advanced clinical trials: where do we stand? *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **172**, 314-338, doi: 10.1016/j.addr.2021.01.014.
54. Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., et al. (2020) Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 11727-11734, doi: 10.1073/pnas.2003138117.
55. Benton, D. J., Wrobel, A. G., Xu, P., Roustan, C., Martin, S. R., et al. (2020) Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion, *Nature*, **588**, 327-330, doi: 10.1038/s41586-020-2772-0.
56. Chernomordik, L. V., and Kozlov, M. M. (2008) Mechanics of membrane fusion, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 675-683, doi: 10.1038/nsmb.1455.
57. Clausen, T. M., Sandoval, D. R., Spliid, C. B., Pihl, J., Perrett, H. R., et al. (2020) SARS-CoV-2 infection depends on cellular heparan sulfate and ACE2, *Cell*, **183**, 1043-1057. e15, doi: 10.1016/j.cell.2020.09.033.
58. Toelzer, C., Gupta, K., Yadav, S. K. N., Borucu, U., Davidson, A. D., et al. (2020) Free fatty acid binding pocket in the locked structure of SARS-CoV-2 spike protein, *Science*, **370**, 725-730, doi: 10.1126/science.abd3255.
59. Liu, C., Mendonça, L., Yang, Y., Gao, Y., Shen, C., et al. (2020) The architecture of inactivated SARS-CoV-2 with postfusion spikes revealed by Cryo-EM and Cryo-ET, *Structure*, **28**, 1218-1224.e4, doi: 10.1016/j.str.2020.10.001.
60. Wan, Y., Shang, J., Sun, S., Tai, W., Chen, J., et al. (2020) Molecular mechanism for antibody-dependent enhancement of coronavirus entry, *J. Virol.*, **94**, e02015-19, doi: 10.1128/JVI.02015-19.
61. Isin, B., Doruker, P., and Bahar, I. (2002) Functional motions of influenza virus hemagglutinin: a structure-based analytical approach, *Biophys. J.*, **82**, 569-581, doi: 10.1016/S0006-3495(02)75422-2.
62. Benton, D. J., Nans, A., Calder, L. J., Turner, J., Neu, U., et al. (2018) Influenza hemagglutinin membrane anchor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 10112-10117, doi: 10.1073/pnas.1810927115.
63. Plante, J. A., Liu, Y., Liu, J., Xia, H., Johnson, B. A., et al. (2021) Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness, *Nature*, **592**, 116-121, doi: 10.1038/s41586-020-2895-3.
64. Mishra, S. K., and Tripathi, T. (2020) One year update on the COVID-19 pandemic: where are we now? *Acta Trop.*, **214**, 105778, doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105778.
65. Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., et al. (2020) Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus, *Cell*, **182**, 812-827.e19, doi: 10.1016/j.cell.2020.06.043.
66. Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., et al. (2021) Detection of a SARS-CoV-2

- variant of concern in South Africa, *Nature*, **592**, 438-443, doi: 10.1038/s41586-021-03402-9.
67. Xie, X., Liu, Y., Liu, J., Zhang, X., Zou, J., Fontes-Garfias, C. R., et al. (2021) Neutralization of SARS-CoV-2 spike 69/70 deletion, E484K and N501Y variants by BNT162b2 vaccine-elicited sera, *Nat. Med.*, **27**, 620-621, doi: 10.1038/s41591-021-01270-4.
 68. Loganathan, S., Kuppusamy, M., Wankhar, W., Gurugubelli, K. R., Mahadevappa, V. H., et al. (2021) Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2): COVID 19 gate way to multiple organ failure syndromes, *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **283**, 103548, doi: 10.1016/j.resp.2020.103548.
 69. Lv, H., Wu, N. C., and Mok, C. K. P. (2020) COVID-19 vaccines: knowing the unknown, *Eur. J. Immunol.*, **50**, 939-943, doi: 10.1002/eji.202048663.
 70. La Vignera, S., Cannarella, R., Condorelli, R. A., Torre, F., Aversa, A., and Calogero, A. E. (2020) Sex-specific SARS-CoV-2 mortality: among hormone-modulated ACE2 expression, risk of venous thromboembolism and hypovitaminosis D, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2948, doi: 10.3390/ijms21082948.
 71. McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O'Garra, A. (2015) Type I interferons in infectious disease, *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 87-103, doi: 10.1038/nri3787.
 72. Galani, I.-E., Rovina, N., Lampropoulou, V., Triantafyllia, V., Manioudaki, M., et al. (2021) Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison, *Nat. Immunol.*, **22**, 32-40, doi: 10.1038/s41590-020-00840-x.
 73. Nagashima, S., Mendes, M. C., Camargo Martins, A. P., Borges, N. H., Godoy, T. M., et al. (2020) Endothelial dysfunction and thrombosis in patients with COVID-19 – brief report, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **40**, 2404-2407, doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314860.
 74. Suzuki, Y. J., Nikolaienko, S. I., Dibrova, V. A., Dibrova, Y. V., Vasylyk, V. M., et al. (2021) SARS-CoV-2 spike protein-mediated cell signaling in lung vascular cells, *Vascul. Pharmacol.*, **137**, 106823, doi: 10.1016/j.vph.2020.106823.
 75. Suresh, S. J., and Suzuki, Y. J. (2020) SARS-CoV-2 spike protein and lung vascular cells, *J. Respir.*, **1**, 40-48, doi: 10.3390/jor1010004.
 76. Zhirnov, O. P. (2020) Molecular targets in the chemotherapy of coronavirus infection, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 523-530, doi: 10.1134/S0006297920050016.
 77. Francés-Monerris, A., Hognon, C., Miclot, T., García-Iriepa, C., Iriepa, I., et al. (2020) Molecular basis of SARS-Cov-2 infection and rational design of potential antiviral agents: modeling and simulation approaches, *J. Proteome Res.*, **19**, 4291-4315, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00779.
 78. Gordon, C. J., Tchesnokov, E. P., Feng, J. Y., Porter, D. P., and Götte, M. (2020) The antiviral compound remdesivir potently inhibits RNA-dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus, *J. Biol. Chem.*, **295**, 4773-4779, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00779.
 79. Mahase, E. (2020) Covid-19: remdesivir probably reduces recovery time, but evidence is uncertain, panel finds, *BMJ*, **370**, m3049, doi: 10.1136/bmj.m3049.
 80. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., et al. (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor, *Cell*, **181**, 271-280.e8, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
 81. Hoffmann, M., Schroeder, S., Kleine-Weber, H., Müller, M. A., Drosten, C., and Pöhlmann, S. (2020) Nafamostat mesylate blocks activation of SARS-CoV-2: new treatment option for COVID-19, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **64**, e00754-20, doi: 10.1128/AAC.00754-20.
 82. Elmezayen, A. D., Al-Obaidi, A., Şahin, A. T., and Yelekçi, K. (2020) Drug repurposing for coronavirus (COVID-19): *in silico* screening of known drugs against coronavirus 3CL hydrolase and protease enzymes, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **39**, 2980-2992, doi: 10.1080/07391102.2020.1758791.
 83. Loginova, S. Ya., Borisevich, S. V., Rusinov, V. L., Ulomskii, U. N., Charushin, V. N., and Chupakhin, O. N. (2014) Investigation of Triazaverin antiviral activity against tick-borne encephalitis pathogen in cell culture, *Antibiot. Khimioter.*, **59**, 3-5.
 84. Shahab, S., and Sheikhi, M. (2020) Triazavirin – potential inhibitor for 2019-nCoV Coronavirus M protease: a DFT study, *Curr. Mol. Med.*, doi: 10.2174/1566524020666200521075848.
 85. Wu, X., Yu, K., Wang, Y., Xu, W., Ma, H., et al. (2020) Efficacy and safety of triazavirin therapy for Coronavirus disease 2019: a pilot randomized controlled trial, *Engineering (Beijing)*, **6**, 1185-1191, doi: 10.1016/j.eng.2020.08.011.
 86. Outlaw, V. K., Bovier, F. T., Mears, M. C., Cajimat, M. N., Zhu, Y., et al. (2020) Inhibition of coronavirus entry *in vitro* and *ex vivo* by a lipid-conjugated peptide derived from the SARS-Cov-2 spike glycoprotein hrc domain, *mBio*, **11**, e01935-20, doi: 10.1128/mBio.01935-20.
 87. Zang, R., Case, J. B., Yutuc, E., Ma, X., Shen, S., et al. (2020) Cholesterol 25-hydroxylase suppresses SARS-CoV-2 replication by blocking membrane fusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 32105-32113, doi: 10.1073/pnas.2012197117.
 88. Wu, D., Koganti, R., Lambe, U. P., Yadavalli, T., Nandi, S. S., and Shukla, D. (2020) Vaccines and therapies in development for SARS-CoV-2 infections, *J. Clin. Med.*, **9**, 1885, doi: 10.3390/jcm9061885.
 89. Hu, Y., Meng, X., Zhang, F., Xiang, Y., and Wang, J. (2021) The *in vitro* antiviral activity of lactoferrin against common human coronaviruses and SARS-CoV-2 is mediated by targeting the heparan sulfate co-receptor, *Emerg. Microbes Infect.*, **10**, 317-330, doi: 10.1080/22221751.2021.1888660.
 90. Pinto, D., Park, Y. J., Beltramello, M., Walls, A. C., Tortorici, M. A., et al. (2020) Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody, *Nature*, **583**, 290-295, doi: 10.1038/s41586-020-2349-y.
 91. Wu, Y., Wang, F., Shen, C., Peng, W., Li, D., et al. (2020) A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2, *Science*, **368**, 1274-1278, doi: 10.1126/science.abc2241.
 92. Widera, M., Wilhelm, A., Hoehl, S., Pallas, C., Kohmer, N., et al. (2021) Bamlanivimab does not neutralize two SARS-CoV-2 variants carrying E484K *in vitro*, *MedRxiv*, doi: 10.1101/2021.02.24.21252372.
 93. Kretsos, K., Golor, G., Jullion, A., Hickling, M., McCabe, S., et al. (2014) Safety and pharmacokinetics of olokizumab, an anti-IL-6 monoclonal antibody, administered to healthy male volunteers: a randomized phase I study, *Clin. Pharmacol. Drug Dev.*, **3**, 388-395, doi: 10.1002/cpdd.121.
 94. Mercurio, I., Tragni, V., Busto, F., De Grassi, A., and Pierri, C. L. (2021) Protein structure analysis of the interactions between SARS-CoV-2 spike protein and the human ACE2 receptor: from conformational changes to novel neutralizing antibodies, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 1501-1522, doi: 10.1007/s00018-020-03580-1.

95. Verbeke, R., Lentacker, I., De Smedt, S. C., and Dewitte, H. (2019) Three decades of messenger RNA vaccine development, *Nano Today*, **28**, 100766, doi: 10.1016/j.nantod.2019.100766.
96. Inoh, Y., Nagai, M., Matsushita, K., Nakanishi, M., and Furuno, T. (2017) Gene transfection efficiency into dendritic cells is influenced by the size of cationic liposomes/DNA complexes, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **102**, 230-236, doi: 10.1016/j.ejps.2017.03.023.
97. Patel, S., Ashwanikumar, N., Robinson, E., DuRoss, A., Sun, C., et al. (2017) Boosting intracellular delivery of lipid nanoparticle-encapsulated mRNA, *Nano Lett.*, **17**, 5711-5718, doi: 10.1021/acs.nanolett.7b02664.
98. Hassett, K. J., Benenato, K. E., Jacquinet, E., Lee, A., Woods, A., et al. (2019) Optimization of lipid nanoparticles for intramuscular administration of mRNA vaccines, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **15**, 1-11, doi: 10.1016/j.omtn.2019.01.013.
99. Koloskova, O. O., Nikonova, A. A., Budanova, U. A., Shilovskiy, I. P., Kofiadi, I. A., et al. (2016) Synthesis and evaluation of novel lipopeptide as a vehicle for efficient gene delivery and gene silencing, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **102**, 159-167, doi: 10.1016/j.ejpb.2016.03.014.
100. Loseva, A. A., Budanova, U. A., and Sobyakin, Yu. L. (2019) Synthesis of new guanidine-containing amphiphiles and their pyrene analogue for liposomal delivery system and visualization in target cells, *Russ. J. Org. Chem.*, **55**, 1826-1831, doi: 10.1134/S1070428019120030.
101. Rietwyk, S., and Peer, D. (2017) Next-generation lipids in RNA interference therapeutics, *ACS Nano*, **11**, 7572-7586, doi: 10.1021/acs.nano.7b04734.
102. Basha, G., Novobrantseva, T. I., Rosin, N., Tam, Y. Y., Hafez, I. M., et al. (2011) Influence of cationic lipid composition on gene silencing properties of lipid nanoparticle formulations of siRNA in antigen-presenting cells, *Mol. Ther.*, **19**, 2186-2200, doi: 10.1038/mt.2011.190.
103. Feldman, R. A., Fuhr, R., Smolenov, I., Ribeiro, A., Panther, L., et al. (2019) mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1 randomized clinical trials, *Vaccine*, **37**, 3326-3334, doi: 10.1016/j.vaccine.2019.04.074.
104. Gan, L.-M., Lagerström-Fermér, M., Carlsson, L. G., Arfvidsson, C., Egnell, A. C., et al. (2019) Intradermal delivery of modified mRNA encoding VEGF-A in patients with type 2 diabetes, *Nat. Commun.*, **10**, 871, doi: 10.1038/s41467-019-08852-4.
105. Roth, C., Cantaert, T., Colas, C., Prot, M., Casadémont, I., et al. (2019) A modified mRNA vaccine targeting immunodominant NS epitopes protects against dengue virus infection in HLA class I transgenic mice, *Front. Immunol.*, **10**, 1424, doi: 10.3389/fimmu.2019.01424.
106. Jagger, B. W., Dowd, K. A., Chen, R. E., Desai, P., Foreman, B., et al. (2019) Protective efficacy of nucleic acid vaccines against transmission of zika virus during pregnancy in mice, *J. Infect. Dis.*, **220**, 1577-1588, doi: 10.1093/infdis/jiz338.
107. Liang, F., Lindgren, G., Lin, A., Thompson, E. A., Ols, S., et al. (2017) Efficient targeting and activation of antigen-presenting cells *in vivo* after modified mRNA vaccine administration in rhesus macaques, *Mol. Ther.*, **25**, 2635-2647, doi: 10.1016/j.ymthe.2017.08.006.
108. Espeseth, A. S., Cejas, P. J., Citron, M. P., Wang, D., DiStefano, D. J., et al. (2020) Modified mRNA/lipid nanoparticle-based vaccines expressing respiratory syncytial virus F protein variants are immunogenic and protective in rodent models of RSV infection, *NPJ Vaccines*, **5**, 16, doi: 10.1038/s41541-020-0163-z.
109. Ewert, K., Ahmad, A., Evans, H. M., and Safinya, C. R. (2005) Cationic lipid-DNA complexes for non-viral gene therapy: relating supramolecular structures to cellular pathways, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **5**, 33-53, doi: 10.1517/14712598.5.1.33.
110. Hervás-Stubbs, S., Perez-Gracia, J. L., Rouzaut, A., Sanmamed, M. F., Le Bon, A., and Melero, I. (2011) Direct effects of type I interferons on cells of the immune system, *Clin. Cancer Res.*, **17**, 2619-2627, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1114.
111. Crouse, J., Kalinke, U., and Oxenius, A. (2015) Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons, *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 231-242, doi: 10.1038/nri3806.
112. Longhi, M. P., Trumpfheller, C., Idoyaga, J., Caskey, M., Matos, I., et al. (2009) Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant, *J. Exp. Med.*, **206**, 1589-1602, doi: 10.1084/jem.20090247.
113. Domeier, P. P., Chodisetti, S. B., Schell, S. L., Kawasawa, Y. I., Fasnacht, M. J., et al. (2018) B-cell-intrinsic type I interferon signaling is crucial for loss of tolerance and the development of autoreactive B cells, *Cell Rep.*, **24**, 406-418, doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.046.
114. Marro, B. S., Legrain, S., Ware, B. C., and Oldstone, M. B. A. (2019) Macrophage IFN-I signaling promotes autoreactive T cell infiltration into islets in type 1 diabetes model, *JCI Insight*, **4**, e125067, doi: 10.1172/jci.insight.125067.
115. Tatsis, N., and Ertl, H. C. J. (2004) Adenoviruses as vaccine vectors, *Mol. Ther.*, **10**, 616-629, doi: 10.1016/j.ymthe.2004.07.013.
116. Bilbao, G., Contreras, J. L., Zhang, H. G., Pike, M. J., Overturf, K., et al. (1999) Adenovirus-mediated gene expression *in vivo* is enhanced by the antiapoptotic bcl-2 gene, *J. Virol.*, **73**, 6992-7000, doi: 10.1128/JVI.73.8.6992-7000.1999.
117. Xiang, Z. Q., Yang, Y., Wilson, J. M., and Ertl, H. C. J. (1996) A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier, *Virology*, **219**, 220-227, doi: 10.1006/viro.1996.0239.
118. Stephen, S. L., Montini, E., Sivanandam, V. G., Al-Dhalimy, M., Kestler, H. A., et al. (2010) Chromosomal integration of adenoviral vector DNA *in vivo*, *J. Virol.*, **84**, 9987-9994, doi: 10.1128/JVI.00751-10.
119. Crystal, R. G. (2014) Adenovirus: the first effective *in vivo* gene delivery vector, *Hum. Gene Ther.*, **25**, 3-11, doi: 10.1089/hum.2013.2527.
120. Logunov, D. Y., Dolzhikova, I. V., Shcheblyakov, D. V., Tukhvatulin, A. I., Zubkova, O. V., et al. (2021) Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia, *Lancet*, **397**, 671-681, doi: 10.1016/S0140-6736(21)00234-8.
121. Ryzhikov, A. B., (2021) A single blind, placebo-controlled randomized study of the safety, reactogenicity and immunogenicity of the "EpiVacCorona" vaccine for the prevention of COVID-19, in volunteers aged 18-60 years (phase I-II), *Russ. J. Infect. Immunity*, **11**, 283-296, doi: 10.15789/2220-7619-ASB-1699.
122. Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., and Garry, R. F. (2020) The proximal origin of SARS-CoV-2, *Nat. Med.*, **26**, 450-452, doi: 10.1038/s41591-020-0820-9.
123. Chen, Z., and John Wherry, E. (2020) T cell responses in patients with COVID-19, *Nat. Rev. Immunol.*, **20**, 529-536, doi: 10.1038/s41577-020-0402-6.

COVID-19: MYTHS AND REALITY**Review****L. V. Kordyukova^{1*} and A. V. Shanko^{2,3}**

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

² *FORT LLC, R&D Department, 119435 Moscow, Russia*

³ *Ivanovsky Institute of Virology, N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, 123098 Moscow, Russia*

COVID-19, a new human respiratory disease that has killed nearly 3 million people over a year since the start of the pandemic, is a global public health challenge. Its infectious agent, SARS-CoV-2, has several significant structural differences from other coronaviruses which make it more pathogenic and transmissible. In this review, we discuss some important characteristics of the main surface antigen of SARS-CoV-2, the spike (S) protein, such as (1) the ability of the receptor-binding domain (RBD) switching between a standing up position (“open” pre-fusion conformation) for receptor binding and a lying-down position (“closed” pre-fusion conformation) for immune evasion; (2) taking advantage of the high binding affinity of RBD in an open conformation with the human ACE2 receptor for efficient cell entry; (3) priming of S protein by intra-cellular furin-like proteases to spread the virus across different cell types. We describe an interaction between S protein and cellular receptors, co-receptors and antagonists as well as a hypothetical mechanism of destabilization of the homotrimeric spike structure that triggers the fusion of the viral envelope with the cell membrane at physiological pH and mediates the entry of viral nucleocapsid into the cytoplasm. The observed transition of pre-fusion conformation of S protein to post-fusion on the surface of virions after their treatment with some reagents such as β -propiolactone is crucial, especially in relation to vaccine production. We also compare a few peculiarities of COVID-19 as well as S-protein of SARS-CoV-2 with those of outbreaks of severe Influenza disease caused by highly pathogenic influenza A virus strains of H5 and H7 subtypes and structural features of hemagglutinins of those viruses. In conclusion we touch on promising and rolled-out COVID-19 anti-viral and pathogenetic therapeutics, some recently approved conventional and innovative COVID-19 vaccines, and their molecular and immunological features.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, S-protein, structure, influenza virus, hemagglutinin, vaccines

УДК 577.21

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА И РНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА Lsm-БЕЛКА ИЗ *Halobacterium salinarum*

© 2021 М.С. Фандо, А.О. Михайлина, Н.В. Леконцева,
С.В. Тищенко, А.Д. Никулин*

Институт белка Российской академии наук, 142290 Пущино,
Московская обл., Россия; электронная почта: nikulin@vega.protres.ru

Поступила в редакцию 09.03.2021

После доработки 13.04.2021

Принята к публикации 13.04.2021

В настоящей работе определена структура и исследованы РНК-связывающие свойства Lsm-белка археи *Halobacterium salinarum*, отличительной особенностью которого является короткая петля L4, соединяющая тяжи $\beta 3$ и $\beta 4$. Поскольку бактериальные белки семейства Lsm, называемые Hfq, имеют короткую петлю L4 и образуют гексамеры, тогда как Lsm-белки архей, SmAP, имеют длинную петлю L4 и образуют гептамеры, было высказано предположение, что длина петли L4 может влиять на четвертичную структуру белков. Более того, петля L4 прикрывает область SmAP, соответствующую одному из сайтов связывания РНК в белках Hfq и, таким образом, может влиять на РНК-связывающие свойства белка. Наши результаты показывают, что SmAP из *H. salinarum* формирует гептамеры и обладает теми же РНК-связывающими свойствами, что и гомологичные белки с длинной петлей L4. Следовательно, длина L4 не влияет на количество мономеров в Lsm-белках и на их РНК-связывающие свойства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Lsm-белки, SmAP, четвертичная структура белков, РНК-связывающие свойства белков, малые регуляторные РНК, мРНК, *Halobacterium salinarum*.

DOI: 10.31857/S0320972521070034

ВВЕДЕНИЕ

Белки архей SmAP (Sm Archaeal Protein) относятся к семейству Lsm (Sm-like) белков, представители которого имеют характерную пространственную структуру пятитяжевого β -листа с N-концевой α -спиралью [1–3]. Тяжи $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 3$ составляют структурный мотив Sm1, а тяжи $\beta 4$ и $\beta 5$ – мотив Sm2. Эти участки белка соединены петлей L4, длина которой варьирует в Lsm-белках из разных организмов [4]. Lsm-белки формируют четвертичную структуру в виде тороидальных колец, как правило, из 6 или 7 мономеров. Бактериальные Lsm-белки, называемые Hfq, образуют стабильные в растворе гомогексамеры [5]. Эукариотические Lsm-белки характеризуются наличием ряда парало-гов в различных клетках организма; они формируют гетерологичные гептамеры (Lsm1–7 и Lsm2–8) [6–8]. В то же время Sm-белки эукариот организмов формируют гетерогептамеры только в

присутствии специфически связываемых малых ядерных РНК и выполняют роль каркасных белков малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП) [2, 9, 10]. Архейные белки семейства Lsm имеют от одного до трех парало-гов (SmAP1, SmAP2, SmAP3) в зависимости от организма и существуют в виде гомологичных гептамеров, независимо от присутствия РНК [2]. Тем не менее существуют примеры архейных белков, которые имеют другую степень олигомеризации, например, SmAP-белок из *Methanococcus (Methanocaldococcus) jannaschii* формирует гомогексамер и описывается как Hfq-подобный белок [11, 12], а SmAP2 из *Archaeoglobus fulgidus* (AF-Sm2) может формировать как гексамеры, так и гептамеры в зависимости от присутствия РНК и pH среды [13]. Полагают, что зависимость структуры от кислотности среды обусловлена изменением зарядов контактирующих в межмономерном пространстве аминокислотных остатков глутаминовой кислоты (Glu) [14]. Несмотря на значительный объем накопленных экспериментальных данных о природе Lsm-белков, механизм формирования четвертичной структуры с различным числом мономеров до сих пор не установлен. На основании сравнения первичных и четвертичных структур Lsm-бел-

Принятые сокращения: ДСН – додецилсульфат натрия; ДТТ – дитиотреитол; ПААГ – полиакриламидный гель; Mant-AMP – 2'/3'-(N-метил-антраилоил)-аденозин-5'-монофосфат; Mant-GMP – 2'/3'-(N-метил-антраилоил)-гуанозин-5'-монофосфат.

* Адресат для корреспонденции.

ков из бактерий и архей/эукариот была выдвинута гипотеза о взаимосвязи длины петли L4 и степени олигомеризации Lsm-белков [4], однако ограниченность структурных данных касательно белков с различной длиной петли не позволяла подтвердить или опровергнуть её. Установление гексамерной структуры Hfq-подобного SmAP-белка из археи *M. jannaschii* с короткой петлей L4 вновь заставило исследователей задуматься о влиянии этой петли на олигомеризацию белка. Следует, однако, учитывать, что аминокислотная последовательность этого белка ближе к гексамерным белкам Hfq, поэтому указанный пример не может служить основанием для оценки выдвинутой гипотезы. Для прояснения этого вопроса в представленной работе нами определена и проанализирована структура SmAP-белка из галофильной археи *Halobacterium salinarum*, в котором петля L4 является короткой и составляет всего 3 аминокислотных остатка (а.о.).

Недавно нами была продемонстрирована высокая специфичность ряда SmAP-белков к уридинмонофосфату (UMP) и олиго(U)-РНК при низком сродстве этих белков к другим рибонуклеотидам [15]. Сравнение структур белков SmAP и их бактериальных гомологов Hfq в комбинации с биохимическими данными позволило предположить, что белки SmAP имеют только один, универсально консервативный уридин-специфический сайт, характерный для всего семейства Lsm. Это значительно отличает белки SmAP от бактериальных белков Hfq, у которых существенную роль в функционировании играет второй, аденин-специфический РНК-связывающий сайт. В SmAP-белках этот регион прикрыт от внешних контактов протяжённой петлей L4, к тому же, структура соответствующего участка в архейных белках значительно отличается от бактериальных. В белке SmAP из *H. salinarum* петля L4 имеет минимальную длину и не мешает доступу к участку, соответствующему аденин-связывающему сайту белка Hfq. Измерение сродства такого SmAP-белка к олиго(A)-РНК позволит оценить влияние длины петли L4 на функциональность этого участка белка. Таким образом, определение структуры и измерение РНК-связывающих свойств белка SmAP из *H. salinarum* позволит оценить влияние петли L4 на структуру и функцию архейных белков семейства Lsm.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование генов белка SmAP из *H. salinarum*. В базе данных NCBI имеется информа-

ция об аминокислотной последовательности белка SmAP из *H. salinarum* длиной 60 а.о. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/167727293>), а в БД UniProt – протяженностью 69 а.о. (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9HPS2>). В работе использовались оба варианта белка SmAP. Далее вариант длиной 60 а.о. будет обозначаться как HsaSmAP60, а длиной 69 а.о. – HsaSmAP69. Гены обоих вариантов нарабатывали с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием хромосомной ДНК археи *H. salinarum* R1 в качестве матрицы. ПЦР проводили с использованием следующих олигонуклеотидных праймеров:

HsaFor 5'-CATCACCATGGGCGGCCGACC-3' и HsaRev 5'-GGGATAAGCTTTCATGGTTTGATG-GTGACG-3' для HsaSmAP60;

HsaFor 5'-CCATGGATGCCACCACCGG-3' и HsaRev 5'-GGGATAAGCTTTCATGGTTTGATG-GTGACG-3' для HsaSmAP69.

Полученные ПЦР-фрагменты клонировали в экспрессионный вектор pProExHtb («Invitrogen», США) с использованием эндонуклеаз рестрикции Bsp19I и HindIII («СибЭнзим», Россия). Полученные конструкции проверяли секвенированием («Синтол», Россия) и трансформировали ими клетки *E. coli* BL21(DE3), дополнительно содержащими плазмиду pLacIRARE («Novagen», Индия), кодирующую пять тРНК, узнающих редкие для *E. coli* кодоны соответствующих аминокислот.

Выделение и очистка белков. Клетки культивировали в колбах емкостью 2 л при температуре 37 °С и интенсивном перемешивании (170 об./мин) на среде LB (Lysogeny broth), содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 10 мкг/мл хлорамфеникола до достижения значения оптической плотности $OP_{600} \approx 0,7$ о.е. Для активации T7 РНК-полимеразы в среду добавляли изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 мМ. После добавления индуктора клетки инкубировали при 20 °С в течение 12 ч для предотвращения агрегации нарабатываемых белков. Клетки собирали центрифугированием при 8 000 g в течение 20 мин при 4 °С, затем клеточную массу ресуспендировали в 30 мл лизирующего буфера (20 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 М NaCl, 1 мМ фенолметилсульфонил фторид (PMSF), 1 мМ дитиотреитол (ДТТ), 0,1% Triton X-100) и разрушали на проточном прессе EmulsiFlex-C3 («Avestin», Канада). Клеточный дебрис осаждали центрифугированием в течение 30 мин при 14 000 g. Супернатант прогревали при 70 °С в течение

10 мин. Денатурировавшие термолабильные белки *E. coli* осаждали низкоскоростным центрифугированием при 14 000 g и температуре +4 °C в течение 30 мин. Супернатант наносили на колонку с агарозой, модифицированной Ni-NTA («Qiagen», Германия), уравновешенную буфером, содержащим 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 M NaCl, и промывали тем же буфером с добавлением 1 M LiCl. Для элюции белка использовали линейный градиент имидазола от 0 до 300 mM. Удаление олигогистидиновой последовательности осуществляли инкубацией препарата белка с TEV-протеазой в соотношении 10 : 1 соответственно, переводя диализом в буфер, содержащий 0,3 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM ДТТ, 0,5 mM ЭДТА. После протеолиза раствор прогревали в течение 10 мин при 70 °C, денатурировавшую протеазу осаждали центрифугированием при 14 000 g в течение 30 мин при температуре +4 °C. Разделение белков по наличию олигогистидиновой концевой последовательности осуществляли путём нанесения смеси белков на колонку с агарозой, модифицированной Ni-NTA («Invitrogen»). На финальной стадии целевые белки очищали гель-фильтрацией на колонке Superdex 75 («Cytiva», США), уравновешенной буфером, содержащим 20 mM Tris-HCl, pH_{25 °C} 8,0, 300 mM NaCl. Полученные препараты белков хранили при -20 °C.

Выделение антител, специфичных к белку SmAP из *H. salinarum*. Сыворотка крови кролика, содержащая антитела, специфичные к белку SmAP из *H. salinarum* (AT_{SmAP}), была получена в Институте биофизики клетки РАН (Пушино, Россия). Белки сыворотки кролика осаждали 2 M сульфатом аммония и отделяли центрифугированием при 20 000 g и 4 °C в течение 15 мин. Далее сыворотку очищали с помощью двух последовательных хроматографий. На первом этапе использовали аффинную хроматографию на Protein-A Sepharose («Pharmacia LKB», США). Сыворотку наносили на смолу в буфере PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) и промывали тем же буфером. Элюцию суммарных антител проводили глициновым буфером с концентрацией 250 mM, pH 3,0. Затем антитела, специфичные к белку SmAP из *H. salinarum*, очищали на смоле из агарозы, модифицированной Ni-NTA, с иммобилизованным на ней рекомбинантным белком SmAP, содержащим 6 остатков гистидина на N-конце. Суммарные очищенные антитела наносили на Ni-NTA-SmAP в буфере PBS, промывали буфером PBS с 2 M LiCl. Элюцию AT_{SmAP} проводили градиентом буфера PBS с содержанием MgCl₂ от 1 до 4 M. Фракции, содержащие чистые AT_{SmAP}, не загрязненные белком SmAP,

хранили в буфере PBS с 50% глицерина при температуре -20 °C.

Анализ вестерн-блот. Фракции белков разделяли при помощи электрофореза с 14%-ным ПААГ-ДСН, после чего переносили на PVDF-мембрану («Bio-Rad», США) с использованием Trans-Blot Turbo Blotting System того же производителя (1 A, 25 B, 30 мин). Блокировали мембрану в буфере TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl). Далее обрабатывали мембрану буфером TBSTM (TBS pH 7,5, 0,05% Tween 20, 5%-ное обезжиренное сухое молоко) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем мембрану инкубировали с антисывороткой кролика, разведенной буфером TBST (TBS pH 7,5, 0,05% Tween 20) (1 : 2000) в течение 1 ч при комнатной температуре. После трехкратного промывания (по 10 мин каждое) в TBST мембрану инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с козьими антителами к IgG кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718); «Abcam», Великобритания) (1 : 20 000). Промывали мембрану в буфере TBST 2 раза по 5 мин, затем 1 раз в буфере TBS в течение 2 мин. Инкубировали мембрану с хемилюминесцентным субстратом (Clarity™ Western ECL Substrate, «Bio-Rad») в темноте в течение 5 мин. Анализ проводили с использованием системы детекции ChemiDoc MP Imaging System («Bio-Rad»).

Анализ сродства белков к РНК по изменению подвижности в ПААГ при электрофорезе в неденатурирующих условиях. РНК-олигонуклеотиды синтезируются химически и предоставлены фирмой «Синтол» (Россия). В работе использовали РНК-олигонуклеотиды с 18 уридинами или аденинами на 3'-конце. На 5'-конце находится 16 нуклеотидов, не имеющих специфического сродства к белкам SmAP/Hfq [15]; они служат спейсерами при иммобилизации олигонуклеотидов на чипы в экспериментах по анализу сродства исследуемых белков к РНК методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР, см. ниже):

U18-РНК: 5'-GUGGUCAGUCGAGUGG-(U)₁₈-3'

A18-РНК: 5'-GUGGUCAGUCGAGUGG-(A)₁₈-3'.

Для оценки сродства белков к РНК по изменению подвижности олигонуклеотидов в ПААГ в неденатурирующих условиях образец РНК (3 мкг) прогревали в течение 10 мин при 60 °C, добавляли белок в различных молярных соотношениях, затем полученную смесь инкубировали при 37 °C в течение 10 мин. После этого проводили электрофоретический анализ в 10%-ном

ПААГ (акриламид : метилен-бис-акриламид = 19 : 1) в 90 мМ трис-ацетатном буфере (ТАЕ) с рН 7,8, содержащем 2 мМ $MgCl_2$. В образцы перед нанесением добавляли глицерин и бромфеноловый синий до конечных концентраций 5 и 0,1% соответственно. Электродный буфер имел следующий состав: 90 мМ ТАЕ (рН 7,8), 10 мМ $MgCl_2$. После окончания электрофореза РНК в геле окрашивали раствором, содержащим 0,25%-ный толуидиновый синий, 5%-ную уксусную кислоту, 10%-ный этанол.

Анализ сродства исследуемых белков к РНК методом поверхностного плазмонного резонанса.

Анализ осуществляли с использованием олигонуклеотидов А18-РНК и U18-РНК, биотинилированных по 5'-концу. Связывание белка с целевой РНК проводили при 25 °С с использованием системы ProteOn XPR36 («Bio-Rad»). Биотинилированные РНК прогревали 5 мин при 95 °С и наносили со скоростью потока 30 мкл/мин на сенсорный чип ProteOn NLC с иммобилизованным авидином до заполнения поверхности чипа, характеризующегося значением 500–700 единиц ответа (response unit, RU). Поверхность чипа дважды промывали восстанавливающим раствором, содержащим 0,05% w/v додецилсульфат натрия для удаления не связавшейся РНК.

Для каждого набора сенсограмм были приготовлены серии разведений белков в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (рН 7,5), 10 мМ $MgCl_2$, 350 мМ NaCl, 2 мМ ДТТ с 0,05% v/v Tween 20 буфером (TMN). Нанесение образца включает фазу ассоциации длиной 300–500 сек и фазу диссоциации 700–3000 сек. В конце каждого цикла поверхность чипа промывали 0,1–0,2%-ным ДСН, чтобы добиться полной диссоциации белка с поверхности РНК. Кинетический анализ проводили при использовании набора из 4–5 сенсограмм с применением модели для одностадийной реакции (по Ленгмюру) с коррекцией на масс-транспорт. Были определены константы скоростей ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) комплексов и рассчитана равновесная константа диссоциации ($K_D = k_d/k_a$).

Анализ сродства исследуемых белков к флуоресцентно-меченым рибонуклеотидам по анизотропии флуоресценции. Эксперименты проводили на флуоресцентном спектрометре Cary Eclipse («Agilent», США) при температуре 22 °С в кювете 0,3 × 0,3 см согласно описанной ранее методике [16, 17]. Для проведения измерений раствор Mant-AMP или Mant-GMP («Jena Bioscience», Германия) с концентрацией 1 мМ в буфере состава 0,2 М NaCl, 10 мМ $MgCl_2$, 50 мМ Tris-HCl (рН 8,0) титровали раствором белка с увеличением его концентрации от 10^{-6} до 10^{-4} М. Ани-

зотропию флуоресценции измеряли на длине волны 448 нм при возбуждении УФ на длине волны 335 нм. Для каждой точки проводили 5 независимых измерений величины интенсивности флуоресценции и затем автоматически рассчитывали среднюю величину и погрешность в программе QtiPlot («Iondev Srl», Румыния). Результат отображали графически с помощью программы QtiPlot.

Кристаллизация белка SmAP из *H. salinarum*.

Для экспериментов по кристаллизации использовали метод диффузии паров в висящей капле на 24-луночных плашках (VDX greased plates, «Hampton Research», США). Кристаллизацию проводили в каплях объемом 2–3 мкл, помещенных на силиконизированные стеклянные пластины («Hampton Research») при 24 °С. Объем противораствора составлял 400 мкл.

Кристаллы белка HsaSmAP69, пригодные для рентгеноструктурного анализа, получены не были.

Кристаллы белка HsaSmAP60 были получены в условиях D9 (15% w/v ПЭГ 8000; 100 мМ MES, рН 6,5; 200 мМ ацетат кальция) набора Nuc-Pro 2 («Jena Bioscience») при соотношении белок : противораствор = 2 : 1 и концентрации белка в образце 9,8 мг/мл. Кристаллы вырастали в течение недели до размера 100–150 мкм в длину и 20–30 мкм в ширину. Кристаллы комплекса HsaSmAP60 с UMP были получены инкубацией кристаллов белка в криопротекторном растворе (0,17 М ацетат натрия, 0,085 М каодилят натрия, рН 6,5, 25,5% ПЭГ 8000, 15% глицерин) с добавлением рибонуклеотида в концентрации 20 мМ.

Получение наборов дифракционных данных. С кристаллов белка HsaSmAP60 в комплексе с UMP были собраны дифракционные данные на экспериментальной станции ID23-1 источника синхротронного излучения ESRF (Гренобль, Франция) (таблица). Первичную обработку данных проводили с помощью программы XDS (Институт медицинских исследований им. Макса Планка, Гейдельберг, Германия) [18], затем набор структурных факторов интегрировали и приводили к единой шкале в программе Aimless комплекса CCP4 (Лаборатория молекулярной биологии MRC, Кэмбридж, Великобритания) [19].

Определение и уточнение структуры белка.

Структуру белка HsaSmAP60 в комплексе с UMP определяли методом молекулярного замещения с использованием программы MoRDa [20] комплекса CCP4 (<https://ccp4online.ccp4.ac.uk/ccp4online/>). Автоматический поиск наиболее подходящей модели для решения структуры показал наилучший результат для мономера белка AF-Sm2 из *Archaeoglobus fulgidus* (PDB

ID: 1jjo). Уточнение модели проводили в программе *phenix.refine* [21] комплекса Phenix (Лаборатория молекулярной биологии MRC) [22] с последовательным использованием протоколов *rigid body refinement* (уточнение положения каждого мономера белка как отдельного твердого тела) и *simulated annealing – Cartesian* (уточнение координат индивидуальных атомов и индивидуальных В-факторов с использованием симуляции молекулярной динамики). После первого цикла уточнения использовали возможность автоматического дополнения модели связанными молекулами воды с помощью программы *phenix.refine*. На этом шаге также дополняли незаполненные участки электронной плотности аминокислотными остатками согласно аминокислотной последовательности. В электронной плотности, не принадлежащей полипептидным цепям белка, было идентифицировано 14 молекул UMP, 1 молекула глицерина и 28 ионов кальция. Для них проведено уточнение индивидуальных координат, В-факторов, а также величин замещения (*occipancy*). После каждого этапа уточнения соответствие структуры и расчетной карты электронной плотности проверяли в программе *Coot* (Лаборатория молекулярной биологии MRC) [23]. На финальных стадиях уточнения использовали протокол без применения симуляции отжига с проверкой соответствия параметров геометрии полипептидной цепи и лигандов идеальным значениям, что позволило получить структуру высокого качества с минимальными отклонениями по геометрии и низкими значениями R-фактора (таблица).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация варианта белка SmAP археи *H. salinarum*. В ходе поиска последовательности белка SmAP из *H. salinarum*, а также кодирующего его гена, в базах данных NCBI и UniProt были обнаружены две записи с отличающейся длиной N-концевой части белка на 9 аминокислотных остатков (рис. 1). Оба варианта гена были клонированы, затем белки наработаны в *E. coli* – HsaSmAP60 (60 а.о.) и HsaSmAP69 (69 а.о.). Отличие в первичной структуре белков не сказалось на их свойствах при выделении и очистке. С помощью анализа вестерн-блот нами было показано, что в клетках *H. salinarum* присутствует белок длиной 69, а не 60 а.о. (рис. 2).

РНК-связывающие свойства SmAP из *H. salinarum*. Сродство белков к РНК-олигонуклеотидам оценивали двумя методами: по изменению подвижности РНК-белкового комплекса при электрофорезе в ПААГ в неденатурирующих ус-

Статистика набора дифракционных данных и уточнения структуры белка SmAP из *H. salinarum* (HsaSmAP60) в комплексе с UMP

Характеристика	Значение
Код PDB	6tfl
Длина волны (Å)	0.9724
Область разрешения (Å)	50.0-2.4 (2.5-2.4)
Пространственная группа	P 41 21 2
Параметры ячейки (Å, °)	156.45; 156.45; 106.63; 90; 90; 90
Общее число рефлексов	1318697 (82803)
Число уникальных рефлексов	52360 (5118)
Избыточность	25.2 (16.0)
Полнота данных (%)	99.8 (98.4)
Среднее значение I/Σ(I)	7.3 (2.3)
В-фактор Вильсона	42.7
R-merge	0.348 (0.908)
R-meas	0.355 (0.937)
R-pim	0.069 (0.232)
CC1/2	0.99 (0.89)
CC	1.00 (0.97)
Число рефлексов, использованных для уточнения	52247 (5101)
Число рефлексов, использованных для расчета R-free	2700 (279)
R-work	0.178 (0.270)
R-free	0.230 (0.346)
CC(work)	0.94 (0.72)
CC(free)	0.91 (0.65)
Число атомов общее	7187
В молекулах белка и нуклеотидах	6841
В лигандах	34
В молекулах воды	312
СКО длин связей	0.007
СКО валентных углов	0.818
СКО двугранных углов	24.76
СКО хиральных углов	0.059
СКО планарных углов	0.004
Число остатков в областях карты Рамачандрана	
Предпочтительной (%)	98.57
Допустимой (%)	1.43
Запрещенной (%)	0.00
Число нежелательных ротамеров (%)	0.00
Оценка нежелательных контактов (clashscore)	5.61
Средний В-фактор атомов (общий)	47.50
Белка	47.40
Лигандов	73.52
Воды	49.21

Примечание. Данные в скобках соответствуют слою высокого разрешения 2,5–2,4 Å.

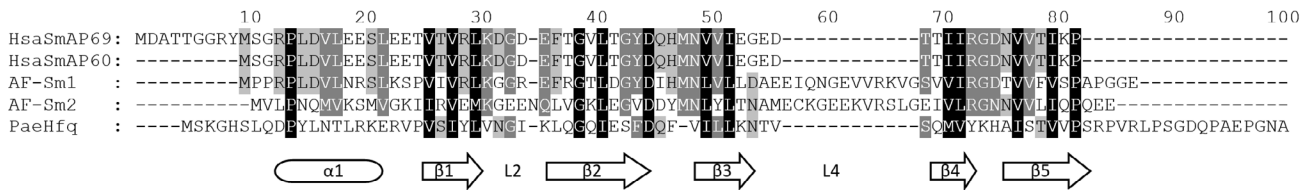


Рис. 1. Сравнение последовательностей мономеров белков HsaSmAP69 (SmAP из *H. salinarum* длиной 69 а.о. согласно записи UniProt Q9HPS2), HsaSmAP60 (SmAP из *H. salinarum* длиной 60 а.о., UniProt B0R5R2), AF-Sm1 (SmAP1 из *A. fulgidus*, UniProt O29386), AF-Sm2 (SmAP2 из *A. fulgidus*, UniProt O29885), PaeHfq (Hfq из *Pseudomonas aeruginosa*, UniProt Q9NUM0). Черным цветом выделены аминокислотные остатки со степенью гомологии 100%, темно-серым – от 80 до 100%, светло-серым – от 60 до 80%. Внизу приведена соответствующая вторичная структура белков. Выравнивание последовательностей проводили в программе ClustalX с учетом пространственной структуры белков. Анализ гомологии проводили в программе GeneDoc

ловиях («гель-шифт») и методом поверхностного плазмонного резонанса. На рис. 3 представлены результаты «гель-шифта»: показано, что оба варианта белка HsaSmAP не связываются с A18-РНК. Комплекс с U18-РНК формировался только с удлинённым вариантом белка, HsaSmAP69 (рис. 3).

Использование более чувствительного по сравнению с «гель-шифтом» метода ППР показало, что с U18-РНК способны взаимодействовать оба белка (рис. 4, а, б), причём константы диссоциации комплексов отличаются менее, чем на порядок: $K_D(\text{HsaSmAP69} - \text{U18-РНК}) = 0,12 \pm 0,05$ нМ, $K_D(\text{HsaSmAP60} - \text{U18-РНК}) = 0,93 \pm 0,11$ нМ. Сродство белков к U18-РНК оказалось близким к имеющимся в литературе

данным для комплексов гомологичных белков с такой же РНК [15]. Как указано выше, вариант HsaSmAP69, в отличие от HsaSmAP60, имеет дополнительную *N*-концевую последовательность, содержащую преимущественно положительно заряженные а.о. (рис. 1), которые, по всей видимости, способствуют связыванию белка с РНК. Аналогичный эффект *N*-концевой последовательности ранее наблюдался нами для Hfq-подобного SmAP-белка из археи *M. jannaschii*: при удалении этого участка K_D комплекса белка с олиго(U) также увеличивалась примерно на порядок [12].

Данные, полученные методом ППР, подтвердили отсутствие связывания белков с A18-РНК (рис. 4, в, г).

Проведенный ранее структурно-кинетический анализ РНК-белковых взаимодействий SmAP из других архей показал, что их сродство к олиго(A)-РНК является незначительным [15]; согласно нашим данным, для HsaSmAP связывание не детектируется даже при высоких концентрациях белков (рис. 4).

Нуклеотид-связывающие свойства SmAP из *H. salinarum*. Ранее мы успешно использовали анализ нуклеотид-связывающих свойств белков Hfq и SmAP для оценки их сродства к РНК по изменению флуоресценции [15–17]. Аналогичные эксперименты для HsaSmAP69 показали, что этот белок не связывает нуклеотиды AMP и GMP (рис. 5). Эти данные подтверждают, что белок HsaSmAP не имеет участков специфического связывания аденинов и гуанинов.

Пространственная структура белка SmAP из *H. salinarum*. Структура белка HsaSmAP определена методом молекулярного замещения с использованием сервиса MoRDa («BioMEX», Великобритания) [20]. Этот сервис использует набор инструкций для решения задачи молекулярного замещения с автоматическим перебором пространственных структур из базы данных с наивысшей степенью гомологии относительно

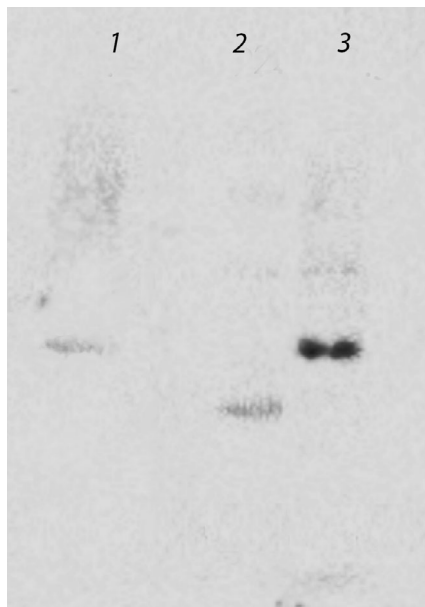


Рис. 2. Вестерн-блот: 1 – лизат клеток *H. salinarum*; 2 – рекомбинантный SmAP из *H. salinarum* длиной 60 а.о. (HsaSmAP60); 3 – рекомбинантный SmAP из *H. salinarum* длиной 69 а.о. (HsaSmAP69)

заданной последовательности белка. Каждая выбранная структура используется для независимого решения задачи молекулярного замещения, что позволяет оптимизировать поиск решения и улучшить его точность. На выходе выдается наилучшее решение из возможных для всего пула первоначальных моделей. Для нашего случая наилучшей моделью оказалась структура мономера SmAP-белка из *A. fulgidus* AF-Sm2 (PDB ID: 1ljo) [13, 24].

В асимметричной части ячейки кристалла найдено 14 мономеров, образующие два гепта-

мера белка HsaSmAP (рис. 6, а и б). Структура мономера полностью соответствует структурам других белков этого класса и содержит *N*-концевую α -спираль и β -бочонок из пяти тяжей, причём тяж $\beta 2$ имеет большую длину и излом посередине. Сравнение со структурами белков Hfq из *E. coli* и AF-Sm2 из *A. fulgidus* показало небольшое отклонение между координатами $S\alpha$ -цепи консервативной части белков – 1,05 Å и 0,84 Å соответственно (рис. 6, в и г). Интересно отметить, что третичная структура мономера HsaSmAP несколько ближе к структуре бактери-

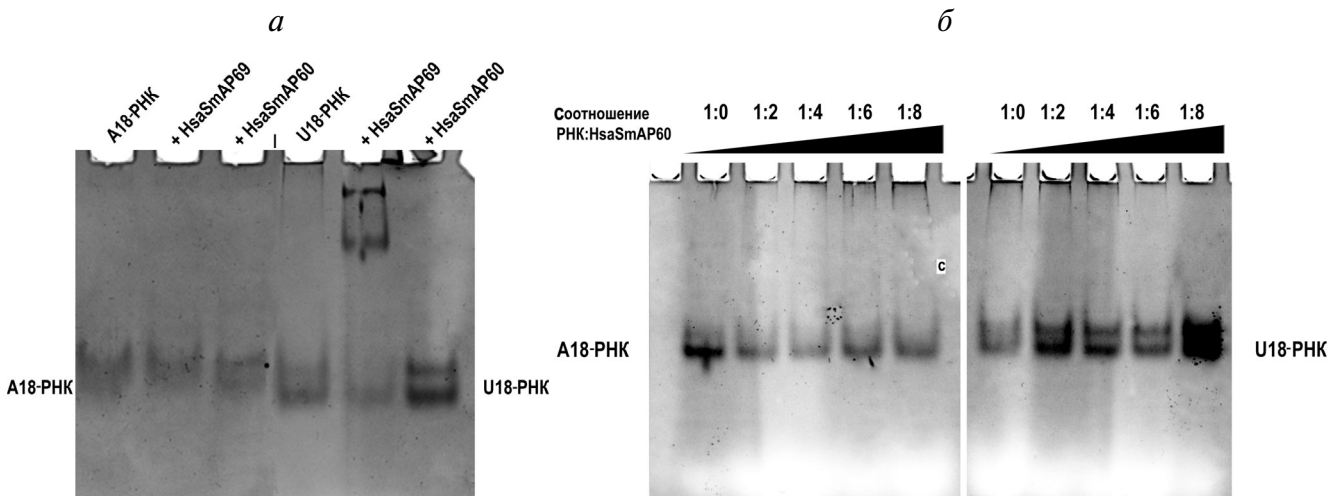


Рис. 3. Проверка способности SmAP из *H. salinarum* образовывать комплексы с A18-РНК и U18-РНК по изменению подвижности в ПААГ при электрофорезе в неденатурирующих условиях: а – при молярном соотношении РНК : белок = 1 : 2; б – для HsaSmAP60 при различных молярных соотношениях РНК : белок

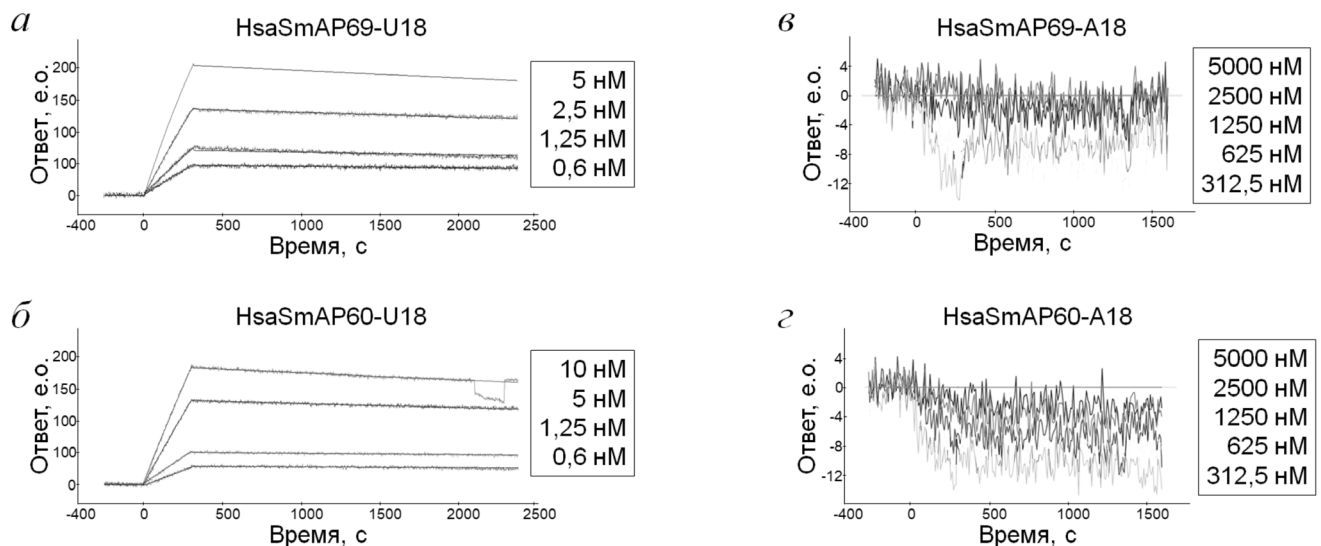


Рис. 4. Сенсограммы, отображающие кинетический анализ взаимодействия HsaSmAP69 (а, в) и HsaSmAP60 (б, г) с U18-РНК (а, б) и A18-РНК (в, г). Для каждого набора сенсограмм указаны используемые концентрации белков. Ровные линии соответствуют теоретической аппроксимации полученных экспериментальных данных

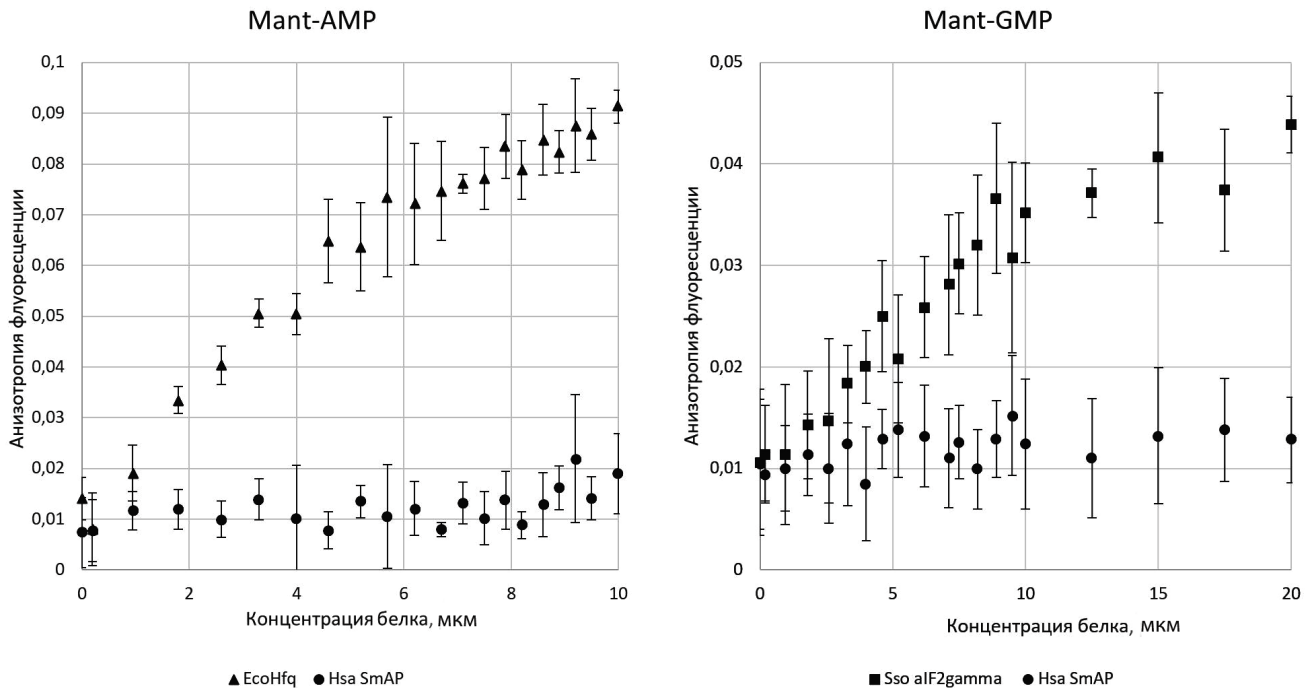


Рис. 5. Кривые титрования белка HsaSmAP69 флуоресцентно-мечеными нуклеотидами Mant-AMP и Mant-GMP. В качестве контроля (специфически связывающихся с нуклеотидами белков) использованы белок Hfq из *E. coli* (EcoHfq) для Mant-AMP и гамма-субъединица aIF2 из *Sulfolobus solfataricus* (Sso aIF2gamma) для Mant-GMP

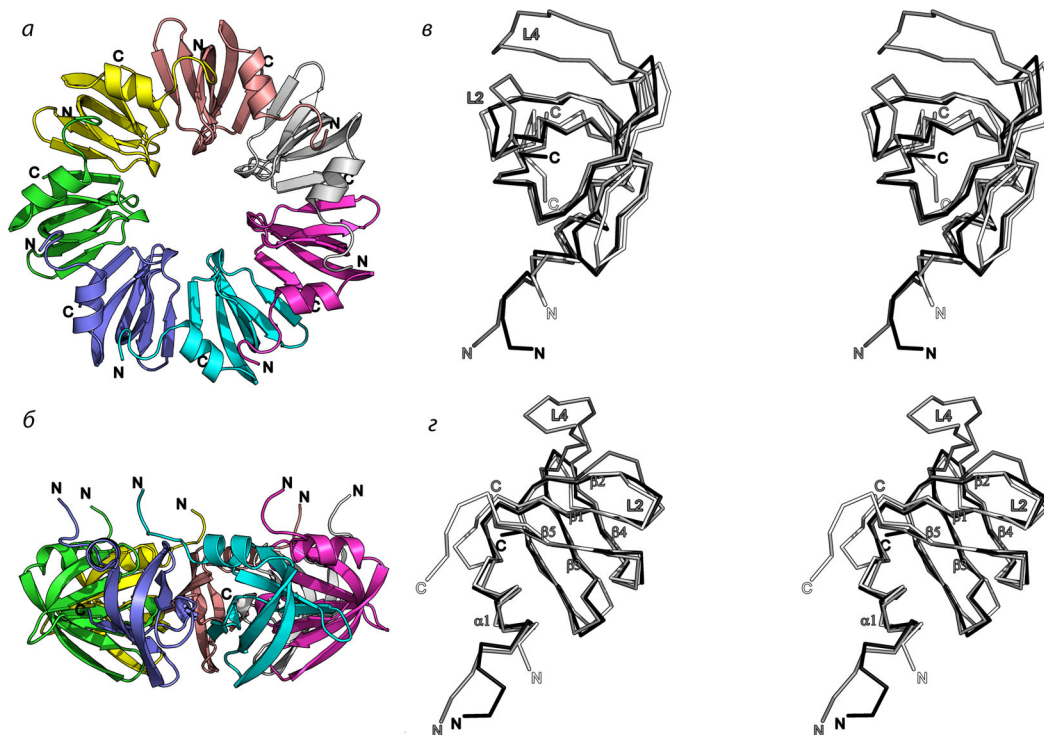


Рис. 6. Структура белка SmAP из *H. salinarum*: а – общий вид структуры гептамера со стороны α -спиралей мономеров белка (проксимальная сторона). Обозначены N- и C-концы мономеров; б – общий вид структуры с боковой стороны гептамера; в и г – наложение C α -цепей мономеров SmAP из *H. salinarum* (PDB ID: 6tfl) (черная), AF-Sm2 из *A. fulgidus* (PDB ID: 1ljo) (серая) и Hfq из *E. coli* (PDB ID: 1hk9) (белая). Стереопары: мономер на панели г повернут относительно панели в на 90° по вертикальной оси. Обозначены N- и C-концы белков, элементы вторичной структуры, петли L2 и L4. (С цветными вариантами рисунков 6–8 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

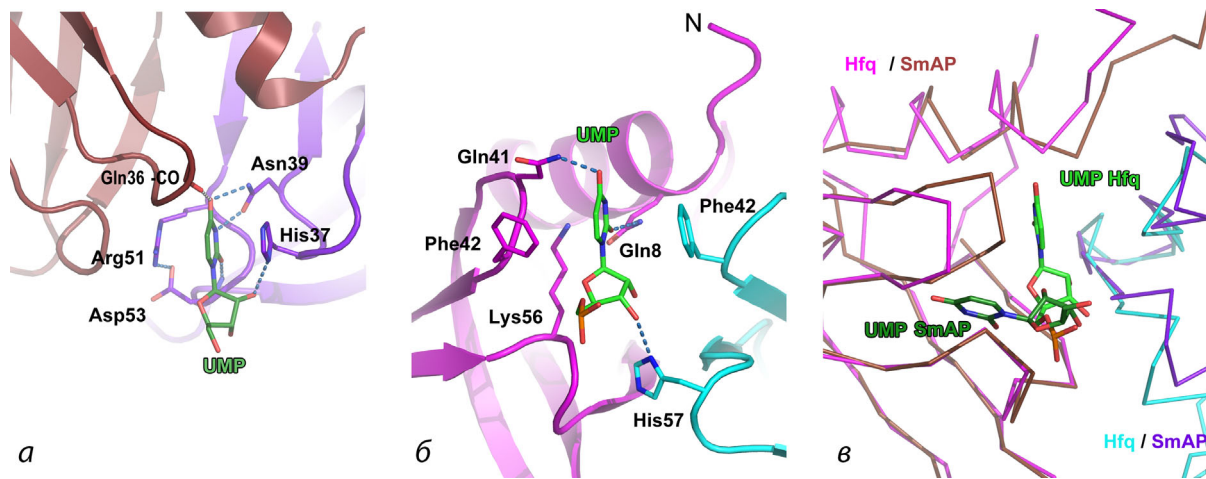


Рис. 7. Сравнение уридин-специфического РНК-связывающего участка белков: *a* – SmAP из *H. salinarum* (PDB ID: 6tfl); *б* – Hfq из *P. aeruginosa* (PDB ID: 4mml). Водородные связи показаны пунктирными линиями. *в* – Изменение ориентации связанных со SmAP и Hfq нуклеотидов относительно друг друга. Соседние мономеры белка Hfq показаны малиновым и голубым, SmAP – коричневым и фиолетовым. Наложение структур произведено в программе Coot

ального белка Hfq, чем к структуре AF-Sm2: оба белка имеют короткую последовательность петли L4, что сказывается на ориентации петли L2, соединяющей тяжи $\beta 1$ и $\beta 2$. Тем не менее белок Hfq имеет больше витков спирали $\alpha 1$ по сравнению с архейными белками, что влияет на конформацию петли L1, соединяющую спираль и тяж $\beta 1$ (рис. 6, *з*). Несмотря на короткую последовательность петли L4, белок HsaSmAP формирует гептамер, а не гексамер, что указывает на независимость четвертичной структуры Lsm-белков от длины петли L4.

В каждом гептамере белка HsaSmAP найдено 7 молекул UMP (рис. 7). Они связаны в стандартном для Lsm-белков уридин-специфическом РНК-связывающем участке белка на проксимальной стороне мультимера. Дополнительных мест связывания UMP, как и в случае белка Hfq из *P. aeruginosa* [25], зафиксировано не было. Основание нуклеотида расположено между боковыми цепями аминокислотных остатков Arg51 и His37 одного мономера белка, причём, как и в аналогичных комплексах белков SmAP с уридинами, боковая цепь аргинина находится в стэкинге с основанием. Атомы Arg51 не формируют водородные связи с атомами основания — их образуют атомы боковой цепи Asn39 с N4 и O4 уридина, а также атомы кислорода главной цепи Asp53 с O2 и Gln36 соседнего мономера с O4 (рис. 7, *а*). Такая система водородных связей характерна для известных структур SmAP-белков в комплексах с олиго(U)-РНК и UMP [15, 24, 26–28]. Важную роль в дискриминации рибонуклеотидов от дезоксирибонуклеотидов играет контакт боковой цепи His37 с O2-атомом UMP, аналогичный контакту O2 с His57 в бакте-

риальных белках Hfq. Сравнение структуры комплексов белков Hfq и SmAP показывает, что модификация области контактов с рибонуклеотидом вызывает изменение положения основания относительно межмономерного интерфейса белков (рис. 7, *в*). UMP в SmAP-белках развернут примерно на 90° по сравнению с его ориентацией в комплексах с белками Hfq при минимальном изменении локальной структуры белков. Возможно, такое изменение положения уридина на поверхности SmAP-белков связано с изменением роли белка в клетках архей по сравнению с бактериальными гомологами.

Сравнение структуры области белка HsaSmAP, соответствующей аденин-специфическому сайту связывания белка Hfq, показало её полную непригодность для взаимодействия с рибонуклеотидами, несмотря на то что эта часть дистальной поверхности гептамера HsaSmAP не прикрыта петлей L4, как в большинстве SmAP-белков (рис. 8). В бактериальных белках Hfq аденин-связывающий сайт сформирован несколькими гидрофобными остатками, что создает благоприятные условия для фиксации основания аденина в правильном положении благодаря стэкингу с консервативным остатком Phe/Тур (в Hfq из *E. coli* – Тур25). При этом атомы боковых цепей консервативных Thr и Gln формируют водородные связи с атомами основания (рис. 8, *б*). В аналогичном участке белка HsaSmAP не наблюдается такого кармана из гидрофобных остатков, а доступ к нему закрыт Arg20, положение боковой цепи которого зафиксировано тремя водородными связями (рис. 8, *а*). Аналогичная картина наблюдается для архейного белка AF-Sm1 (рис. 8, *в*) и для

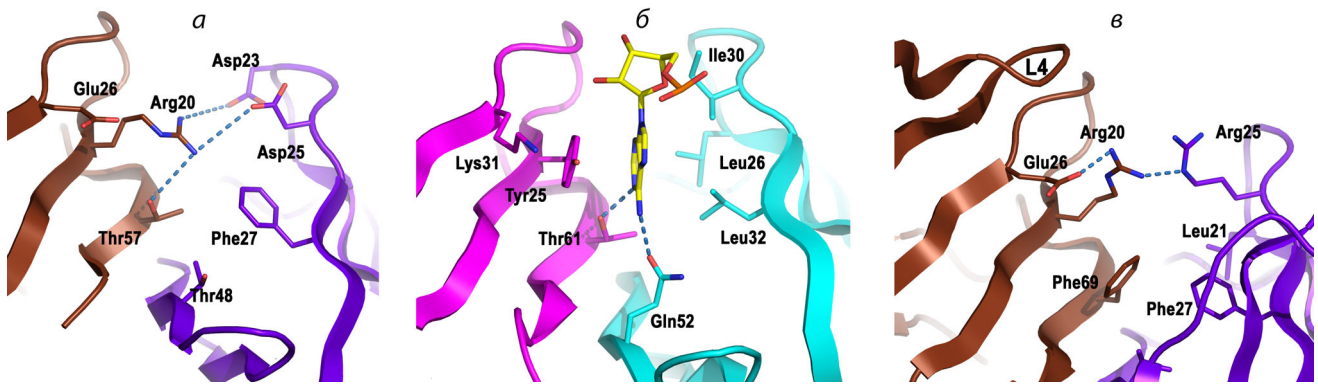


Рис. 8. Сравнение областей белков, соответствующих аденин-специфическому РНК-связывающему участку Hfq: *a* – SmAP из *H. salinarum* (PDB ID: 6tfl); *б* – Hfq из *E. coli* (PDB ID: 3gib); *в* – AF-Sm1 из *A. fulgidus* (PDB ID: 1i5l). Соседние мономеры белка Hfq показаны малиновым и голубым, SmAP-белков – коричневым и фиолетовым

других SmAP-белков [15]. Такое расположение аминокислотных остатков, по-видимому, не позволяет этому участку SmAP-белков выполнять роль РНК-связывающего сайта независимо от длины петли L4, что также подтверждается нашими данными по измерению сродства HsaSmAP к A18-РНК и Mant-AMP.

Суммируя полученные нами данные по структуре белка HsaSmAP и его сродству к олигоРНК и отдельным нуклеотидам, можно утверждать, что этот белок имеет только один, уридин-специфический, РНК-связывающий сайт. Несмотря на то что короткая петля L4 открывает доступ к дистальной поверхности гептамера, белок HsaSmAP не обладает сродством к олиго(A)-РНК, поскольку такой сайт в их структуре не формируется.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00222).

Благодарности. Авторы выражают благодарность В. Балобанову (ИБ РАН) за помощь в измерениях, В.В. Врублевской (ИБК РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН) за предоставление антител и сотрудникам ИБП РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН за предоставление возможности проведения измерений методом поверхностного плазмонного резонанса.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Murina, V. N., and Nikulin, A. D. (2011) RNA-binding Sm-like proteins of bacteria and archaea. Similarity and difference in structure and function, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1434-1449, doi: 10.1134/S0006297911130050.
- Mura, C., Randolph, P. S., Patterson, J., and Cozen, A. E. (2013) Archaeal and eukaryotic homologs of Hfq, *RNA Biol.*, **10**, 636-651, doi: 10.4161/rna.24538.
- Lekontseva, N. V., Stolboushkina, E. A., and Nikulin, A. D. (2021) Diversity of LSM Family proteins: similarities and differences, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, S38-S49, doi: 10.1134/S0006297921140042.
- Sauter, C., Basquin, J., and Suck, D. (2003) Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4091-4098, doi: 10.1093/nar/gkg480.
- Sauer, E. (2013) Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq, *RNA Biol.*, **10**, 610-618, doi: 10.4161/rna.24201.
- Sharif, H., and Conti, E. (2013) Architecture of the Lsm1-7-Pat1 complex: a conserved assembly in eukaryotic mRNA turnover, *Cell Rep.*, **5**, 283-291, doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.004.
- Zhou, L., Hang, J., Zhou, Y., Wan, R., Lu, G., et al. (2013) Crystal structures of the Lsm complex bound to the 3'-end sequence of U6 small nuclear RNA, *Nature*, **506**, 116-120, doi: 10.1038/nature12803.
- Roth, A. J., Shuman, S., and Schwer, B. (2018) Defining essential elements and genetic interactions of the yeast Lsm2-8 ring and demonstration that essentiality of Lsm2-8 is bypassed via overexpression of U6 snRNA or the U6 snRNP subunit Prp24, *RNA*, **24**, 853-864, doi: 10.1261/rna.066175.118.
- Pomeranz Krummel, D. A., Oubridge, C., Leung, A. K. W., Li, J., and Nagai, K. (2009) Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution, *Nature*, **458**, 475-480, doi: 10.1038/nature07851.
- Wilusz, C. J., and Wilusz, J. (2005) Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 1031-1036, doi: 10.1038/nsmb1037.
- Nielsen, J. S., Bøggild, A., Andersen, C. B. F. F., Nielsen, G., Boysen, A., et al. (2007) An Hfq-like protein in archaea: crystal structure and functional characterization of the Sm protein from *Methanococcus jannaschii*, *RNA*, **13**, 2213-2223, doi: 10.1261/rna.689007.

12. Nikulin, A., Mikhailina, A., Lekontseva, N., Balobanov, V., Nikonova, E., and Tishchenko, S. (2017) Characterization of RNA-binding properties of the archaeal Hfq-like protein from *Methanococcus jannaschii*, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **35**, 1615-1628, doi: 10.1080/07391102.2016.1189849.
13. Törö, I., Basquin, J., Teo-Dreher, H., and Suck, D. (2002) Archaeal Sm proteins form heptameric and hexameric complexes: crystal structures of the sm1 and sm2 proteins from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*, *J. Mol. Biol.*, **320**, 129-142, doi: 10.1016/j.jbiochi.2020.05.001.
14. Kilic, T., Sanglier, S., Van Dorsselaer, A., and Suck, D. (2006) Oligomerization behavior of the archaeal Sm2-type protein from *Archaeoglobus fulgidus*, *Protein Sci.*, **15**, 2310-2317, doi: 10.1016/j.jbiochi.2020.05.001.
15. Lekontseva, N., Mikhailina, A., Fando, M., Kravchenko, O., Balobanov, V., et al. (2020) Crystal structures and RNA-binding properties of Lsm proteins from archaea *Sulfolobus acidocaldarius* and *Methanococcus vannielii*: similarity and difference of the U-binding mode, *Biochimie*, **175**, 1-12, doi: 10.1016/j.jbiochi.2020.05.001.
16. Balobanov, V., Lekontseva, N., Mikhaylina, A., and Nikulin, A. (2020) Use of fluorescent nucleotides to map RNA-binding sites on protein surface, *Methods Mol. Biol.*, **2113**, 251-262, doi: 10.1007/978-1-0716-0278-2_17.
17. Nemchinova, M., Balobanov, V., Nikonova, E., Lekontseva, N., Mikhaylina, A., et al. (2017) An experimental tool to estimate the probability of a nucleotide presence in the crystal structures of the nucleotide-protein complexes, *Protein J.*, **36**, 157-165, doi: 10.1016/j.jbiochi.2020.05.001.
18. Kabsch, W. (2010) XDS, *Acta Crystallogr.*, **D66**, 125-132, doi: 10.1107/S0907444909047337.
19. Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., et al. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments, *Acta Crystallogr.*, **D67**, 235-242, doi: 10.1107/S0907444910045749.
20. Vagin, A., and Lebedev, A. (2015) MoRDa, an automatic molecular replacement pipeline, *Acta Crystallogr.*, **A71**, s19-s19, doi: 10.1107/S2053273315099672.
21. Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., et al. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine, *Acta Crystallogr.*, **D68**, 352-367, doi: 10.1107/S0907444912001308.
22. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., et al. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution, *Acta Crystallogr.*, **D66**, 213-221, doi: 10.1107/S0907444909052925.
23. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr.*, **D60**, 2126-2132, doi: 10.1107/S0907444904019158.
24. Törö, I., Thore, S., Mayer, C., Basquin, J., Séraphin, B., and Suck, D. (2001) RNA binding in an Sm core domain: X-ray structure and functional analysis of an archaeal Sm protein complex, *EMBO J.*, **20**, 2293-2303, doi: 10.1093/emboj/20.9.2293.
25. Murina, V., Lekontseva, N., and Nikulin, A. (2013) Hfq binds ribonucleotides in three different RNA-binding sites, *Acta Crystallogr.*, **D69**, 1504-1513, doi: 10.1107/S090744491301010X.
26. Thore, S., Mayer, C., Sauter, C., Weeks, S., and Suck, D. (2003) Crystal structures of the *Pyrococcus abyssi* Sm core and its complex with RNA. Common features of RNA binding in archaea and eukarya, *J. Biol. Chem.*, **278**, 1239-1247, doi: 10.1074/jbc.M207685200.
27. Mura, C., Phillips, M., Kozhukhovskiy, A., and Eisenberg, D. (2003) Structure and assembly of an augmented Sm-like archaeal protein 14-mer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4539-4544, doi: 10.1073/pnas.0538042100.
28. Mura, C., Kozhukhovskiy, A., Gingery, M., and Phillips, M. (2003) The oligomerization and ligand-binding properties of Sm-like archaeal proteins (SmAPs), *Protein Sci.*, **12**, 832-847, doi: 10.1110/ps.0224703.ensure.

STRUCTURE AND RNA-BINDING PROPERTIES OF LSM PROTEIN FROM *Halobacterium salinarum*

M. S. Fando, A. O. Mikhaylina, N. V. Lekontseva, S. V. Tishchenko, and A. D. Nikulin*

*Institute of Protein Research of the Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino,
Moscow Region, Russia; e-mail: nikulin@vega.protres.ru*

The structure and the RNA-binding properties of the Lsm protein from *Halobacterium salinarum* have been determined. A distinctive feature of this protein is the presence of a short L4 loop connecting the $\beta 3$ and $\beta 4$ strands. Since bacterial Lsm proteins (also called Hfq proteins) have a short L4 loop and form hexamers, whereas archaeal Lsm proteins (SmAP) have a long L4 loop and form heptamers, it has been suggested that the length of the L4 loop may affect the quaternary structure of Lsm proteins. Moreover, the L4 loop covers the region of SmAP corresponding to one of the RNA-binding sites in Hfq, and thus can affect the RNA-binding properties of the protein. Our results show that the SmAP from *H. salinarum* forms heptamers and possesses the same RNA-binding properties as homologous proteins with the long L4 loop. Therefore, the length of the L4 does not govern the number of monomers in the protein particles and does not affect the RNA-binding properties of Lsm proteins.

Keywords: Lsm proteins, SmAP, protein quaternary structure, protein RNA-binding properties, small regulatory RNA, sRNA, *Halobacterium salinarum*

УДК 57.085.23

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cpf1 ДЛЯ ИНДУЦИРУЕМОГО НОКАУТА ГЕНОВ

© 2021 В.В. Шерстюк*, С.М. Закиян

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: svv@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 23.03.2021

После доработки 09.05.2021

Принята к публикации 10.05.2021

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) крысы играют важную роль в изучении генов, участвующих в поддержании плюрипотентного состояния и в процессах раннего развития этого модельного организма. Для изучения функций жизненно важных генов, а также в ходе процессов дифференцировки клеток широко используется метод индуцируемого нокаута. Система CreERT2/loxP позволяет получить индуцируемый нокаут в клетках, экспрессирующих тамоксифен-зависимую Cre-рекомбиназу (CreERT2) и содержащих loxP-сайты, фланкирующие целевой ген, путём добавления в культуральную среду 4-гидрокситамоксифена. Однако в настоящее время отсутствуют линии ЭСК крысы, экспрессирующие CreERT2. В данной работе мы протестировали три CRISPR/Cas-системы на предмет внесения двуцепочечных разрывов в локус *Rosa26* в ЭСК крысы и произвели встройку в данный локус тамоксифен-зависимой Cre-рекомбиназы с использованием системы CRISPR/Cpf1. Было показано, что полученные трансгенные линии ЭСК крысы сохранили характеристики плюрипотентных клеток. Активность тамоксифен-зависимой Cre-рекомбиназы была проанализирована с использованием репортёрного вектора.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эмбриональные стволовые клетки, крыса, CRISPR/Cas, редактирование генома, Cre-рекомбиназа.

DOI: 10.31857/S0320972521070046

ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) – это полученный из внутренней клеточной массы бластоцист тип клеток, для которого характерны свойства самообновления и плюрипотентности [1, 2]. Данные свойства обуславливают широкое применение ЭСК для изучения процессов раннего развития и дифференцировки клеток. Одним из важных объектов биологии является серая крыса (*Rattus norvegicus*). Крыса используется в качестве модельного объекта в различных областях, среди которых исследования в области физиологии, токсикологии, поведения, а также моделирование генетических за-

болеваний [3]. ЭСК крысы были впервые получены в 2008 г. [4, 5]. Тем не менее количество работ, посвящённых ЭСК крысы, в том числе и с использованием современных методов редактирования генома, очень мало.

Одним из распространённых инструментов изучения функций генов является их нокаут. Появление систем редактирования генома, и в частности системы CRISPR/Cas9, позволяющей вносить одноцепочечные или двуцепочечные разрывы в интересующие участки генома, дало возможность эффективно и в короткие сроки получать нокаут целевых генов [6]. Однако при использовании систем редактирования генома в результате получается гетерогенная популяция клеток, в которой количество клеток с нокаутом целевого гена зависит от эффективности доставки компонентов CRISPR/Cas в клетки и активности выбранной направляющей РНК (нРНК). Кроме того, данный подход не работает в случае изучения жизненно важных для клеток генов, а также при изучении функций генов в ходе дифференцировки или репрограммирования клеток. В данных случаях наиболее применим метод индуцируемого нокаута, которого можно достичь при использовании системы CreERT2/loxP. Хи-

Принятые сокращения: нРНК – направляющая РНК; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; AvSA – сайт сплайсинга аденовируса; CreERT2 – тамоксифен-индуцируемая Cre-рекомбиназа; CRISPR/Cas9 – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR-ассоциированный белок 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9); CreERT2 – тамоксифен-индуцируемая Cre-рекомбиназа; GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein); 4-ОНТ – 4-гидрокситамоксифен; NeoR – ген устойчивости в неомицину.

* Адресат для корреспонденции.

мерный белок тамоксифен-зависимая Cre-рекомбиназа (CreERT2) состоит из Cre-рекомбиназы, соединённой с мутантным лиганд-связывающим доменом эстрогенового рецептора человека, и локализуется в цитоплазме клетки. Добавление 4-гидрокситамоксифена (4-OHT) приводит к транслокации CreERT2 в ядро и рекомбинации между loxP-сайтами [7]. В свою очередь, ЭСК, экспрессирующие CreERT2, можно получить путём интеграции данного трансгена в локус *Rosa26* методом гомологичной рекомбинации с использованием системы CRISPR/Cas. В последние годы значительно увеличилось количество известных CRISPR/Cas-систем для редактирования генома [8]. Наиболее используемой системой является CRISPR/SpCas9 из *Staphylococcus pyogenes* [6]. Для редактирования генома также адаптированы и используются системы CRISPR/SaCas9 из *Staphylococcus aureus* и CRISPR/Cpf1 [9, 10]. К настоящему времени для гомологичной рекомбинации в ЭСК крысы использовали только систему CRISPR/SpCas9 [11–14].

Ранее нами были получены и полностью охарактеризованы ЭСК крысы [15–17]. В данной работе мы протестировали три CRISPR системы на предмет внесения двуцепочечных разрывов в локус *Rosa26*. Мы получили ЭСК крысы, экспрессирующие тамоксифен-зависимую Cre-рекомбиназу с использованием системы CRISPR/Cpf1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение донорного плазмидного вектора. Создание донорного вектора для рекомбинации осуществляли в несколько этапов, последовательно клонируя необходимые части в плазмиду pBluescript II SK (+) («Agilent Technologies», США), используя реакции гидролиза эндонуклеазами рестрикции и лигирование. На первом этапе мы амплифицировали ген *CreERT2* и сайт полиаденилирования, используя в качестве матрицы плазмиду MXS_PGK::CreERT2-bGHpA («Addgene», США, #62444) [18], и клонировали в pBluescript II SK(+) по сайтам рестрикции EcoRI и SmaI. Далее произвели встройку акцепторного сайта сплайсинга аденовируса (AvSA) по сайтам рестрикции KpnI и ApaI, используя пару комплементарных олигонуклеотидов. На следующем этапе была произведена встройка последовательности, кодирующей T2A-пептид, по сайтам XhoI и EcoRI с использованием пары комплементарных олигонуклеотидов. Ген устойчивости к неомицину амплифицировали, используя в качестве матрицы плаз-

миду AAVS1-Neo-M2rtTA («Addgene», #60843) [19], и встроили в pBS-AvSA-T2A-CreERT2 по сайтам ApaI и XhoI. Плечи гомологии к первому интрону *Rosa26* крысы были получены с помощью ПЦП с использованием геномной ДНК, выделенной из ЭСК крысы. Для того, чтобы предотвратить внесение двуцепочечных разрывов в донорный вектор и в ДНК после встройки трансгена мы расположили протоспейсер на стыке плеч гомологии и внесли мутацию в прилежащий к протоспейсеру мотив (PAM-сайт). Сначала была произведена встройка левого плеча гомологии по сайту KpnI, затем правого плеча гомологии – по сайтам SpeI и NotI. Все олигонуклеотиды («Биоссет», Россия), использованные для амплификации и клонирования фрагментов, приведены в табл. 1. Правильность сборки плазмидных конструкций и отсутствие замен нуклеотидов проверяли на каждом этапе клонирования с использованием секвенирования по Сэнгеру. Для электропорации в клетки крысы донорный вектор был линейаризован по сайтам рестрикции NotI и BglI. Полученные фрагменты разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле, необходимый фрагмент вырезали и очищали с использованием набора Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System kit («Promega», США). Все приведенные в данной работе эндонуклеазы рестрикции были приобретены в компании «New England Biolabs», (США).

Плазмиды систем CRISPR/Cas, использованные в работе. В данной работе мы использовали системы доставки компонентов CRISPR/Cas9, состоящие из двух плазмид. Одна плаزمида кодировала нуклеазу, а вторая – нРНК и зеленый флуоресцентный белок (GFP) для оценки эффективности электропорации. Для доставки компонентов системы CRISPR/SpCas9 мы использовали плазмиды pX330-U6-Chimeric BB-CBh-hSpCas9 («Addgene», #42230) [20] и pX552-U6-Sp-gRNA-CMV-GFP. pX552-U6-Sp-gRNA-CMV-GFP была получена на основе плазмиды pX552 («Addgene», #60958) [21] путём замены промотора и удаления KASH-домена. Для доставки компонентов системы CRISPR/SaCas9 мы использовали pX601-CMV-SaCas9, которая была получена путём замены промотора miniCMV на полноценный CMV-промотор в плазмиде pX601 miniCMV-SaCas9-SpA-sgRNA («Addgene», #107055), и pX552-U6-Sa-gRNA-CMV-GFP, которая была получена путём замены скаффолда для нРНК в плазмиде pX552-U6-Sp-gRNA-CMV-GFP. Для доставки компонентов CRISPR/Cpf1 мы использовали плазмиды pTE4560 («Addgene», #107526) [22] и pAsCpf1-2NLS, сконструированную путём замены фраг-

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, используемых в работе

Название пары олигонуклеотидов	Последовательность (5'–3')	Описание
CreERT2pA	GAGTCGAATTCTGGCCACCATGTCCAATTTACT, CGAATTGGTTCGACCATAGAG	праймеры для амплификации гена <i>CreERT2</i> с сайтом полиаденилирования
AvSA	CTAGGGCGCAGTAGTCCAGGGTTTCCTTGATGATGTCAT- ACTTATCCTGTCCCTTTTTTCCACAGCTCGCGGTTGA- GGACAAACTCTTCGCGGTCTTTCCAGTGGGCC, CACTGGAAAGACCGCGAAGAGTTTGTCTCAACCGCGA- GCTGTGGAAAAAAGGGACAGGATAAGTATGACATCAT- CAAGGAAACCCTGGACTACTGCGCCCTAGGTAC	комплементарные олигонуклеотиды для встройки сайта сплайсинга аденовируса
T2A	TCGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACG- TGGAGGAGAATCCCGGCC, AATTGGGCCGGGATTCTCTCCACGTCACCGCATGTTA- GAAGACTTCTCTGCCCTC	комплементарные олигонуклеотиды для встройки последовательности, кодирующей T2A-пептид
NeoR	CCTAGGGGGCCCGCCACCATGGGATCGGCCATTGAACA, CGGATCTCGAGAGAAGAAGTCTCAAGAAGGC	праймеры для амплификации гена устойчивости к неомицину
HA-L	AGTCTTGGTACCACGCGTTGCAAACGGGATTCTCTCTT, AGTCATGGTACCTCTAAGATCAGGAGAGAGGG	праймеры для амплификации левого плеча гомологии к первому интрону <i>Rosa26</i>
HA-R	CCTGATACTAGTGTCCGATGACTCATGCAACCAG, ATTGTAGCGGCCCGCTGCGCACACCACCCTAAAA	праймеры для амплификации правого плеча гомологии к первому интрону <i>Rosa26</i>
F1/R1	TCATGCAAGTTCAGTCCCTAAG, GCCAGTCATAGCCGAATAG	праймеры для анализа встройки трансгена
F2/R2	GATCCGCCCTGGAGAATT, AAGCTCTCTGAAGTGTGAATAGG	праймеры для анализа биаллельности встройки трансгена и для анализа доли инсерций/делаций при действии CRISPR/Cas систем
Oct4	CACACTCTACTCGGTCCCTT, TGCTTTCAATTCTCCCA	праймеры для анализа уровня экспрессии Oct4
Sox2	TATCGAGATAAACATGGCAA, CAGAATCAAAACCCAGCAA	праймеры для анализа уровня экспрессии Sox2
Nanog	TACCTCAGCCTCCAGCAGAT, GCAATGGATGCTGGGATACT	праймеры для анализа уровня экспрессии Nanog
Cre	CTGACGGTGGGAGAATGTTAAT, CATCGCTCGACCATTTAGTT	праймеры для анализа уровня экспрессии Cre-рекомбиназы

Таблица 2. Последовательности протоспейсеров, использованных в работе

Система CRISPR	#	Последовательность (5'–3')	PAM
SpCas9	1	GACTTCTAAGATCAGGAGAG	AGG
	2	CCAATCCCTAGACAGAGCAC	TGG
	3	GTGTATGAAACTAATCTGTC	TGG
SaCas9	1	ACTTCTAAGATCAGGAGAGA	GGAAT
	2	GCCAGTGTCTGTCTAGGGA	TTGGAT
Cpf1	1	ATGAGTCATCGGACTTCTAAGAT	TTTC
	2	TGGTGTATGAAACTAATCTGTCT	TTTG
	3	ATACACCACAAATCGAGGCTGTA	TTTC

мента BstXI–EcoRI в pAsCpf1(TYCV)(BB) (pY211) («Addgene», #89352) [23] на фрагмент BstXI–EcoRI из плазмиды pY010 (pcDNA3.1-hAsCpf1) («Addgene», #69982) [10].

Подбор нРНК осуществляли с использованием онлайн-программы Cas-Designer (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>) [24]. Последовательности протоспейсеров представлены в табл. 2.

Культивирование ЭСК крысы. Используемые в данной работе ЭСК крысы были получены и охарактеризованы ранее [17]. ЭСК культивировали на слое митотически инактивированных

фибробластов мыши в культуральной среде advanced N2B27, состоящей из смеси среды Neurobasal с добавкой B-27 и advanced DMEM/F-12 с добавкой N-2 в пропорции 1/1, кроме того в состав среды входит GlutaMAX, 5000 ЕД./мл смеси пенициллин/стрептомицин, 0,1 мМ 2-меркаптоэтанол, 1000 ЕД./мл LIF мыши, 1 мкМ PD0325901, 3 мкМ SHIR99021. Культуральные среды и добавки произведены в компании «Gibco» США, фактор, ингибирующий лейкемию мыши (LIF), PD0325901 и SHIR99021 – в компании «StemRD», США. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С, в атмосфере 5% CO₂ при 90% влажности. Рекомбинацию между loxP-сайтами индуцировали путём добавления 4-ОНТ («Sigma-Aldrich», США) в культуральную среду в концентрации 0,1 мкМ.

Электропорация ЭСК крысы. Клетки пассировали за 24 ч до электропорации и добавляли в культуральную среду ингибитор Rho-киназы Y-27632 («Abcam», Великобритания) в концентрации 5 мкМ. На следующий день ЭСК крысы дезагрегировали до одноклеточного состояния и промывали дважды PBS («Биолот», Россия). 4 × 10⁵ клеток ресуспендировали в 100 мкл буфера R (Invitrogen, США) с добавлением плазмидной ДНК и электропорировали с использованием прибора Neon Transfection System («Invitrogen», США). После электропорации ЭСК высаживали в новую ячейку с предварительно подогретой до 37 °С средой advanced N2B27 с добавлением 5 мкМ Y-27632 и не содержащей антибиотиков. На следующие сутки производили смену культуральной среды на advanced N2B27 без Y-27632 и с добавлением антибиотиков.

Для анализа активности различных CRISPR/Cas-систем мы электропорировали клетки 10 мкг плазмидной ДНК в молярном соотношении 1 : 1. Для интеграции трансгена мы использовали 4 мкг плазмиды, кодирующей nРНК, 6 мкг плазмиды, кодирующей Cpf1, и 3 мкг лиnearизованного донорного вектора.

Селекция ЭСК крысы на среде с антибиотиком. На третьи сутки после электропорации с донорным вектором и плазмидами системы CRISPR/Cpf1 ЭСК крысы пересаживали в клональной плотности на слой митотически-инактивированных фибробластов мыши линии DR4. В культуральную среду добавляли антибиотик G418 («Gibco», США) в концентрации 250 мкг/мл. Селекцию проводили в течение 7 дней. На восьмой день выжившие колонии механически пересаживали в отдельные лунки 48-луночного планшета и размножали для дальнейшего анализа и криоконсервации.

Выделение ДНК из ЭСК крысы и ПЦР-анализ. Выделение ДНК осуществляли с использо-

ванием реагента QuickExtract DNA Extraction Solution («Lucigen», США) по протоколу производителя. Полученный лизат разбавляли в 6 раз и использовали 3,5 мкл в реакции ПЦР. ПЦР проводили с помощью набора BioMaster HS-Taq ПЦР-Color («Биолабмикс», Россия) на амплификаторе T100 («Bio-Rad», США). Используемые в работе праймеры для ПЦР представлены в табл. 1.

Вестерн-блот-анализ. Клетки дезагрегировали, промывали дважды в PBS и лизировали в буфере RIPA (150 мМ NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% додецилсульфат натрия, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, ингибиторы протеаз («Roche», Германия)) в течение 30 мин при 4 °С и постоянном перемешивании. Лизаты центрифугировали при 13 500 g в течение 20 мин при 4 °С. Белки разделяли в денатурирующем 7%-ном полиакриламидном геле и переносили на PVDF-мембрану («Bio-Rad»). Мембрану блокировали в TBS (50 мМ Tris-HCl pH 7,6, 150 мМ NaCl), содержащем 0,1% (v/v) Tween 20 и 5% обезжиренного сухого молока («Cell Signaling Technology», США), затем инкубировали с антителами к Cre-рекомбиназе (кроличьи IgG, «Cell Signaling Technology», США, #12830, 1 : 1000) и к GAPDH (кроличьи IgG, «Cell Signaling Technology», США, #2118, 1 : 1000). Для детекции белков использовали вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Jackson ImmunoResearch», Великобритания, #111-035-144, 1 : 40 000), и набор Clarity Max Western ECL Substrate («Bio-Rad»).

Спонтанная дифференцировка *in vitro* и иммунофлуоресцентное окрашивание. Спонтанную дифференцировку ЭСК крысы проводили в монослое по описанному ранее протоколу [17]. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили на 21 день дифференцировки по протоколу, описанному ранее [25]. Для иммуноокрашивания использовали первичные антитела против TUBB3 (мышинные IgG, «BioLegend», США, #801201, 1 : 500), KRT18 (мышинные IgG, «Abcam», Великобритания, #ab668, 1 : 100), aSMA (мышинные IgG, «Dako», США, #M0851, 1 : 100) и вторичные антитела Goat anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 («Thermo Fisher Scientific», США, #A11029, 1 : 400), Goat anti-Mouse IgG2a Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568 («Thermo Fisher Scientific», #A21134, 1 : 400). Для окрашивания ядер использовали 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI, «Sigma-Aldrich»). Окрашенные клетки анализировали с использованием микроскопа Eclipse Ti-E («Nikon», Япония).

Выделение РНК, синтез кДНК и анализ экспрессии генов методом ОТ-ПЦР. РНК из кле-

ток выделяли с помощью реагента TRIzol («Invitrogen») и затем использовали в реакции синтеза кДНК по методу обратной транскрипции с помощью обратной транскриптазы SuperScript III («Invitrogen») и Random Hexamer Primer («Thermo Scientific», США). Уровень экспрессии определяли по методу полуколичественной ПЦР в реальном времени с использованием набора БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue («Биолабмикс») на приборе LightCycler 480 System («Roche»). Анализ уровня экспрессии проводили в трёх независимых повторах.

Проточная цитофлуориметрия. Анализ клеток методом проточной цитофлуориметрии проводили на приборе FACSAria III («Becton Dickinson», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Активность различных CRISPR/Cas систем в локусе *Rosa26* крысы. В настоящей работе мы решили протестировать три CRISPR-системы (SpCas9, SaCas9 и Cpf1 из *Acidaminococcus* sp. BV3L6) для внесения двуцепочечных разрывов в локус *Rosa26* крысы. Для систем CRISPR/SpCas9 и CRISPR/Cpf1 было подобрано по три нРНК, а для системы CRISPR/SaCas9 – две нРНК в первом интроне *Rosa26* (рис. 1, а, табл. 2). Выбранные нРНК клонировали в соответствующие плазмиды. Плазмиды доставляли в ЭСК крысы методом электропорации. Через 48 ч после электропорации из клеток вы-

деляли геномную ДНК, амплифицировали целевые участки с использованием пары праймеров, фланкирующих места внесения разрывов (пара F2 и R2 в табл. 1), и секвенировали ПЦР продукты по методу Сэнгера. Процент инсерций/делетий, образующихся в результате репарации двуцепочечных разрывов ДНК и свидетельствующий о примерной эффективности CRISPR-системы с конкретной нРНК, оценивали с использованием онлайн программы TIDE (<https://tide.nki.nl/>) [26]. Процент инсерций/делетий, генерируемый исследуемыми CRISPR-системами с выбранными нРНК, составил примерно от 30 до 60% (рис. 1, б). При этом наибольшую эффективность внесения разрывов в целевом участке ДНК показали системы CRISPR/SaCas9 с нРНК #1 и CRISPR/Cpf1 с нРНК #1. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные CRISPR-системы с выбранными нРНК могут быть использованы для интеграции трансгенов в первый интрон *Rosa26* в ЭСК крысы. Ранее в ряде исследований было показано, что Cpf1 демонстрирует низкую нецелевую активность по сравнению с Cas9 [27, 28]. На основании этого мы выбрали Cpf1 с нРНК #1 для дальнейших экспериментов по внесению трансгена в локус *Rosa26* крысы.

Получение ЭСК крысы, экспрессирующих тамоксифен-индуцируемую Cre-рекомбиназу. Для интеграции CreERT2 в локус *Rosa26* крысы мы создали плазмидный донорный вектор, несущий сайт сплайсинга аденовируса, ген устойчивости к неомицину и CreERT2. Данные элемен-

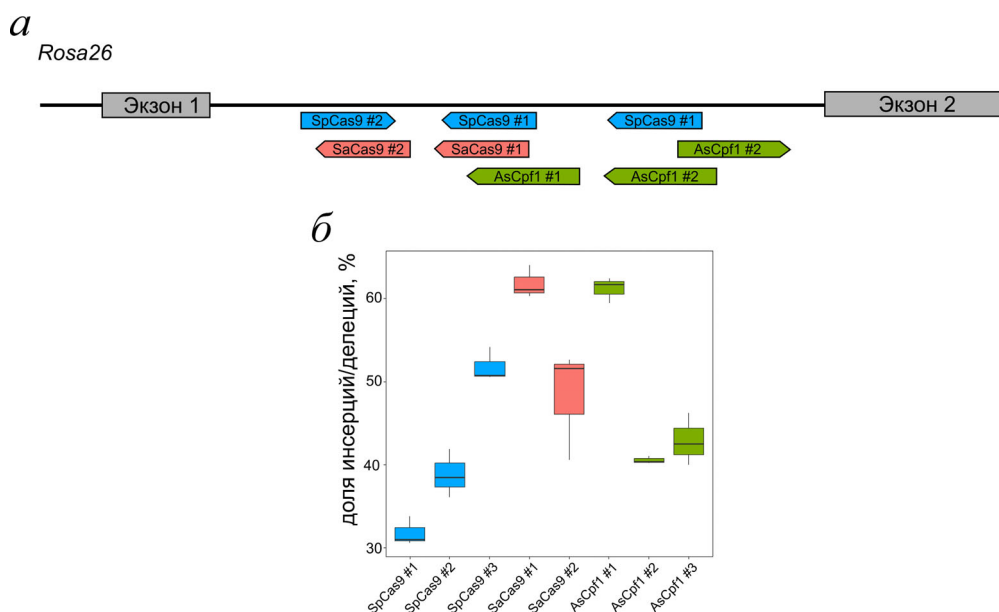


Рис. 1. а – Схема расположения выбранных протоспейсеров в локусе *Rosa26*; б – результаты анализа доли инсерций/делетий, полученных при действии CRISPR/Cas-систем с выбранными протоспейсерами. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

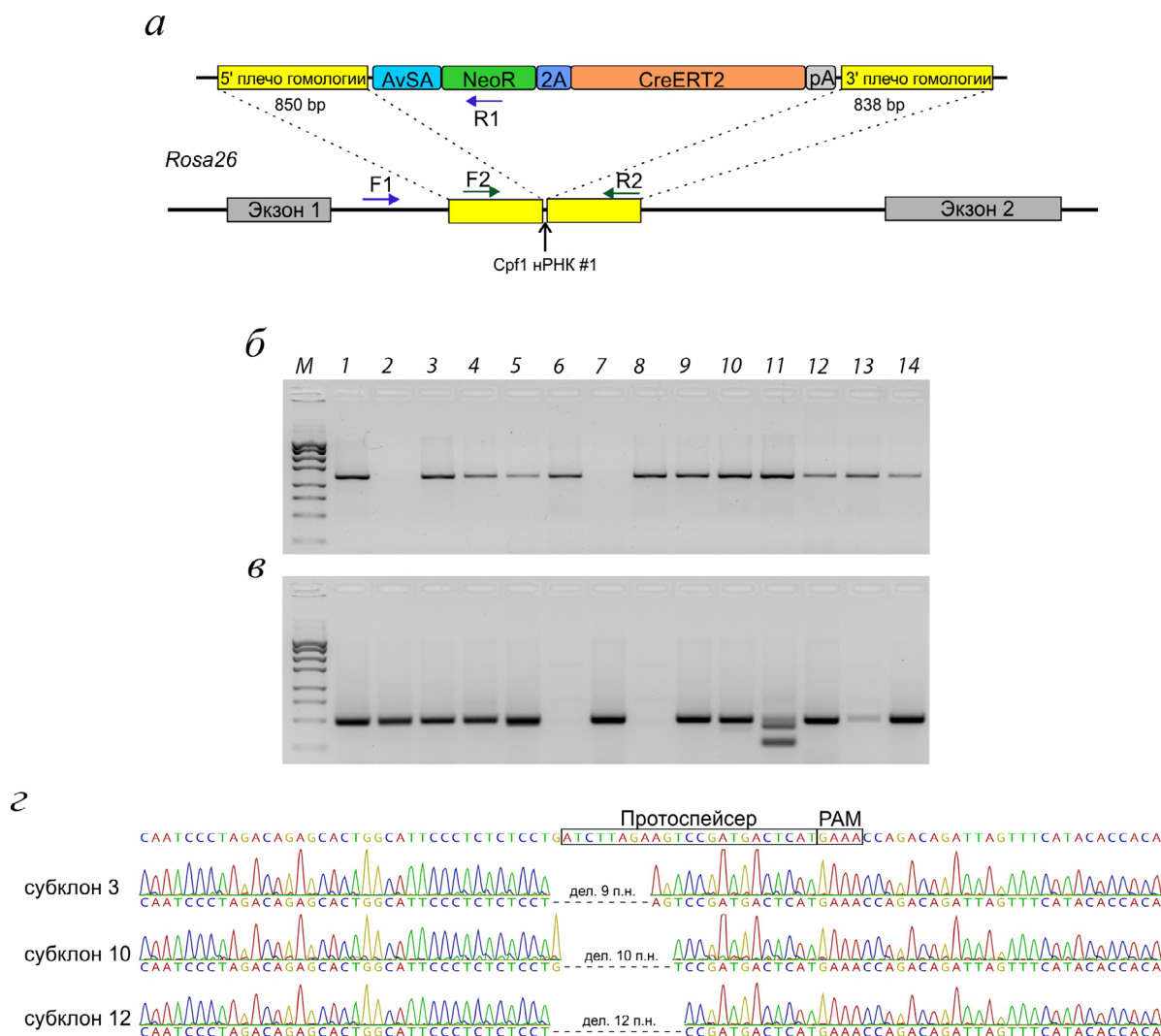


Рис. 2. *а* – Схема гомологичной рекомбинации в локусе *Rosa26*; *б* – результаты ПЦР-анализа субклонов на наличие целевой встройки трансгена в локус *Rosa26*; *М* – маркер молекулярного веса ДНК Start 250 («Биолабмикс»), *1–14* – полученные субклоны; *в* – результаты ПЦР-анализа субклонов с использованием пары праймеров, фланкирующих протоспейсер, отсутствие ПЦР-продукта свидетельствует о встройке трансгена в оба аллеля; *г* – результаты секвенирования второго аллеля *Rosa26* в трёх полученных субклонах

ты были фланкированы плечами гомологии (~800 п.н.) к первому интрону *Rosa26* (рис. 2, *а*).

ЭСК крысы (линия dB50) [17] были электропорированы линейаризованным донорным вектором и плазмидами, экспрессирующими Crf1 и нРНК #1. Через 24 ч после электропорации начали селекцию клеток на среде с антибиотиком G418, и проводили ее в течение 7 дней. В результате селекции было получено 14 субклонов ЭСК, которые затем были механически пересажены в отдельные лунки культуральной планшета и размножены. Полученные субклоны были проанализированы на наличие встройки трансгена с помощью ПЦР с парой праймеров F1 и R1, в результате анализа было показано, что 12 из них содержат целевую встрой-

ку (рис. 2, *б*). Для проверки, произошла ли встройка трансгена в один или два аллеля *Rosa26*, провели ПЦР-анализ с парой праймеров F2 и R2, фланкирующих сайт внесения двуцепочечного разрыва (рис. 2, *в*). В результате было выявлено два субклона (6 и 8), несущих встройку трансгена в оба аллеля. Секвенирование второго аллеля *Rosa26* в субклонах со встройкой только в одном аллеле показало, что в данных субклонах в районе протоспейсера содержатся короткие делеции (рис. 2, *г*).

Все полученные трансгенные субклоны ЭСК крысы сохранили морфологию, характерную для данного типа клеток (рис. 3, *а*). Далее мы выбрали три субклона, два из которых несли встройку в оба аллеля, для подтверждения того, что дан-

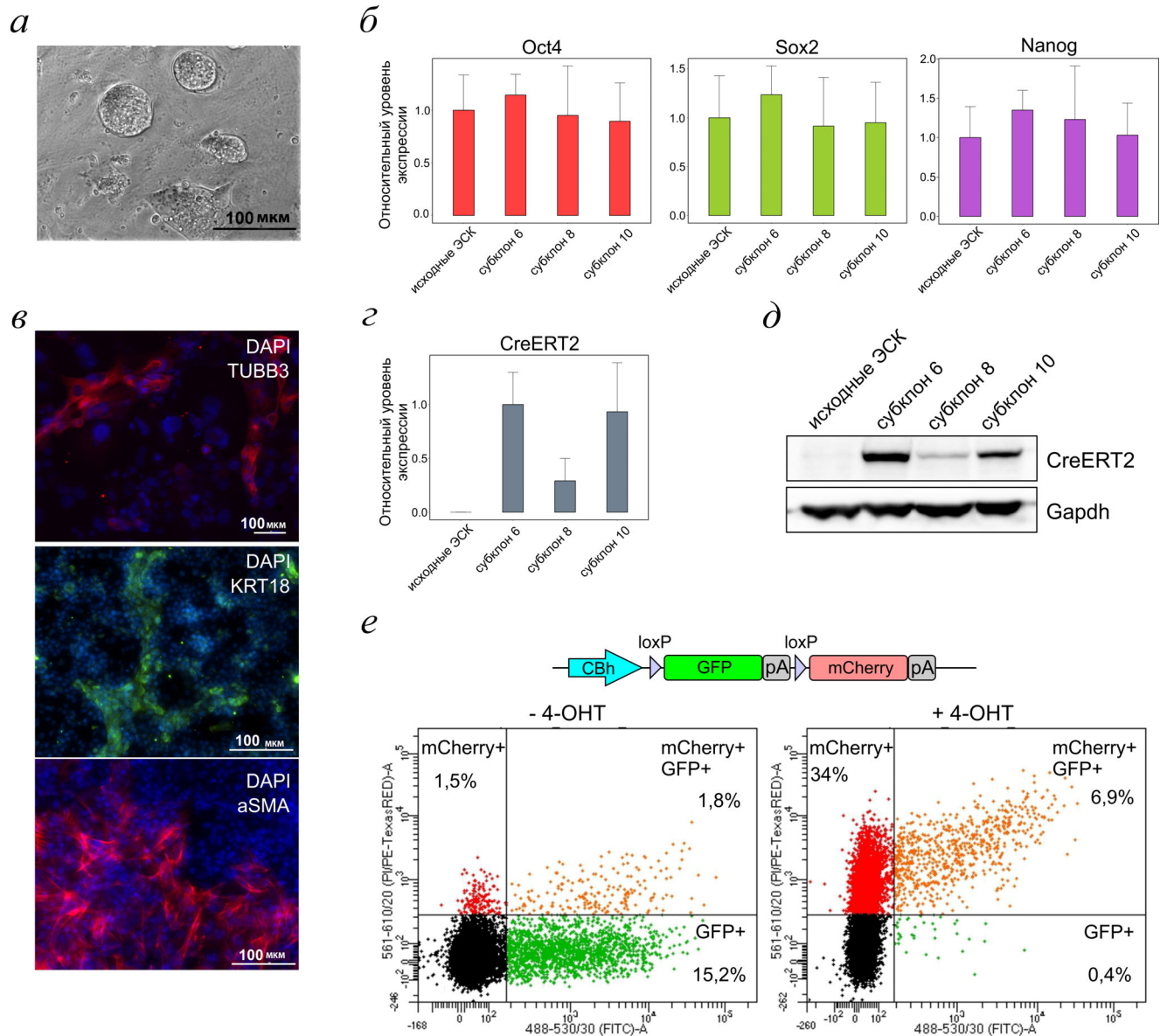


Рис. 3. Характеристика полученных трансгенных ЭСК крысы. *а* – Морфология колоний; *б* – относительный уровень экспрессии основных маркёров плюрипотентности в сравнении с исходной линией ЭСК, «усы» обозначают стандартное отклонение; *в* – иммунофлуоресцентное окрашивание производных, полученных при спонтанной дифференцировке *in vitro*, с использованием антител к маркёрам эктодермы (β -тубулин III, TUBB3), энтодермы (цитокератин-18, KRT18) и мезодермы (альфа-гладкомышечный актин, aSMA), ядра окрашены DAPI; *г* – относительный уровень экспрессии CreERT2 в полученных субклонах, нормирование на субклон 6, «усы» обозначают стандартное отклонение; *д* – результаты вестерн-блот-анализа с использованием антител против Cre-рекомбиназы и GAPDH в полученных субклонах; *е* – сверху – схема репортёрного вектора; снизу – результаты анализа на проточном цитофлуориметре трансгенных ЭСК, электропорированных репортёрным вектором без добавления и с добавлением 4-OHT

ные клетки сохранили плюрипотентные свойства, а также для анализа экспрессии трансгена. В результате было показано, что выбранные субклоны сохранили экспрессию основных маркёров плюрипотентности, а также способность образовывать производные всех трёх зародышевых листков при дифференцировке *in vitro* (рис. 3, б, в). С использованием методов ПЦР и вестерн-блоттинга была выявлена экспрессия

мРНК CreERT2 и наличие белка соответствующего размера (~75 кДа, рис. 3, г, д). При этом в субклоне 8 наблюдается сниженный уровень экспрессии мРНК CreERT2 и синтезируемого белка по сравнению с субклонами 6 и 10. Так как в случае Cre-рекомбиназы уровень экспрессии не влияет на функциональность трансгена, то можно заключить, что получено три субклона ЭСК крысы, экспрессирующих CreERT2.

Для того, чтобы подтвердить функциональность CreERT2 и его зависимость от тамоксифена в полученных субклонах ЭСК крысы, мы создали репортёрную конструкцию на основе плазмиды pTE4560 путём клонирования зелёного флуоресцентного белка (GFP) с сайтом полиадезилации фланкированными loxP-сайтами между CBh-промотором и геном *mCherry*. Фрагмент для клонирования был получен путём рестрикции плазмиды p212 pCMV-EGFP/RFP («Addgene», #8389) [29] по сайтам KpnI. Полученную репортёрную плазмиду электропорировали в трансгенные ЭСК без добавления и с добавлением 4-ОНТ в культуральную среду. В результате анализа на проточном цитофлуориметре было показано, что добавление 4-ОНТ приводит к индукции рекомбинации между loxP-сайтами и активации экспрессии *mCherry* (рис. 3, e).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенной нами работы были получены ЭСК крысы, экспрессирующие тамоксифен-зависимую Cre-рекомбиназу с использованием системы CRISPR/Cpf1. Полученные трансгенные клетки сохранили экспрессию основных маркёров плюрипотентности и способность дифференцироваться в производные всех трёх зародышевых листков. Зависимость Cre-рекомбиназы от тамоксифена была продемонстрирована с использованием репортёрного плазмидного вектора. В настоящее время проводится мало исследований на ЭСК крысы, несмотря на широкое применение данного животного в качестве модельного объекта в различных областях биологии. В связи с этим применение новых систем редактирования генома и получение новых трансгенных линий ЭСК крысы позволит расширить инструментарий для будущих исследований. Известно, что культивирование ЭСК крысы осложнено из-за их тенденции к спонтанной дифференцировке, особенно при низкой плотности клеток в культуре, которая необходима для получения субклонов при трансгенезе [30]. В данной работе мы подтвердили, что условия культивирования, опубликованные ранее и включающие применение advanced DMEM/F-12, а также добавление ингибитора Rho-киназы при электропорации, способствуют отбору субклонов после геномного редактирования [11].

Использование различных CRISPR-систем расширяет возможности для редактирования геномов. Нами было показано, что для встройки трансгенов в локус *Rosa26* крысы можно также использовать систему CRISPR/Cpf1 с высокой

эффективностью. Интеграция трансгена классическим способом без использования систем редактирования генома требует длинных плеч гомологии и даже после селекции на среде с антибиотиком имеет низкую эффективность [31, 32]. При этом в некоторых случаях исследователям не удавалось получить трансгенные ЭСК крысы без использования системы CRISPR/Cas9 [14]. В нашей работе мы использовали плечи гомологии ~800 п.н., селекцию на среде с антибиотиком, систему CRISPR/Cpf1, и в результате доля субклонов ЭСК с корректной целевой встройкой трансгена составила 85%. Около 14% от всего количества субклонов несли биаллельную встройку трансгена. Высокая эффективность внесения двуцепочечных разрывов с использованием Cpf1 привела также к тому, что в тех субклонах, которые несли моноаллельную встройку трансгена, второй аллель содержал короткие делеции, затрагивающие последовательность протоспейсера. Таким образом, в случае необходимости интеграции разных трансгенов в один локус лучше использовать стратегию одновременной встройки.

Важным моментом при использовании систем редактирования генома является возможность внесения нецелевых разрывов в ДНК. При подборе протоспейсеров мы учитывали предсказанные нецелевые эффекты и выбирали те, которые имеют наименьшее количество потенциальных нецелевых эффектов. В ряде работ на клетках человека уровень нецелевых эффектов был значительно ниже при использовании Cpf1 по сравнению с Cas9, что является существенным преимуществом при выборе CRISPR-системы [27, 28, 33, 34].

В настоящее время существует несколько подходов для получения индуцируемого нокаута. Часть из них основана на применении CRISPR/SpCas9-системы. Так, например, платформа iCRISPR основана на доксициклин-индуцируемой экспрессии Cas9, что требует интеграции двух трансгенов в геном клеток и последующей доставки нРНК [35]. При данном подходе получается неоднородная популяция клеток, только часть из которых несёт нокаут целевого гена. Доля таких клеток зависит от эффективности доставки нРНК, активности самой нРНК и доли мутаций со сдвигом рамки считывания. Эффективность нокаута можно увеличить за счёт использования нескольких нРНК [36]. Тем не менее применение iCRISPR-платформы для нокаута жизненно важных генов и в ходе дифференцировки клеток является затруднительным.

Система CreERT2/loxP широко используется для получения индуцируемого нокаута *in vivo* и *in vitro* [37, 38]. Применение CreERT2/loxP-

системы также позволяет провести нокаут во всех клетках в культуре, кроме того, с использованием данной системы можно проводить нокаут кластеров микроРНК, длинных некодирующих РНК и удалять регуляторные участки генома. Однако применение данной системы требует нескольких раундов трансгенеза клеток. В данной работе нами был пройден только первый этап. Далее требуется провести интеграцию loxP-сайтов для фланкирования целевых генов. Встройка loxP-сайтов может быть осуществлена с использованием плазмид или олигонуклеотидов в качестве донорной ДНК. Использование плазмид в качестве донорной ДНК может привести к нецелевой встройке в случайном районе генома, кроме того, конструирование донорного вектора может занять длительное время, особенно если требуется провести нокаут протяженного кластера микроРНК. Использование длинных олигонуклеотидов осложняется отсутствием селективного маркера, что в результате может привести к долгому поиску клонов с биаллельной встройкой. В одной из работ авторам удалось повысить эффективность встройки за счёт селекции клеток, в которых активно идёт процесс гомологичной рекомбинации [37]. В результате было показано, что биаллельная встройка двух loxP-сайтов может быть осуществлена за один раунд трансгенеза. Таким образом, адаптация подходов для получения корот-

ких встроек в геном ЭСК крысы является предметом дальнейших исследований.

В заключение, мы использовали систему редактирования генома CRISPR/Cpf1 для получения трансгенных ЭСК крысы, экспрессирующих тамоксифен-индуцируемую Cre-рекомбиназу. Полученные клетки представляют собой платформу для дальнейших исследований как в области редактирования генома, так и для изучения функций генов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-00022).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Шевченко Александру Игоревичу и Захаровой Ирине Сергеевне за помощь в спонтанной дифференцировке и иммунофлуоресцентном окрашивании, Медведеву Сергею Петровичу за сборку плазмиды pAsCpf1-2NLS, а также ЦКП «Геномика» СО РАН за анализ реакций секвенирования по Сэнгеру.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, **292**, 154-156.
- Martin, G. R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7634-7638, doi: 10.1073/pnas.78.12.7634.
- Smith, J. R., Bolton, E. R., and Dwinell, M. R. (2019) The rat: a model used in biomedical research, *Methods Mol. Biol.*, **2018**, 1-41, doi: 10.1007/978-1-4939-9581-3_1.
- Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., et al. (2008) Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts, *Cell*, **135**, 1287-1298, doi: 10.1016/j.cell.2008.12.007.
- Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., et al. (2008) Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts, *Cell*, **135**, 1299-1310, doi: 10.1016/j.cell.2008.12.006.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, **337**, 816-821, doi: 10.1126/science.1225829.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., and Chambon, P. (1997) Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 752-757, doi: 10.1006/bbrc.1997.7124.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., et al. (2020) Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants, *Nat. Rev. Microbiol.*, **18**, 67-83, doi: 10.1038/s41579-019-0299-x.
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., et al. (2015) *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9, *Nature*, **520**, 186-191, doi: 10.1038/nature14299.
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., et al. (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system, *Cell*, **163**, 759-771, doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038.
- Chen, Y., Spitzer, S., Agathou, S., Karadottir, R. T., and Smith, A. (2017) Gene editing in rat embryonic stem cells to produce *in vitro* models and *in vivo* reporters, *Stem Cell Rep.*, **9**, 1262-1274, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.09.005.
- Kobayashi, T., Kobayashi, H., Goto, T., Takashima, T., Oikawa, M., et al. (2020) Germline development in rat revealed by visualization and deletion of Prdm14, *Development*, **147**, doi: 10.1242/dev.183798.
- Li, W., Li, X., Li, T., Jiang, M. G., Wan, H., Luo, G. Z., et al. (2014) Genetic modification and screening in rat using haploid embryonic stem cells, *Cell Stem Cell*, **14**, 404-414, doi: 10.1016/j.stem.2013.11.016.
- Yamamoto, S., Ooshima, Y., Nakata, M., Yano, T., Nishimura, N., et al. (2015) Efficient gene-targeting in rat embryonic stem cells by CRISPR/Cas and generation of human kynurenine aminotransferase II (KAT II) knock-in rat, *Transgen. Res.*, **24**, 991-1001, doi: 10.1007/s11248-015-9909-1.
- Sherstyuk, V. V., Medvedev, S. P., Elisaphenko, E. A., Vaskova, E. A., Ri, M. T., et al. (2017) Genome-wide profiling and differential expression of microRNA in rat pluripotent stem cells, *Sci. Rep.*, **7**, 2787, doi: 10.1038/s41598-017-02632-0.

16. Sherstyuk, V. V., Yanshole, L. V., Zelentsova, E. A., Melnikov, A. D., Medvedev, S. P., et al. (2020) Comparative metabolomic profiling of rat embryonic and induced pluripotent stem cells, *Stem Cell Rev. Rep.*, **16**, 1256-1265, doi: 10.1007/s12015-020-10052-3.
17. Vaskova, E. A., Medvedev, S. P., Sorokina, A. E., Nemudryy, A. A., Elisaphenko, E. A., et al. (2015) Transcriptome characteristics and X-chromosome inactivation status in cultured rat pluripotent stem cells, *Stem Cells Dev.*, **24**, 2912-2924, doi: 10.1089/scd.2015.0204.
18. Sladitschek, H. L., and Neveu, P. A. (2015) MXS-chaining: a highly efficient cloning platform for imaging and flow cytometry approaches in mammalian systems, *PLoS One*, **10**, e0124958, doi: 10.1371/journal.pone.0124958.
19. DeKolver, R. C., Choi, V. M., Moehle, E. A., Paschon, D. E., Hockemeyer, D., et al. (2010) Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome, *Genome Res.*, **20**, 1133-1142, doi: 10.1101/gr.106773.110.
20. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, *Science*, **339**, 819-823, doi: 10.1126/science.1231143.
21. Swiech, L., Heidenreich, M., Banerjee, A., Habib, N., Li, Y., et al. (2015) *In vivo* interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9, *Nat. Biotechnol.*, **33**, 102-106, doi: 10.1038/nbt.3055.
22. Toth, E., Czene, B. C., Kulcsar, P. I., Krausz, S. L., Talas, A., et al. (2018) Mb- and FnCpf1 nucleases are active in mammalian cells: activities and PAM preferences of four wild-type Cpf1 nucleases and of their altered PAM specificity variants, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 10272-10285, doi: 10.1093/nar/gky815.
23. Gao, L., Cox, D. B. T., Yan, W. X., Manteiga, J. C., Schneider, M. W., et al. (2017) Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities, *Nat. Biotechnol.*, **35**, 789-792, doi: 10.1038/nbt.3900.
24. Park, J., Bae, S., and Kim, J. S. (2015) Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites, *Bioinformatics*, **31**, 4014-4016, doi: 10.1093/bioinformatics/btv537.
25. Vaskova, E. A., Demytyeva, E. V., Shevchenko, A. I., Pavlova, S. V., Grigor'eva, E. V., et al. (2014) Dynamics of the two heterochromatin types during imprinted X chromosome inactivation in vole *Microtus levis*, *PLoS One*, **9**, e88256, doi: 10.1371/journal.pone.0088256.
26. Brinkman, E. K., Chen, T., Amendola, M., and van Steensel, B. (2014) Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition, *Nucleic Acids Res.*, **42**, e168, doi: 10.1093/nar/gku936.
27. Kim, D., Kim, J., Hur, J. K., Been, K. W., Yoon, S. H., and Kim, J. S. (2016) Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells, *Nat. Biotechnol.*, **34**, 863-868, doi: 10.1038/nbt.3609.
28. Kleinstiver, B. P., Tsai, S. Q., Prew, M. S., Nguyen, N. T., Welch, M. M., et al. (2016) Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells, *Nat. Biotechnol.*, **34**, 869-874, doi: 10.1038/nbt.3620.
29. Kaczmarczyk, S. J., and Green, J. E. (2001) A single vector containing modified Cre recombinase and LOX recombination sequences for inducible tissue-specific amplification of gene expression, *Nucleic Acids Res.*, **29**, E56-56, doi: 10.1093/nar/29.12.e56.
30. Blair, K., Leitch, H. G., Mansfield, W., Dumeau, C. E., Humphreys, P., and Smith, A. G. (2012) Culture parameters for stable expansion, genetic modification and germline transmission of rat pluripotent stem cells, *Biol. Open*, **1**, 58-65, doi: 10.1242/bio.2011029.
31. Kobayashi, T., Kato-Itoh, M., Yamaguchi, T., Tamura, C., Sanbo, M., et al. (2012) Identification of rat Rosa26 locus enables generation of knock-in rat lines ubiquitously expressing tdTomato, *Stem Cells Dev.*, **21**, 2981-2986, doi: 10.1089/scd.2012.0065.
32. Tong, C., Li, P., Wu, N. L., Yan, Y., and Ying, Q. L. (2010) Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells, *Nature*, **467**, 211-213, doi: 10.1038/nature09368.
33. Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., et al. (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 822-826, doi: 10.1038/nbt.2623.
34. Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J. P., Ma, E., Doudna, J. A., and Liu, D. R. (2013) High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 839-843, doi: 10.1038/nbt.2673.
35. Gonzalez, F., Zhu, Z., Shi, Z. D., Lelli, K., Verma, N., et al. (2014) An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, **15**, 215-226, doi: 10.1016/j.stem.2014.05.018.
36. Wu, M., Liu, S., Gao, Y., Bai, H., Machairaki, V., et al. (2018) Conditional gene knockout and reconstitution in human iPSCs with an inducible Cas9 system, *Stem Cell Res.*, **29**, 6-14, doi: 10.1016/j.scr.2018.03.003.
37. Flehr, M., and Buhler, M. (2015) Single-step generation of conditional knockout mouse embryonic stem cells, *Cell Rep.*, **12**, 709-716, doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.051.
38. Friedel, R. H., Wurst, W., Wefers, B., and Kuhn, R. (2011) Generating conditional knockout mice, *Methods Mol. Biol.*, **693**, 205-231, doi: 10.1007/978-1-60761-974-1_12.

GENERATION OF TRANSGENIC RAT EMBRYONIC STEM CELLS USING THE CRISPR/Cpf1 SYSTEM FOR INDUCIBLE GENE KNOCKOUT

V. V. Sherstyuk* and S. M. Zakian

The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: svv@bionet.nsc.ru

Rat embryonic stem cells (ESCs) play an important role in the studies of genes involved in maintaining of pluripotent state and early development of this model organism. To study functions of the essential genes, as well as the processes of cell differentiation, the method of induced knockout is widely used. The CreERT2/loxP system allows obtaining an inducible knockout in cells expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase (CreERT2) and containing loxP sites flanking the target gene by adding 4-hydroxy tamoxifen to the culture medium. However, the rat ESC lines expressing CreERT2 are absent. In this work, we tested three CRISPR/Cas systems for introduction of double-strand breaks into the *Rosa26* locus in the rat ESCs and inserted tamoxifen-dependent Cre recombinase into this locus using the CRISPR/Cpf1 system. It was shown that the obtained transgenic rat ESC lines retained the characteristics of pluripotent cells. Tamoxifen-inducible Cre recombinase activity was analyzed using a reporter vector.

Keywords: embryonic stem cells, rat, CRISPR/Cas, genome editing, Cre recombinase

УДК 577.1

УЧАСТИЕ КАРБОАНГИДРАЗЫ САНЗ В СТРУКТУРНО- ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СТАБИЛИЗАЦИИ ВОДООКИСЛЯЮЩЕГО КОМПЛЕКСА ФОТОСИСТЕМЫ 2 ИЗ *Chlamydomonas reinhardtii*

© 2021 А.К. Шукшина, В.В. Терентьев*

Институт фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ
«Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
142290 Пушкино Московской обл., Россия; электронная почта: v.v.terentyev@gmail.com

Поступила в редакцию 26.02.2021

После доработки 19.05.2021

Принята к публикации 19.05.2021

Участие карбоангидраз (КА) и КА-активности в функционировании фотосистемы 2 (ФС2) изучается давно и показано во многих работах. Однако на данный момент только для САНЗ из *Chlamydomonas reinhardtii* имеются доказательства её ассоциации с донорной стороной ФС2, где КА-активность САНЗ может оказывать влияние на функционирование водоокисляющего комплекса (ВОК). Результаты нашей работы свидетельствуют о том, что САНЗ также участвует в организации нативной структуры ВОК независимо от её КА-активности. Показано, что у препаратов ФС2 из дикого типа (ДТ) *C. reinhardtii* высокая O_2 -выделяющая активность ВОК прослеживается вплоть до 100 мМ NaCl в среде измерения и практически не снижается при увеличении времени инкубации с NaCl. При этом функция ВОК в ФС2 из мутанта *cia3*, лишённого САНЗ, значительно подавляется уже при концентрациях NaCl выше 35 мМ, достигая 50% при 100 мМ NaCl и увеличенном времени инкубации препаратов. Предполагается, что отсутствие САНЗ в ФС2 из *cia3* вызывает нарушение нативной структуры ВОК, позволяя более масштабные конформационные изменения его белков и, как следствие, подавление функции активного центра ВОК при повышении ионной силы среды. Результаты вестерн-блот-анализа свидетельствуют о более затруднённом удалении белка PsbP в ФС2 из *cia3* при повышенных концентрациях NaCl, по-видимому, за счёт изменений в межмолекулярных взаимодействиях между белками ВОК при отсутствии САНЗ. При этом значения максимального квантового выхода ФС2 практически не отличались у препаратов из ДТ и *cia3*, указывая на отсутствие влияния САНЗ на фотоиндуцированный перенос электронов в реакционном центре ФС2. Полученные результаты указывают на участие белка САНЗ в нативной организации ВОК и, как следствие, в стабилизации его функционального состояния в ФС2 из *C. reinhardtii*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Chlamydomonas reinhardtii*, карбоангидраза САНЗ, фотосистема 2, водоокисляющий комплекс, O_2 -выделяющая активность, белок PsbP.

DOI: 10.31857/S0320972521070058

ВВЕДЕНИЕ

Металлсодержащие ферменты карбоангидразы (ЕС 4.2.1.1) (КА), катализирующие медленную спонтанную реакцию $CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$, широко представлены в фотосинтезирующих организмах [1–5].

В зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, являющейся классическим модельным объектом для изучения фотосинтеза, присутствует 12 генов, кодирующих различные изоформы КА, относящиеся к трём независимым (из 8 известных на сегодняшний день) α , β

и γ семействам [3, 5, 6]. Недавно КА-подобные белки стромы хлоропласта LC1B и LC1C (Low- CO_2 Inducible B- и C-белки соответственно), образующие при активации CO_2 -концентрирующего механизма (СКМ) димерные комплексы LC1B–LC1C, окружающие пиреноид [7], также отнесли к β -КА, хотя показать КА-активность комплекса LC1B–LC1C, содержащего один атом Zn, авторам не удалось [8]. Считается, что большинство КА в *C. reinhardtii* прямо или опосредованно вовлечены в СКМ, значительно повышающий содержание C_i (CO_2 и HCO_3^-) в строме хлоропласта [9]. Это необходимо для смещения активности рибулозо-1,5-бифосфат карбоксилазы-оксигеназы (ЕС 4.1.1.39) (Рубиско) в сторону ассимиляции CO_2 в цикле Кальвина–Бенсона [10].

САНЗ является последней из трёх α -КА найденных в *C. reinhardtii*. Как было установлено, фермент локализуется в люмене тилакои-

Принятые сокращения: БК – бикарбонат, HCO_3^- ; ВОК – водоокисляющий комплекс; ДТ – дикый тип; *cia3* – мутант, лишённый САНЗ в люмене тилакоидов; КА – карбоангидраза; СКМ – CO_2 -концентрирующий механизм; ФС2 – фотосистема 2; Хл – хлорофилл; ЭА – этоксизоламид.

* Адресат для корреспонденции.

дов [11, 12]. Изначально для САНЗ также было предположено участие в СКМ [11, 12], и в ходе дальнейших исследований это предположение отчасти подтверждалось. Так, с помощью иммунодетекции с использованием первичных антител к САНЗ и электронной микроскопии было показано высокое присутствие белка САНЗ в люмене тилакоидов, пронизывающих пиреноид. Предполагалось, что ускорение ферментом реакции дегидратации бикарбоната (БК) ($\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) повышает там количество CO_2 , который свободно диффундирует через тилакоидную мембрану к Рубиско, сконцентрированной в пиреноиде [13, 14]. Более того, было показано, что фосфорилирование САНЗ при активации СКМ приводит к повышению содержания молекул фермента в тилакоидах пиреноида [15].

Тем не менее одновременно с этим было определено, что уровень экспрессии гена, кодирующего САНЗ, слабо варьирует даже при значительном снижении содержания CO_2 [15, 16] в отличие от уровней экспрессии генов других КА, участие которых в СКМ было установлено [16]. Подавление формирования пиреноида, т.е. блокирование активации СКМ, также не оказывало влияния на уровень экспрессии этого гена [17].

В ряде работ было показано, что САНЗ является мембраносвязанным белком в значительном количестве присутствующим в мембранных препаратах, обогащённых фотосистемой 2 (ФС2) [15, 18–21], но отсутствующим в мембранах ламелл, содержащих преимущественно комплексы фотосистемы 1 и цитохромного b_6f -комплекса [18, 19]. Добавление рекомбинантного белка САНЗ к препаратам ФС2, изолированным из мутанта *cia3*, лишённого САНЗ, показало полное связывание белка с мембранной фракцией, т.е. с ФС2 [22].

Отсутствие белка САНЗ в люмене тилакоидов в *cia3* приводило к значительному фотоингибированию функции ФС2 светом интенсивностью 2200 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ в отличие от дикого типа (ДТ), что полностью предотвращалось добавлением избытка БК [19]. В то же время одинаковая с *cia3* степень фотоингибирования ФС2 в клетках ДТ наблюдалась в присутствии ингибитора КА этоксиизоламида (ЭА) [19]. Для ДТ в присутствии ЭА также было показано значительно сниженное стимулирование фотосинтетического выделения O_2 низкими концентрациями БК (0–60 мкМ) в среде, обеднённой по $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$, в результате чего кривая зависимости O_2 -выделяющей активности от концентрации БК была близка к таковой, полученной для *cia3* [18]. Все это свидетельствовало о том, что САНЗ за счёт своей КА-активности оказывает

влияние на функционирование ФС2, вероятно, взаимодействуя с её донорной стороной [18, 19].

Исследования по реконструкции фотосинтетической активности ФС2 из *cia3* рекомбинантным белком САНЗ в среде, обеднённой по $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ при pH 5,5, показало возрастание O_2 -выделяющей активности ФС2 в присутствии БК более чем на 70%, при этом максимальное стимулирование наблюдалось уже при 250 мкМ БК [22]. Также было определено, что для проявления максимальной фотосинтетической активности ФС2 рекомбинантный белок САНЗ должен присутствовать (связаться) с ней в соотношении 1/1 [22]. Было предположено, что дегидратазная КА-активность САНЗ ускоряет реакцию между протонами и ионами БК, стимулируя таким образом отвод H^+ от активного центра водоокисляющего комплекса (ВОК), поддерживая его высокую активность [22]. Это предположение согласовывалось с данными, полученными при pH > 6,5 [20, 21]. Так, отсутствие САНЗ (*cia3*) приводило к более выраженному подавлению фотосинтетической активности ФС2 при смещении pH от оптимального для ВОК диапазона (6,2–6,5) в сторону щелочных значений. При pH 7,0 разница между фотосинтетическими активностями ФС2 из ДТ и *cia3* была максимальной и достигала ~20%. При этом ингибиторы КА снижали активность ФС2 из ДТ до уровня *cia3*, указывая на роль КА-активности САНЗ. В свою очередь, добавление БК восстанавливало активность ФС2 из *cia3* до уровня ДТ, указывая на роль реакции между ионами БК и протонами (дегидратазное направление), выделяющимися от ВОК со скоростью до 75 H^+/c [20].

Гидратазная КА-активность САНЗ ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) была определена как для рекомбинантного белка со значением ~300 единиц Вильбур–Андерсона на 1 мг белка [23], так и для мембранных препаратов, обогащённых ФС2, со значением 30–50 единиц Вильбур–Андерсона на 1 мг хлорофилла (Хл) [15, 20]. Изучение этой активности САНЗ с помощью масс-спектрометрии выявило необычный для α -КА pH-оптимум в области 6,5, что удивительно совпадает с pH-оптимумом для ВОК [24].

Функциональная активность ВОК определяется белками, входящими в его состав и окружающими его активный центр. Для зеленых водорослей и высших растений это в основном три белка – PsbO, PsbP и PsbQ [25, 26]. Удаление даже одного из них приводит к значительным конформационным изменениям в нативной структуре ВОК [27], в том числе и в белковом окружении его активного центра, и, как следствие, к критическому снижению его активности [28, 29]. Состав и свойства (в том числе pH и

ионная сила) среды, в которую обращён ВОК и которая *in vivo* представлена люменом тилакоида, по-видимому, также могут оказывать влияние на активность «собранного» ВОК через конформационные изменения белков. Имеются данные о возможном участии белка САНЗ в организации нативной структуры ВОК. Например, было обнаружено, что ФС2 из *cia3* характеризуются повышенным содержанием низкопотенциальной редокс-формы цитохрома *b559*, белка корового комплекса ФС2, по сравнению с ФС2 из ДТ [21]. Согласно литературным данным, нарушение нативной структуры ВОК приводит к увеличению доли низкопотенциальной редокс-формы цитохрома *b559* [30, 31], по-видимому, в результате взаимодействия белка PsbE цитохрома *b559* с белком PsbP ВОК [32]. В то же время с помощью быстрой ОJ(I)P-кинетики возрастания флуоресценции Хл *a* были получены данные, свидетельствующие о затруднённом переносе электронов между Q_A и Q_B на акцепторной стороне ФС2 из *cia3* по сравнению с ФС2 из ДТ [21], что могло быть следствием конформационных изменений белков кора ФС2 [33–35], вызванных нарушением структуры ВОК при отсутствии САНЗ. Значительные конформационные изменения суперкомплекса ФС2, вызванные удалением отдельных белков ВОК, были ранее показаны с помощью электронной микроскопии с последующим анализом одночастичных изображений [36]. При этом кинетика окисления Q_A после единичной насыщающей вспышки действительно замедлялась, что свидетельствовало о снижении скорости переноса электронов между Q_A и Q_B [37, 38].

Таким образом, белок САНЗ может локализоваться в непосредственной близости от белков ВОК, оказывая влияние на их пространственную организацию, тем более что присутствие САНЗ в изолированных коровых комплексах ФС2 было ранее показано [15, 19]. Как следствие, сборка ВОК в отсутствие САНЗ может приводить к появлению небольших изменений в его нативной структуре, что не оказывает влияния на функцию ВОК при оптимальных условиях, но явно проявляется при неоптимальных или стрессовых условиях, таких как смещённый pH [20–22], высокий свет [19], низкий уровень CO_2/HCO_3^- [18, 19, 22].

В данной работе мы изучали функциональное и структурное состояния ВОК в препаратах ФС2 из ДТ и *cia3 C. reinhardtii* в широком диапазоне значений ионной силы в среде измерения при оптимальном для функционирования ВОК pH 6,5. Полученные данные свидетельствовали о структурной роли белка САНЗ в нативной организации ВОК, поддерживающей его O_2 -выде-

ляющую активность вплоть до 100 мМ NaCl, по-видимому, за счёт сохранения конформационной структуры всего комплекса, в том числе активного центра ВОК. Роль САНЗ обсуждается в сравнении с белками ВОК, в частности с PsbP, удаление или отсутствие которого критически сказывается на функции ВОК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали мембранные препараты, обогащенные ФС2, изолированные из двух штаммов зеленой микроводоросли *C. reinhardtii*: мутант, лишенный клеточной стенки CC-503 cw92 mt+, используемый в данном исследовании в качестве ДТ, и двойной мутант *cia3*, лишенный клеточной стенки и карбоангидразы САНЗ в люмене тилакоидов. Оба штамма использовались в опубликованных ранее работах [15, 18–22]. Культуры водорослей выращивали в одинаковых условиях при температуре 25 °С, продувании воздухом, обогащенным 5% CO_2 , непрерывном освещении люминесцентными лампами («холодный» белый свет) с интенсивностью света 90–100 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Клетки собирали на экспоненциальной фазе роста.

Для изолирования ФС2 применяли методику, описанную ранее [20, 21], с изменениями. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 g, 10 мин, осадок ресуспендировали в охлажденном буфере А (50 мМ Hepes-NaOH, pH 7,8, 100 мМ NaCl, 2 мМ EDTA). Непосредственно перед разрушением клеток в буфер А добавляли аскорбат Na до конечной концентрации 1 мМ. Клетки разрушали с помощью механического гомогенизатора типа Beadbeater («BioSpec», США) с использованием 0,5 мм циркониевых бус (zirconia/silica, «BioSpec»), 4 цикла по 30 с охлаждением ячейки во льду между циклами в течение 3–5 мин. На финальном этапе мембранные препараты, обогащенные ФС2, ресуспендировали в охлажденном буфере С (20 мМ MES-NaOH, pH 6,5, 15 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$, 300 мМ сахароза) до концентрации 2–4 мг Хл/мл, гомогенизировали в присутствии 10% (v/v) глицерина и хранили при –70 °С.

Общую концентрацию Хл в препаратах определяли спектрофотометрически после экстракции пигментов 80%-ным ацетоном [39].

Скорость фотосинтетического выделения O_2 измеряли при 25 °С с помощью электрода Кларка в 1-мл ячейке («Hansatech», Великобритания) в среде, содержащей 20 мМ MES-NaOH, pH 6,5 и 400 мМ сахарозы. Концентрацию NaCl в среде измерения варьировали от 0 до 500 мМ в зависи-

мости от эксперимента. В качестве экзогенных доноров электрона использовали 1 мМ феррицианид К и 0,2 мМ 2,6-дихлоро-*p*-бензохинон. Интенсивность насыщающего света ($\lambda > 600$ нм) составляла 1950 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Концентрация Хл в ячейке во время измерений была 10 мкг/мл. Перед включением освещения препараты уравнивали в ячейке со средой измерения в течение 3 мин. Полученные результаты нормировались к значениям, измеренным при 35 мМ NaCl, которые у ФС2 из ДТ и *cia3* были близки и находились в диапазоне 275–283 мкмоль O₂ (мг Хл·ч)⁻¹.

Переменную флуоресценцию Хл ФС2 измеряли с помощью ХЕ-РАМ-флуориметра («Walz», Германия) в 1-см кварцевой кювете при постоянном перемешивании в той же среде и при той же концентрации Хл, что и при измерении скорости фотосинтетического выделения O₂. Максимальный квантовый выход ФС2 рассчитывали по формуле: $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$, где F_o – фоновый уровень флуоресценции препаратов, адаптированных к темноте, а F_m – фотоиндуцированный насыщающим светом ($\lambda > 650$ нм) максимальный уровень флуоресценции.

Для вестерн-блот-анализа препараты отбирались из ячейки после измерения скорости выделения O₂. Мембранную фракцию, содержащую ФС2, отделяли центрифугированием при 12 000 g, 10 мин. Белки, содержащиеся в супернатанте, осаждали добавлением 1/5 части 50%-ного водного раствора трихлоруксусной кислоты, последующей инкубацией в течение 1–2 ч и центрифугированием при 12 000 g, 10 мин. Полученные осадки трижды промывали 100%-ным ледяным ацетоном и подсушивали на воздухе в течение ночи. Осадки мембранной фракции и белков из супернатантов растворяли в буфере для нанесения (50 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 8 М мочевины, 3% Ds-Na, 0,005% бромфеноловый синий, 10% сахара, 5% меркаптоэтанол), прогревали 3 мин при 95 °С и центрифугировали 10 мин при 12 000 g. Супернатанты отбирали для нанесения на гель.

Электрофорез в денатурирующих условиях и вестерн-блот-анализ проводили так же, как было описано ранее с использованием камеры Mini-PROTEAN 3 Cell («Bio-Rad», США) [20, 21], с небольшими изменениями. Для электрофоретического разделения белков использовали 12,5%-ный Ds-Na-ПААГ. Препараты наносили из расчёта 1 мкг Хл/дорожка, исходя из концентрации Хл, равной 10 мкг/мл при проведении экспериментов. Электрофорез проводили при постоянном напряжении в режиме (на 2 геля) 100 В в концентрирующем геле (20 мин) и 200 В в разрешающем ге-

ле (60–70 мин). После электрофореза белки переносили на PVDF-мембрану (Immun-Blot PVDF Membrane 0,2 мкм, «Bio-Rad») с использованием модуля для мокрого блоттинга Mini Trans-Blot («BioRad») при постоянной силе тока 270 мА, 40 мин. О полноте переноса судили по отсутствию полос исследуемых белков в ПААГ, окрашенном после блоттинга. Мембраны инкубировали с первичными антителами против белков D1 (PsbA), PsbO и PsbP (соответственно AS11 1786, AS06 142-33 и AS06 142-23 («Agriser», Швеция)) в течение ночи при 4 °С при разведении 1 : 2000. Со вторичными антителами, меченными пероксидазой хрена («GE Healthcare», США), мембраны инкубировали в течение 1 ч при разведении 1 : 5000. Детектирование проводили с помощью набора Pierce ECL Plus («Thermo Scientific», США) и системы для гель-документирования ChemiDoc XRS+ («Bio-Rad»). Относительную оптическую плотность полос определяли с помощью программы Image J.

Окрашивание мажорных белковых полос на PVDF-мембране после проведения детектирования блота проводили с помощью 0,2%-ного раствора Понсо в 5%-ной ледяной уксусной кислоте (3–5 с) с последующей отмывкой в дистиллированной воде до осветления фона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты работы свидетельствовали о том, что при pH 6,5 O₂-выделяющая активность ФС2 из ДТ *C. reinhardtii* слабо изменяется (в пределах 10%) в диапазоне концентраций NaCl 5–100 мМ с максимальными значениями активности при 35 мМ и 50 мМ NaCl (рис. 1, а). Это согласовывалось с имеющимися в литературе данными об активности ВОК в ФС2 из *C. reinhardtii* при разных концентрациях NaCl [28, 29]. Снижение концентрации NaCl в среде измерения до 2 и 0 мМ приводило к подавлению скорости выделения O₂ препаратами до 85% и 70% соответственно. Согласно ранее опубликованным данным, это могло быть результатом удаления ионов Cl⁻ из мест их локализации вблизи активного центра ВОК, что, как известно, негативно влияет на его функциональное состояние [40] (см. также обсуждение в статье Terentyev et al. [20]). Препараты ФС2 из *cia3* показывали схожую с ФС2 из ДТ концентрационную зависимость O₂-выделяющей активности от NaCl от 0 до 35 мМ, где она была максимальной (100%) (рис. 1, а). Значения скоростей выделения O₂ ФС2 из ДТ и *cia3* при 35 мМ NaCl были близки (см. «Материалы и методы») и, со-

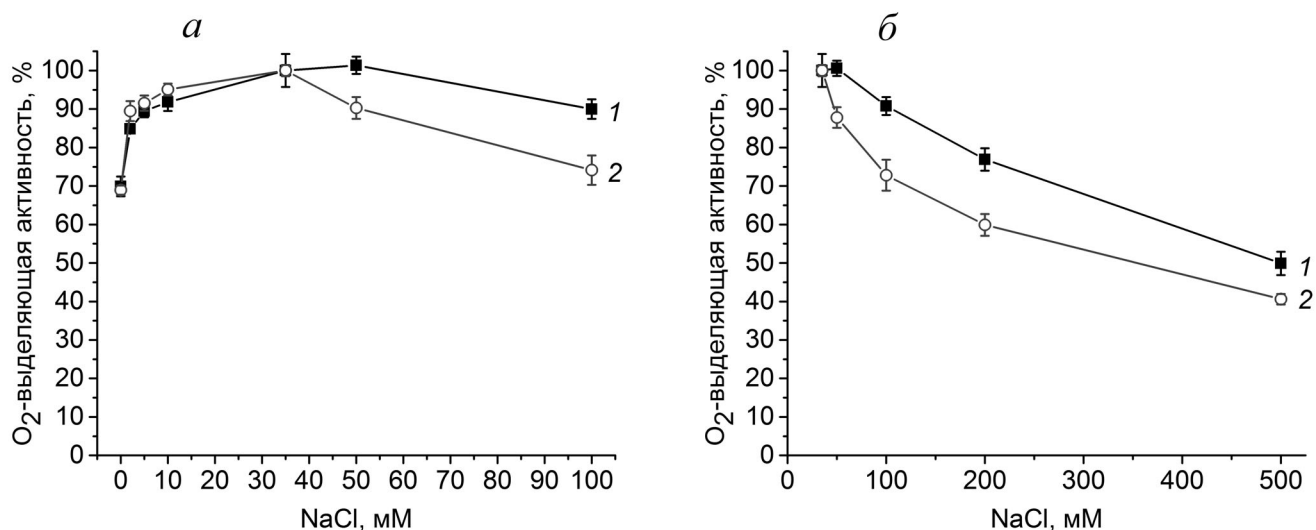


Рис. 1. Зависимость скорости фотосинтетического выделения O_2 препаратами ФС2 из ДТ (1) и *cia3* (2) от концентрации NaCl в среде измерения при оптимальном для активности ВОК pH 6,5. Исследуемый диапазон концентраций NaCl – 0–100 мМ (а) и 35–500 мМ (б). Данные нормированы к значениям, полученным при 35 мМ NaCl. Результаты представляют средние значения \pm стандартные отклонения ($n = 4-7$)

ответственно, приняты за 100%. Однако в отличие от ДТ повышение концентрации NaCl выше 35 мМ подавляло скорость выделения O_2 препаратами ФС2 из *cia3*, так что при 50 мМ NaCl она снижалась до ~90%, а при 100 мМ NaCl – уже до ~75%.

Значительное увеличение концентрации NaCl в среде измерения, которое должно было вызвать сильные конформационные изменения белков ВОК, действительно приводило к подавлению O_2 -выделяющей активности ФС2 из ДТ до 75% при 200 мМ NaCl, что соответствовало данным, полученным ранее на ФС2 из шпината [41], и до 50% – при 500 мМ NaCl (рис. 1, б). В тех же условиях активность ВОК в ФС2 из *cia3* подавлялась на 10–15% сильнее. Результаты свидетельствовали о более выраженном негативном влиянии повышения ионной силы раствора на функциональную активность ВОК в ФС2 из *cia3*, что могло быть следствием более выраженных конформационных изменений белков ВОК. Наиболее вероятно, что причиной этого могло быть изначальное присутствие некоего структурного нарушения в нативной организации ВОК у *cia3* по сравнению с ДТ, вызванного отсутствием белка САН3, что согласуется с нашим недавним предположением [21].

Дополнительное инкубирование препаратов в присутствии 35, 50 и 100 мМ NaCl практически не оказывало влияния на ФС2 из ДТ. Через 30 мин при всех трёх концентрациях O_2 -выделяющая активность снижалась не более чем на 10% (рис. 2), что было скорее результатом влияния инкубации препаратов при повышен-

ной до 25 °С температуре в ячейке измерения, чем действием ионной силы раствора. Схожая небольшая потеря скорости выделения O_2 отмечалась и в случае ФС2 из *cia3* при инкубации с 35 мМ NaCl, однако при 50 и 100 мМ NaCl наблюдалось дополнительное подавление активности ВОК, значительно возрастающее со временем инкубации (рис. 2). В результате O_2 -выделяющая активность ФС2 из *cia3* снижалась примерно на 12% и 19% через 15 мин и на 17% и 31% – через 30 мин инкубации при концентрации NaCl соответственно 50 и 100 мМ относительно значений, наблюдаемых без дополнительной инкубации препаратов. В итоге через 30 мин при 100 мМ NaCl потеря активности ВОК у ФС2 из *cia3* достигала 50%.

Однако эффективность преобразования поглощенной световой энергии ФС2, определяемая как максимальный квантовый выход (F_v/F_m), практически не изменялась у препаратов из ДТ и *cia3* при концентрациях 35, 50 и 100 мМ NaCl (рис. 3). Более того, дополнительная инкубация ФС2 из ДТ и *cia3* с NaCl лишь незначительно и практически в одинаковой степени снижала значение F_v/F_m (максимально не более чем на 12%), что, вернее всего, как это было описано выше, являлось результатом инкубации препаратов при 25 °С, чем действием ионной силы среды. Эти результаты указывали на независимость фотоиндуцированного переноса электронов в реакционном центре ФС2 от присутствия или отсутствия белка САН3. Таким образом, отсутствие белка САН3 в препаратах ФС2 влияло только на функциональное состояние ВОК.

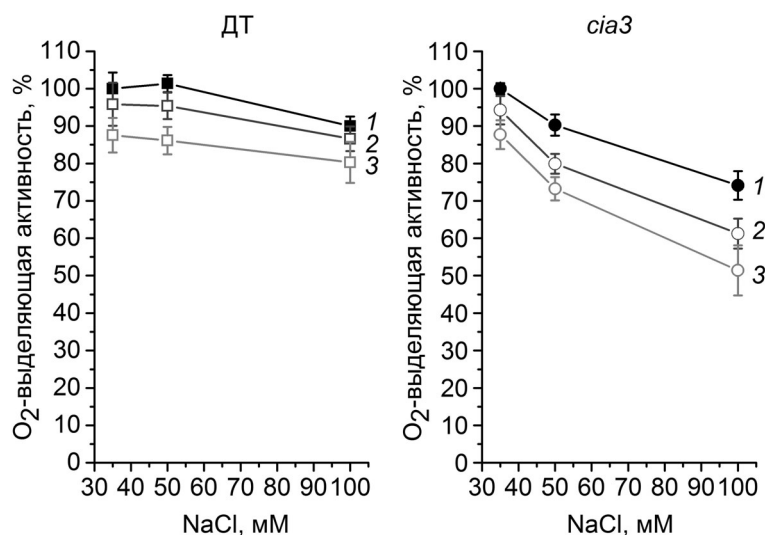


Рис. 2. Зависимость O₂-выделяющей активности ФС2 из ДТ и *cia3* при разных концентрациях NaCl в среде измерения от времени инкубации при 25 °С. 1 – Без дополнительной инкубации, 2 – 15 мин инкубации, 3 – 30 мин инкубации. Данные нормированы к значениям, полученным при 35 мМ NaCl. Результаты представляют средние значения ± стандартные отклонения (*n* = 3–7)

При этом эксперименты, проведенные в присутствии 0,5 мкМ ЭА, известного ингибитора КА, показали полное отсутствие его влияния на зависимость O₂-выделяющей активности ФС2 из ДТ (также как и из *cia3*) от концентрации NaCl (рис. 4). Это указывало на то, что наб-

людаемые отличия в скорости выделения O₂ в ФС2 из ДТ и *cia3* при концентрациях NaCl выше 35 мМ (рис. 1 и 2) не были обусловлены КА-активностью САНЗ.

С помощью вестерн-блот-анализа (рис. 5) были исследованы препараты ФС2, отобранные

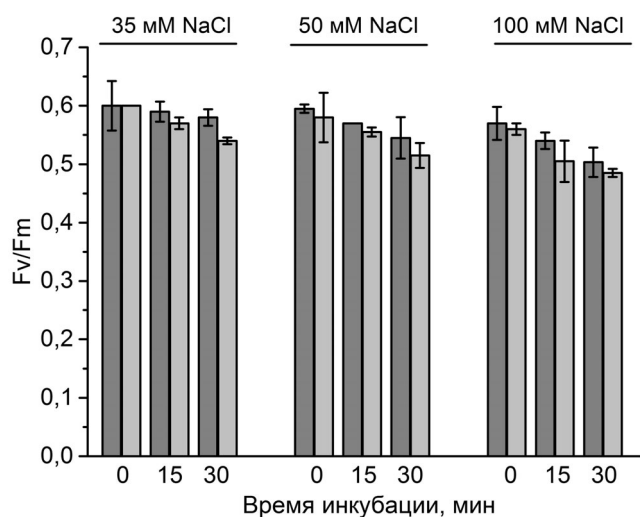


Рис. 3. Эффективность преобразования поглощенной световой энергии в ФС2 из ДТ (темно-серые колонки) и *cia3* (светло-серые колонки) при концентрации NaCl в среде измерения, соответственно 35, 50 и 100 мМ, и времени дополнительной инкубации, указанной под колонками. Учитывая время, необходимое для установившегося состояния препаратов со средой измерения, «0» соответствует 3 мин инкубации. Результаты представляют средние значения ± стандартные отклонения (*n* = 3)

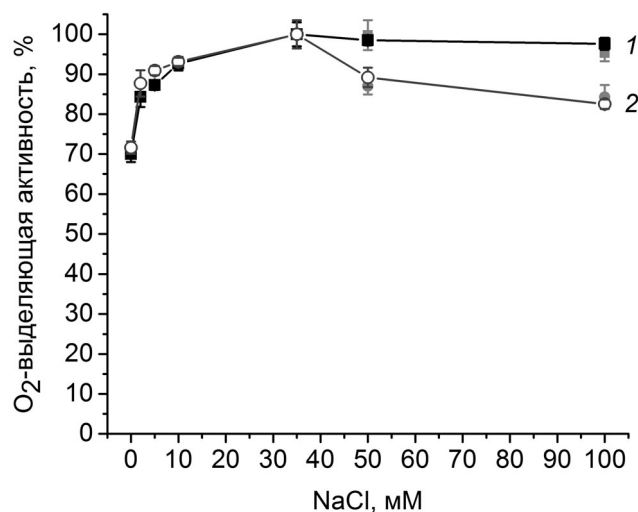


Рис. 4. Влияние ингибитора КА на скорость фотосинтетического выделения O₂ препаратами ФС2 из ДТ (1) и *cia3* (2) при разных концентрациях NaCl в среде измерения. Каждое измерение проводили в присутствии 0,5 мкМ ЭА в ячейке. Значения O₂-выделяющей активности ФС2 из ДТ и *cia3*, полученные при отсутствии ЭА, показаны серыми квадратами и кружками при 50 и 100 мМ NaCl соответственно. Данные нормированы к значениям, полученным при 35 мМ NaCl. Результаты представляют средние значения ± стандартные отклонения (*n* = 3)

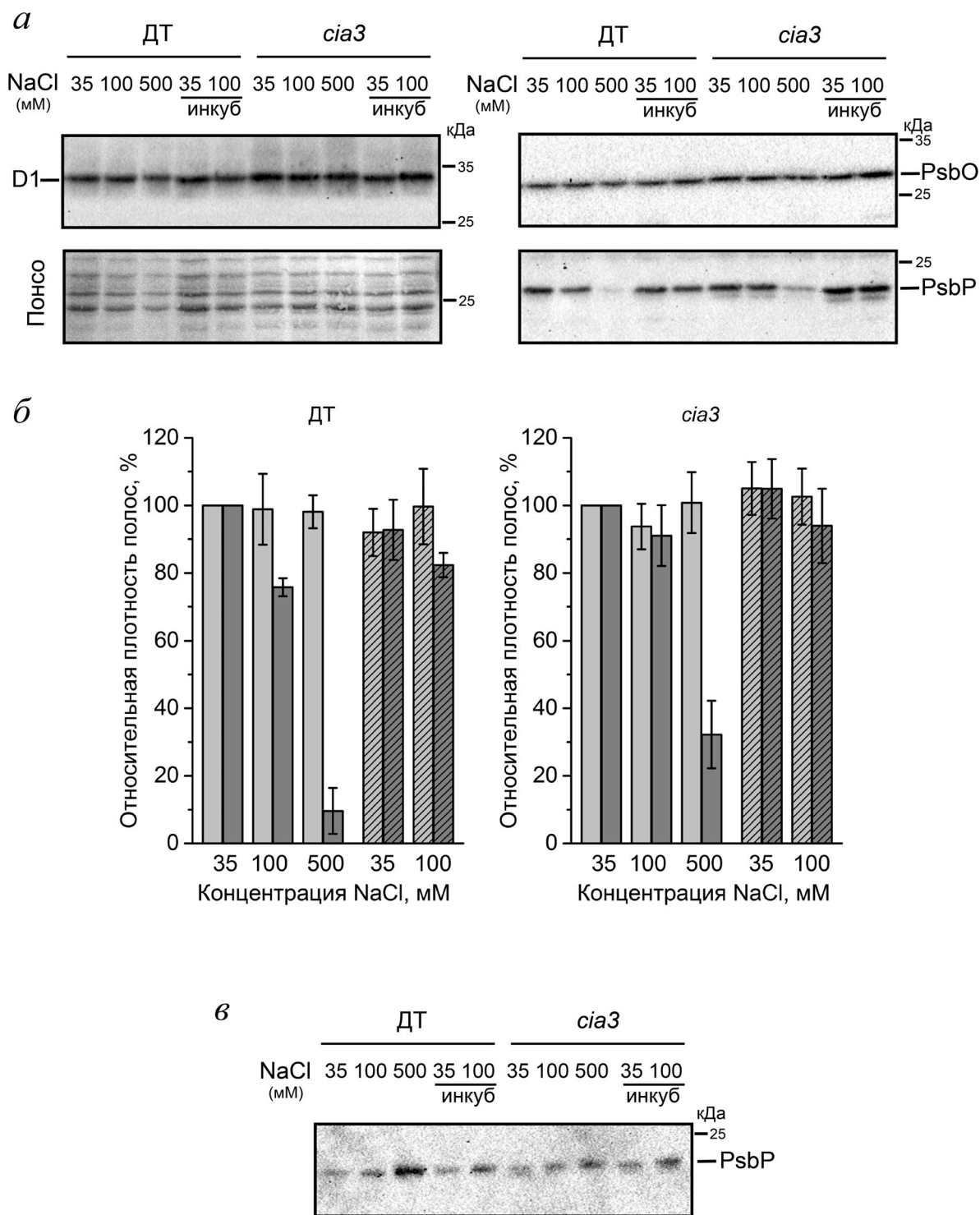


Рис. 5. Вестерн-блот-анализ препаратов ФС2 из ДТ и *cia3*, отобранных после экспериментов, представленных на рис. 1 и 2. *а* – Вестерн-блоты осажденных из образцов мембранных препаратов ФС2 из ДТ и *cia3* с использованием первичных антител против белков D1, PsbO и PsbP, а также PVDF-мембрана, окрашенная Понсо. Над дорожками указаны концентрации NaCl, при которых проводились эксперименты. «Инкуб» обозначает препараты, инкубированные 30 мин при указанной концентрации NaCl. *б* – Относительная плотность полос белков PsbO (светло-серые колонки) и PsbP (темно-серые колонки), нормированных к значениям, полученным для соответствующих полос белка D1. Заштрихованные колонки – это препараты, инкубированные 30 мин. Значения, полученные при 35 мМ NaCl, использовались для PsbO и PsbP как 100% на каждом вестерн-блоте отдельно для ФС2 из ДТ и *cia3*. Результаты представляют средние значения \pm стандартные отклонения ($n = 3$). *в* – Вестерн-блот белков, осажденных из супернатантов после удаления мембранной фракции ФС2 (*а*), с использованием первичных антител против белка PsbP

из ячейки после проведения измерений скорости выделения O_2 при разных концентрациях NaCl (см. «Материалы и методы»), в том числе и после инкубации с NaCl в течение 30 мин (рис. 1 и 2). Использовали антитела против белка D1, который является белком корового комплекса ФС2 и к интенсивности сигнала которого были нормированы результаты, полученные для других белков. Это было необходимо, поскольку сам отбор препаратов, как и осаждение ФС2 при разных концентрациях NaCl, приводили к потерям препаратов и, как следствие, к различиям в конечном содержании белков в образцах (рис. 5, а). Также использовали антитела к белкам PsbO и PsbP, которые являются белками ВОК. Сравнение результатов при 35 мМ NaCl по белкам PsbO и PsbP, нормированных к интенсивности соответствующих полос D1, показало схожие значения для ФС2 из ДТ и *cia3* (соответственно $104 \pm 6,3\%$ и $97 \pm 4,6\%$ для белка PsbO и $95 \pm 9,1\%$ и $105 \pm 10,0\%$ для белка PsbP), что свидетельствовало об одинаковом содержании этих белков в составе ВОК в ФС2 из ДТ и *cia3*. Это полностью согласовывалось с нашими данными, опубликованными ранее [21].

При повышении концентрации NaCl содержание белка PsbO не изменялось как в препаратах из ДТ, так и из *cia3* по отношению к D1 (рис. 5, б), что согласовывалось с известными литературными данными [29, 42]. В отличие от этого содержание белка PsbP в препаратах из ДТ и *cia3* имело тенденцию к уменьшению и было более выражено в ФС2 из ДТ. Так, содержание PsbP в ФС2 из ДТ снижалось до ~75% уже при 100 мМ NaCl, а при 500 мМ NaCl оставалось ~10% белка. В то же время содержание PsbP в ФС2 из *cia3* не уменьшалось при 100 мМ NaCl, и даже при 500 мМ NaCl в составе ВОК оставалось ~30% белка, т.е. более чем в 3 раза больше по сравнению с ДТ (рис. 5). Интересно, что дополнительная инкубация ФС2 из ДТ и *cia3* в течение 30 мин в присутствии 100 мМ NaCl не усиливала удаление белка PsbP, несмотря на то, что O_2 -выделяющая активность ФС2 из *cia3* в этом случае снижалась вдвое (рис. 2).

Вестерн-блот-анализ супернатантов после удаления из них мембранной фракции, содержащей ФС2, показал возрастание содержания PsbP при повышении концентрации NaCl (рис. 5, в). Максимальное количество PsbP в супернатанте наблюдалось при 500 мМ NaCl, при этом было значительно выше в случае ФС2 из ДТ по сравнению с препаратами из *cia3*. Это согласовывалось с данными по удалению белка PsbP из ФС2 в мембранной фракции (рис. 5, а).

Белки D1 и PsbO не детектировались в препаратах супернатантов при всех исследуемых концентрациях NaCl (не показано).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты, полученные в нашей предыдущей работе [21], указывали на присутствие небольших структурных нарушений в нативной организации ВОК в ФС2 из *cia3*, вызванных отсутствием белка САНЗ (см. «Введение»). В частности, повышение pH вызывало более сильные конформационные изменения белков, в том числе белков ВОК в ФС2 из *cia3* по сравнению с ФС2 из ДТ [21], что, в свою очередь, значительно снижало функциональную активность ВОК [20, 21].

С использованием препаратов из разных окисленных организмов (высших растений, красных водорослей, цианобактерий) ранее было показано, что удаление даже одного из белков ВОК приводит к конформационным изменениям всего комплекса [27, 43–45], что негативно сказывается на функции активного центра ВОК даже при оптимальных условиях изменения, происходящих в его ближайшем белковом окружении, несмотря на сохранность в структуре его лигандов [43, 45]. Однако при оптимальных условиях, таких как pH 6,5, 35 мМ NaCl, 25 °C и др., значительных отличий в функциональном состоянии ВОК (O_2 -выделяющая активность, восстановление дихлорофенолиндофенола от воды) в ФС2 из ДТ и *cia3* *S. reinhardtii* не наблюдалось как в этой (рис. 1 и 4), так и в предыдущих работах [20, 21]. Это указывало на то, что нарушения в нативной структуре ВОК, вызванные отсутствием САНЗ, по-видимому, были не настолько критичны, как, например, при удалении PsbP, что приводило к значительной потере активности ВОК ФС2 из *S. reinhardtii* [28, 46].

Данное предположение согласовывалось с результатами по влиянию сниженных концентраций ионов Cl^- на функцию ВОК (рис. 1, а). Так, следствием отсутствия (мутанты, не содержащие PsbP, например, FUD39 и BF25 [28, 46]) или удаления белка PsbP из ФС2, а немного в меньшей степени и белка PsbQ, было появление сильной зависимости функции ВОК от ионов Cl^- [28, 29, 40, 47]. В этом случае ВОК достигал максимальной активности только при концентрациях NaCl выше 10–20 мМ [28, 40, 47], в то время как для «собранного» ВОК в ФС2 из *S. reinhardtii* эта зависимость от Cl^- была довольно низкой с константой диссоциации (K_d) ~30 мкМ [28]. Как следует из результатов,

представленных на рис. 1, а и 4, O₂-выделяющая активность препаратов в диапазоне концентраций NaCl 2–35 мМ изменялась в небольших пределах (не более 10%, а при 2 мМ NaCl – на ~15%), а кривая зависимости скорости выделения O₂ от концентрации NaCl была практически идентичной для ФС2 из ДТ и *cia3*. Даже при отсутствии NaCl в среде измерения O₂-выделяющая активность ФС2 из ДТ и *cia3* снижалась одинаково и не более чем на 30%, что согласовывалось с данными для ФС2 с «собранным» ВОК [40], поскольку удаление в этом случае белков PsbP, PsbQ или PsbP + PsbQ приводило к значительному (>80%) подавлению функции ВОК [28, 40].

Высокая скорость выделения O₂ препаратами ФС2 из ДТ *S. reinhardtii*, как было показано ранее, прослеживалась исследователями вплоть до 100 мМ NaCl [29], что также было характерным и для ФС2 из высших растений [40]. Устойчивость конформационной структуры белков ВОК к подобному повышению ионной силы раствора, вероятно, отражает физиологические условия его функционирования. Несмотря на то что предполагаемая концентрация ионов Cl⁻ в хлоропласте довольно низкая (~1–3 мМ), активный транспорт ионов Cl⁻ через тилакоидную мембрану на свету может приводить к значительному увеличению (до 50 раз) содержания ионов Cl⁻ в небольшом объеме люмена [48, 49]. При этом полученные в экспериментах с ФС2 из *cia3* результаты свидетельствовали об индуцировании конформационных изменений белков ВОК повышением ионной силы, негативно отражающихся на O₂-выделяющей активности, уже при концентрациях NaCl > 35 мМ (рис. 1 и 4). Т.е. при отсутствии САН3 белки ВОК имели гораздо большую возможность к конформационным изменениям, поскольку структура ВОК, по-видимому, была более «рыхлой».

Более того, были получены свидетельства даже об изменении межмолекулярных взаимодействий белков ВОК при отсутствии САН3. Как следует из данных вестерн-блот-анализа, в ФС2 из *cia3* была отмечена значительно более низкая степень удаления белка PsbP из ВОК при повышенных концентрациях NaCl по сравнению с наблюдаемым для ФС2 из ДТ (рис. 5). Вероятно, это было следствием появления дополнительных гидрофобных или электростатических связей между PsbP и другими белками в результате отсутствия белка САН3 в месте его локализации в ВОК. Стоит отметить, что для САН3 как раз предполагается гидрофобное или/и электростатическое взаимодействие с донорной стороной ФС2 [19]. Интересно, что для гена, кодирующего PsbP, ранее был обнаружен

более высокий уровень экспрессии в *cia3* (по сравнению с ДТ), хотя уровни экспрессии генов, кодирующих другие белки ФС2, например, D1 и PsbO, а также белков фотосистемы 1, были одинаковыми в ДТ и *cia3* [19]. При этом наши результаты свидетельствуют о схожем содержании самого белка PsbP в препаратах ФС2 из ДТ и *cia3* (см. «Результаты исследования»). Таким образом, отсутствие САН3 в люмене тилакоида изменяет интенсивность экспрессии гена, кодирующего белок именно ВОК (PsbP), для которого в данной работе мы показываем значительно измененные взаимодействия с другими белками.

Для селективного удаления (отмывки) белков PsbP и PsbQ из ФС2 высших растений обычно применяется инкубация препаратов с 1 М NaCl [30, 42, 50], что позволяет удалить подавляющую часть PsbP и PsbQ из ВОК (до 97%), в то время как PsbO полностью остается [42]. Как было показано ранее, при подобной NaCl-обработке в ФС2 из *S. reinhardtii* наблюдается только частичное удаление белков PsbP и PsbQ [29]. Однако, согласно результатам нашей работы, практически полное (~90%) удаление белка PsbP в ФС2 из ДТ наблюдалось уже при 500 мМ NaCl даже при отсутствии длительной инкубации, при том, что содержание PsbO в ФС2 оставалось неизменным (рис. 5). Наиболее вероятно, что такая высокая степень удаления PsbP была связана с повышенной температурой в ячейке (25 °С) и освещением ФС2 насыщающим светом при измерении скорости выделения O₂ (см. «Материалы и методы» и статью Terentyev et al. [21]), после чего препараты отбирали для проведения вестерн-блот-анализа. В литературе имеются данные, что освещение стимулирует удаление PsbP и PsbQ из ВОК [29, 42].

В таких экспериментальных условиях ~20% белка PsbP в препаратах ФС2 из ДТ отмывалось уже при 100 мМ NaCl (рис. 5), что, вероятно, определяло наблюдаемое снижение O₂-выделяющей функции (рис. 1 и 2). При этом дополнительное инкубирование до 30 мин не увеличивало количество удаленного PsbP из ВОК (рис. 5) и практически не снижало скорость выделения O₂ препаратами из ДТ (рис. 2). В отличие от этого, в ФС2 из *cia3* белок PsbP почти полностью сохранялся при 100 мМ NaCl даже после 30 мин инкубации (рис. 5), хотя O₂-выделяющая активность в этом случае подавлялась до ~75% уже до инкубации, а после 30 мин инкубации – снижалась до ~50% (рис. 2). Эти результаты поддерживали предположение о более масштабных конформационных изменениях белков ВОК в ФС2 из *cia3*, индуцируемых повышением ионной силы. Более того, они указывали на основную роль

подобных изменений в наблюдаемом подавлении функции активного центра ВОК при повышении концентрации NaCl в диапазоне 35–100 мМ. Стоит отметить также, что, согласно полученным данным, конформационные перестройки белков ВОК в ФС2 из *cia3* ещё и значительно усиливались со временем.

Ранее было показано, что КА-активность САНЗ может значительно стимулировать O₂-выделяющую активность ВОК в присутствии ионов БК, как было предположено, за счёт ускорения дегидратазной реакции, что стимулировало отвод протонов, возникающих там в большом количестве в результате окисления воды [20–22], от активного центра ВОК (см. «Введение»). Это позволяло проявлять и поддерживать максимальную эффективность активного центра, поскольку локальное закисление пространства около него внутри ВОК может ингибировать его функцию [22]. Полученные нами результаты по влиянию ингибитора ЭА, который, как было показано ранее, при концентрациях 0,2–0,5 мкМ полностью подавлял стимулирующий эффект САНЗ на фотосинтетическую активность ФС2 [20–22], свидетельствовали об отсутствии его влияния на O₂-выделяющую активность в ФС2 из ДТ при концентрациях до 100 мМ NaCl (рис. 4). С одной стороны, это согласовывалось с нашими предыдущими данными об отсутствии влияния ингибиторов КА на активность ВОК при оптимальном pH 6,5 в случае как ДТ, так и *cia3* [20]. С другой стороны, это указывало на то, что наблюдаемое ингибирование

активности ВОК в ФС2 из *cia3* при повышении концентрации NaCl (рис 1, а) было результатом конформационных перестроек, сказывающихся в том числе и на ближайшем белковом окружении активного центра ВОК и приводящих к снижению самого уровня его функциональности. Т.е. это не было следствием локальных условий, например, сильного закисления, как это было сказано выше, не позволяющих достичь максимального уровня его активности, как это наблюдалось в предыдущих работах [20–22].

Таким образом, полученные результаты явно свидетельствуют о том, что белок САНЗ участвует в формировании нативной структуры ВОК ФС2 из *C. reinhardtii*, которая препятствует масштабным конформационным перестройкам его белков при значительном изменении ионной силы среды, что, соответственно, обуславливает сохранение высокой O₂-выделяющей активности ВОК в широком диапазоне физиологически возможных концентраций NaCl (2–100 мМ).

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-34-90056.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rudenko, N. N., Fedorchuk, T. P., Terentyev, V. V., Dymova, O. V., Naydov, I. A., et al. (2020) The role of carbonic anhydrase α -CA4 in the adaptive reactions of photosynthetic apparatus: the study with α -CA4 knockout plants, *Protoplasma*, **257**, 489-499, doi: 10.1007/s00709-019-01456-1.
- Rudenko, N. N., Ignatova, L. K., Nadeeva-Zhurikova, E. M., Fedorchuk, T. P., Ivanov, B. N., and Borisova-Mubarakshina, M. M. (2020) Advances in understanding the physiological role and locations of carbonic anhydrases in C3 plant cells, *Protoplasma*, doi: 10.1007/s00709-020-01566-1.
- Aspatwar, A., Haapanen, S., and Parkkila, S. (2018) An update on the metabolic roles of carbonic anhydrases in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Metabolites*, **8**, 22, doi: 10.3390/metabo8010022.
- DiMario, R. J., Machingura, M. C., Waldrop, G. L., and Moroney, J. V. (2018) The many types of carbonic anhydrases in photosynthetic organisms, *Plant Sci.*, **268**, 11-17, doi: 10.1016/j.plantsci.2017.12.002.
- Rudenko, N. N., Ignatova, L. K., Fedorchuk, T. P., and Ivanov, B. N. (2015) Carbonic anhydrases in photosynthetic cells of higher plants, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 674-687, doi: 10.1134/S0006297915060048.
- Jensen, E. L., Maberly, S. C., and Gontero, B. (2020) Insights on the functions and ecophysiological relevance of the diverse carbonic anhydrases in microalgae, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2922, doi: 10.3390/ijms21082922.
- Wang, Y., and Spalding, M. H. (2014) Acclimation to very low CO₂: contribution of limiting CO₂ inducible proteins, LCIB and LCIA, to inorganic carbon uptake in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.*, **166**, 2040-2050, doi: 10.1104/pp.114.248294.
- Jin, S., Sun, J., Wunder, T., Tang, D., Cousins, A. B., et al. (2016) Structural insights into the LCIB protein family reveals a new group of β -carbonic anhydrases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 14716-14721, doi: 10.1073/pnas.1616294113.
- Yamano, T., Sato, E., Iguchi, H., Fukuda, Y., and Fukuzawa, H. (2015) Characterization of cooperative bicarbonate uptake into chloroplast stroma in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 7315-7320, doi: 10.1073/pnas.1501659112.
- Bauwe, H., Hagemann, M., and Fernie, A. R. (2010) Photorespiration: players, partners and origin, *Trends Plant Sci.*, **15**, 330-336, doi: 10.1016/j.tplants.2010.03.006.
- Karlsson, J., Ciarke, A. K., Chen, Z. Y., Huggins, S. Y., Park, Y., et al. (1998) A novel α -type carbonic anhydrase

- associated with the thylakoid membrane in *Chlamydomonas reinhardtii* is required for growth at ambient CO₂, *EMBO J.*, **17**, 1208-1216, doi: 10.1093/emboj/17.5.1208.
12. Karlsson, J., Hiltonen, T., Husic, H. D., Ramazanov, Z., and Samuelsson, G. (1995) Intracellular carbonic anhydrase of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.*, **109**, 533-539, doi: 10.1104/pp.109.2.533.
 13. Sinetova, M. A., Kupriyanova, E. V., Markelova, A. G., Allakhverdiev, S. I., and Pronina, N. A. (2012) Identification and functional role of the carbonic anhydrase Cah3 in thylakoid membranes of pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1817**, 1248-1255, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.014.
 14. Markelova, A. G., Sinetova, M. P., Kupriyanova, E. V., and Pronina, N. A. (2009) Distribution and functional role of carbonic anhydrase Cah3 associated with thylakoid membranes in the chloroplast and pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Russ. J. Plant Physiol.*, **56**, 761-768, doi: 10.1134/S1021443709060053.
 15. Blanco-Rivero, A., Shutova, T., Román, M. J., Villarejo, A., and Martinez, F. (2012) Phosphorylation controls the localization and activation of the luminal carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*, *PLoS One*, **7**, e49063, doi: 10.1371/journal.pone.0049063.
 16. Fang, W., Si, Y., Douglass, S., Casero, D., Merchant, S. S., et al. (2012) Transcriptome-wide changes in *Chlamydomonas reinhardtii* gene expression regulated by carbon dioxide and the CO₂-concentrating mechanism regulator CIA5/CCM1, *Plant Cell*, **24**, 1876-1893, doi: 10.1105/tpc.112.097949.
 17. Mitchell, M. C., Metodieva, G., Metodiev, M. V., Griffiths, H., and Meyer, M. T. (2017) Pyrenoid loss impairs carbon-concentrating mechanism induction and alters primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Exp. Bot.*, **68**, 3891-3902, doi: 10.1093/jxb/erx121.
 18. Park, Y. I., Karlsson, J., Rojdestvenski, I., Pronina, N., Klimov, V., et al. (1999) Role of a novel photosystem II-associated carbonic anhydrase in photosynthetic carbon assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *FEBS Lett.*, **444**, 102-105, doi: 10.1016/S0014-5793(99)00037-X.
 19. Villarejo, A., Shutova, T., Moskvina, O., Forssén, M., Klimov, V. V., and Samuelsson, G. (2002) A photosystem II-associated carbonic anhydrase regulates the efficiency of photosynthetic oxygen evolution, *EMBO J.*, **21**, 1930-1938, doi: 10.1093/emboj/21.8.1930.
 20. Terentyev, V. V., Shukshina, A. K., and Shitov, A. V. (2019) Carbonic anhydrase CAH3 supports the activity of photosystem II under increased pH, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1860**, 582-590, doi: 10.1016/j.bbabi.2019.06.003.
 21. Terentyev, V. V., Shukshina, A. K., Ashikhmin, A. A., Tikhonov, K. G., and Shitov, A. V. (2020) The main structural and functional characteristics of photosystem-II-enriched membranes isolated from wild type and *cia3* mutant *Chlamydomonas reinhardtii*, *Life*, **10**, 63, doi: 10.3390/life10050063.
 22. Shutova, T., Kenneweg, H., Buchta, J., Nikitina, J., Terentyev, V., et al. (2008) The photosystem II-associated Cah3 in *Chlamydomonas* enhances the O₂ evolution rate by proton removal, *EMBO J.*, **27**, 782-791, doi: 10.1038/emboj.2008.12.
 23. Mitra, M., Mason, C. B., Xiao, Y., Ynalvez, R. A., Lato, S. M., and Moroney, J. V. (2005) The carbonic anhydrase gene families of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Can. J. Bot.*, **83**, 780-795, doi: 10.1139/b05-065.
 24. Benlloch, R., Shevela, D., Hainzl, T., Grundström, C., Shutova, T., et al. (2015) Crystal structure and functional characterization of photosystem II-associated carbonic anhydrase CAH3 in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.*, **167**, 950-962, doi: 10.1104/pp.114.253591.
 25. Nagao, R., Suzuki, T., Okumura, A., Niikura, A., Iwai, M., et al. (2010) Topological analysis of the extrinsic PsbO, PsbP and PsbQ proteins in a green algal PSII complex by cross-linking with a water-soluble carbodiimide, *Plant Cell Physiol.*, **51**, 718-727, doi: 10.1093/pcp/pcq042.
 26. Enami, I., Okumura, A., Nagao, R., Suzuki, T., Iwai, M., and Shen, J.-R. (2008) Structures and functions of the extrinsic proteins of photosystem II from different species, *Photosynth. Res.*, **98**, 349-363, doi: 10.1007/s11120-008-9343-9.
 27. Kondo, J., and Noguchi, T. (2018) PsbP-induced protein conformational changes around Cl⁻ ions in the water oxidizing center of photosystem II, *Photosynthetica*, **56**, 178-184, doi: 10.1007/s11099-017-0749-5.
 28. Rova, M., Franzén, L.-G., Fredriksson, P.-O., and Styring, S. (1994) Photosystem II in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking the 23 kDa psbP protein shows increased sensitivity to photoinhibition in the absence of chloride, *Photosynth. Res.*, **39**, 75-83, doi: 10.1007/BF00027145.
 29. Suzuki, T., Minagawa, J., Tomo, T., Sonoike, K., Ohta, H., and Enami, I. (2003) Binding and functional properties of the extrinsic proteins in oxygen-evolving photosystem II Particle from a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* having His-tagged CP47, *Plant Cell Physiol.*, **44**, 76-84, doi: 10.1093/pcp/pcg010.
 30. Khorobrykh, A. (2019) Hydrogen peroxide and superoxide anion radical photoproduction in PSII preparations at various modifications of the water-oxidizing complex, *Plants*, **8**, 329, doi: 10.3390/plants8090329.
 31. Mamedov, F., Gadjeva, R., Styring, S. (2007) Oxygen-induced changes in the redox state of the cytochrome *b* 559 in photosystem II depend on the integrity of the Mn cluster, *Physiol. Plant.*, **131**, 41-49, doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.00938.x.
 32. Nishimura, T., Nagao, R., Noguchi, T., Nield, J., Sato, F., and Ifuku, K. (2016) The N-terminal sequence of the extrinsic PsbP protein modulates the redox potential of Cyt *b*559 in photosystem II, *Sci. Rep.*, **6**, 21490, doi: 10.1038/srep21490.
 33. Allakhverdiev, S. I., Tsuchiya, T., Watabe, K., Kojima, A., Los, D. A., et al. (2011) Redox potentials of primary electron acceptor quinone molecule (QA)- and conserved energetics of photosystem II in cyanobacteria with chlorophyll *a* and chlorophyll *d*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 8054-8058, doi: 10.1073/pnas.1100173108.
 34. Shibamoto, T., Kato, Y., Sugiura, M., and Watanabe, T. (2009) Redox potential of the primary plastoquinone electron acceptor Q_A in photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* determined by spectroelectrochemistry, *Biochemistry*, **48**, 10682-10684, doi: 10.1021/bi901691j.
 35. Johnson, G. N., Rutherford, A. W., and Krieger, A. (1995) A change in the midpoint potential of the quinone Q_A in photosystem II associated with photoactivation of oxygen evolution, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1229**, 202-207, doi: 10.1016/0005-2728(95)00003-2.
 36. Boekema, E. J., van Breemen, J. F. L., van Roon, H., and Dekker, J. P. (2000) Conformational changes in photosystem II supercomplexes upon removal of extrinsic subunits, *Biochemistry*, **39**, 12907-12915, doi: 10.1021/bi0009183.
 37. Semin, B. K., Davletshina, L. N., and Mamedov, M. D. (2018) Effect of different methods of Ca²⁺ extraction from PSII oxygen-evolving complex on the Q_A – oxidation kinetics, *Photosynth. Res.*, **136**, 83-91, doi: 10.1007/s11120-017-0441-4.

38. Roose, J. L., Frankel, L. K., Bricker, T. M. (2010) Documentation of significant electron transport defects on the reducing side of photosystem II upon removal of the PsbP and PsbQ extrinsic proteins, *Biochemistry*, **49**, 36-41, doi: 10.1021/bi9017818.
39. Porra, R. J., Thompson, W. A., and Kriedemann, P. E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **975**, 384-394, doi: 10.1016/S0005-2728(89)80347-0.
40. Miyao, M., and Murata, N. (1985) The Cl⁻ effect on photosynthetic oxygen evolution: interaction of Cl⁻ with 18-kDa, 24-kDa and 33-kDa proteins, *FEBS Lett.*, **180**, 303-308, doi: 10.1016/0014-5793(85)81091-7.
41. Miyao, M., and Murata, N. (1984) Role of the 33-kDa polypeptide in preserving Mn in the photosynthetic oxygen-evolution system and its replacement by chloride ions, *FEBS Lett.*, **170**, 350-354, doi: 10.1016/0014-5793(84)81342-3.
42. Miyao, M., and Murata, N. (1983) Partial disintegration and reconstitution of the photosynthetic oxygen evolution system. Binding of 24 kilodalton and 18 kilodalton polypeptides, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **725**, 87-93, doi: 10.1016/0005-2728(83)90227-X.
43. Tomita, M., Ifuku, K., Sato, F., and Noguchi, T. (2009) FTIR evidence that the PsbP extrinsic protein induces protein conformational changes around the oxygen-evolving mn cluster in photosystem II, *Biochemistry*, **48**, 6318-6325, doi: 10.1021/bi9006308.
44. Uno, C., Nagao, R., Suzuki, H., Tomo, T., and Noguchi, T. (2013) Structural coupling of extrinsic proteins with the oxygen-evolving center in red algal photosystem II as revealed by light-induced FTIR difference spectroscopy, *Biochemistry*, **52**, 5705-5707, doi: 10.1021/bi4009787.
45. Nagao, R., Tomo, T., and Noguchi, T. (2015) Effects of extrinsic proteins on the protein conformation of the oxygen-evolving center in cyanobacterial photosystem II as revealed by fourier transform infrared spectroscopy, *Biochemistry*, **54**, 2022-2031, doi: 10.1021/acs.biochem.5b00053.
46. Nishimura, T., Sato, F., and Ifuku, K. (2017) *In vivo* system for analyzing the function of the PsbP protein using *Chlamydomonas reinhardtii*, *Photosynth. Res.*, **133**, 117-127, doi: 10.1007/s11120-017-0370-2.
47. Bryson, D. I., Doctor, N., Johnson, R., Baranov, S., and Haddy, A. (2005) Characteristics of iodide activation and inhibition of oxygen evolution by photosystem II, *Biochemistry*, **44**, 7354-7360, doi: 10.1021/bi047475d.
48. Cruz, J. A., Sacksteder, C. A., Kanazawa, A., and Kramer, D. M. (2001) Contribution of electric field ($\Delta\psi$) to steady-state transthylakoid proton motive force (pmf) *in vitro* and *in vivo*. Control of pmf parsing into $\Delta\psi$ and ΔpH by ionic strength, *Biochemistry*, **40**, 1226-1237, doi: 10.1021/bi0018741.
49. Raven, J. A. (2020) Chloride involvement in the synthesis, functioning and repair of the photosynthetic apparatus *in vivo*, *New Phytol.*, **227**, 334-342, doi: 10.1111/nph.16541.
50. Yanykin, D. V., Khorobrykh, A. A., Terentyev, V. V., and Klimov, V. V. (2017) Two pathways of photoproduction of organic hydroperoxides on the donor side of photosystem 2 in subchloroplast membrane fragments, *Photosynth. Res.*, **133**, 129-138, doi: 10.1007/s11120-017-0373-z.

INVOLVEMENT OF CARBONIC ANHYDRASE CAH3 IN STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STABILISATION OF THE WATER-OXIDIZING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II FROM *Chlamydomonas reinhardtii*

A. K. Shukshina and V. V. Terentyev*

Institute of Basic Biological Problems, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: v.v.terentyev@gmail.com

The involvement of carbonic anhydrases (CA) and CA activity in the functioning of photosystem II (PSII) has been studied for a long time and has been shown in many works. However, so far only for CAH3 from *Chlamydomonas reinhardtii* there is evidence for its association with the donor side of PSII, where the CA activity of CAH3 can influence the functioning of the water-oxidizing complex (WOC). Our results suggest that CAH3 is also involved in the organization of the native structure of WOC independently of its CA activity. It was shown that in PSII preparations from wild type (WT) the high O₂-evolving activity of WOC was observed up to 100 mM NaCl in the medium and practically did not decrease with increasing incubation time with NaCl. At the same time, the WOC function in PSII preparations from CAH3-deficient mutant *cia3* is significantly inhibited already at NaCl concentrations above 35 mM, reaching 50% at 100 mM NaCl and increased incubation time. It is suggested that the absence of CAH3 in PSII from *cia3* causes disruption of the native structure of WOC, allowing more pronounced conformational changes of its proteins and, consequently, suppression of the WOC active center function, when the ionic strength of the medium is increased. The results of Western blot analysis indicate a more difficult removal of PsbP protein from PSII of *cia3* at higher NaCl concentrations, apparently due to the changes in the intermolecular interactions between proteins of WOC in the absence of CAH3. At the same time, the values of the maximum quantum yield of PSII did not practically differ between preparations from WT and *cia3*, indicating no effect of CAH3 on the photoinduced electron transfer in the reaction center of PSII. The obtained results indicate the involvement of the CAH3 protein in the native organization of the WOC and, as a consequence, in the stabilization of its functional state in PSII from *C. reinhardtii*.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, carbonic anhydrase CAH3, photosystem II, water-oxidizing complex, O₂-evolving activity, PsbP protein

УДК 577.24

ЭФФЕКТЫ ИНГИБИТОРОВ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И ГЛЮКОЗЫ НА ГИБЕЛЬ КЛЕТОК И ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЛИСТЬЯХ ГОРОХА

© 2021 В.Д. Самуилов^{1*}, Д.Б. Киселевский^{1*}, Е.В. Дзюбинская¹, О.Ю. Фролова²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия; электронная почта: vdsamuilov@mail.ru; dkiselevs@mail.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, ООО «НИИ Митохондженирии МГУ», 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 09.02.2021

После доработки 15.06.2021

Принята к публикации 15.06.2021

Исследовали действие ингибиторов супероксиддисмутазы (СОД) диэтилдитиокарбамата (ДДК), триэтилентетрамина (триена) и их комбинации с глюкозой на клетки эпидермиса из листьев гороха разного возраста: быстро растущих молодых листьев и старых листьев с замедленным ростом. ДДК и триен вызывали гибель устьичных клеток, которую регистрировали по разрушению их ядер. Глюкоза не влияла на разрушение ядер, вызванное ингибиторами СОД в клетках из старых листьев, но усиливала его в клетках из молодых листьев. Ингибитор гликолиза 2-дезоксиглюкоза и имитирующий СОД антиоксидант пропилгаллат подавляли зависимое от ингибиторов СОД и глюкозы разрушение ядер в клетках эпидермиса из молодых, но не из старых листьев. Глюкоза и триен стимулировали, а пропилгаллат уменьшал образование активных форм кислорода (АФК) в эпидермисе гороха, определяемое по флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF). Протонофорный разобщитель окислительного и фотосинтетического фосфорилирования *m*-хлоркарбонилцианидфенилгидразон (ХКФ) подавлял флуоресценцию DCF в устьичных клетках. Обработка клеток ХКФ с последующей отмывкой от него усиливала разрушение ядер, вызванное ингибиторами СОД и глюкозой. В молодых листьях ХКФ был менее эффективен, чем в старых. Полученные результаты демонстрируют эффекты ингибиторов СОД и глюкозы на гибель клеток и генерацию АФК и могут свидетельствовать о зависимом от гликолиза образовании АФК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глюкоза, супероксиддисмутазы, активные формы кислорода, программируемая клеточная смерть, устьичные клетки листьев, горох.

DOI: 10.31857/S032097252107006X

ВВЕДЕНИЕ

В регуляцию гибели клеток у растений вовлечены активные формы кислорода (АФК) [1]. Их образование ассоциировано с переносом электронов в электронтранспортных цепях митохондрий и хлоропластов. 1–2% потребляемого растениями O₂ превращается в АФК [2]. Представляет интерес вопрос о том, как системы энергообеспечения и образующиеся с их помощью АФК участвуют в гибели клеток растений. В связи с этим изучали, какой вклад вносят хлоропласты и митохондрии в процесс клеточной смерти [3, 4].

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ДДК – N,N'-диэтилдитиокарбамат; СОД – супероксиддисмутазы; триен – триэтиленetetрамин; ХКФ – *m*-хлоркарбонилцианидфенилгидразон; DCF – 2',7'-дихлорфлуоресцеин; DCFH-DA – диацетат 2',7'-дихлорфлуоресцина.

* Адресат для корреспонденции.

Роль хлоропластов в гибели клеток растений была продемонстрирована на клетках из эпидермиса листьев гороха [3]. В эпидермисе два типа клеток: основные эпидермальные клетки, которые не имеют хлоропластов, и фотосинтезирующие замыкающие клетки устьиц (устьичные клетки). Освещение усиливало гибель устьичных клеток, но не влияло на гибель эпидермальных клеток, лишённых хлоропластов. Гибель устьичных клеток зависела как от АФК, так и от редокс-состояния пластохинона в хлоропластах [3].

Митохондриально-направленные антиоксиданты SkQ подавляли образование АФК и гибель клеток в эпидермисе листьев гороха, что свидетельствует об участии митохондрий и митохондриальных АФК в гибели клеток растений [4, 5].

Ещё одним клеточным компартментом, генерирующим АФК, являются пероксисомы. Внутри них различные оксидазы катализируют образование H₂O₂ или супероксидного анион-

радикала (O_2^-), который затем превращается в H_2O_2 . Ферменты в мембране пероксисом (PMP, peroxisome membrane polypeptides) с молекулярной массой 18 (цитохром *b*), 29 и 32 кДа используют NADH или NADPH для восстановления кислорода до O_2^- в цитоплазме клеток [2].

Существует возможность образования АФК и в результате гликолиза, при котором происходит восстановление NAD^+ . Тот NAD^+ , который восстанавливается в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) и регенерируется при окислении NADH дыхательной цепью, локализован в митохондриях и не доступен для ферментов, действующих в цитоплазме и других клеточных компартментах. NADH может функционировать в качестве донора электронов для пероксидазы и превращаться в радикал NAD^* , который окисляется кислородом с образованием АФК: $NAD^* + O_2 \rightarrow NAD^+ + O_2^-$ [6]. В связанном с гликолизом пентозофосфатном пути восстанавливается NADP⁺. Образующийся NADPH может окисляться NADPH-оксидазой плазматической мембраны, генерирующей O_2^- . Взаимодействие растений с патогеном инициирует гиперчувствительный ответ, который проявляется в локальной гибели клеток и образовании АФК NADPH-оксидазой плазматической мембраны для того, чтобы обезвредить инфекцию и не допустить её распространения. При этом происходит быстрое увеличение пула NADPH – субстрата NADPH-оксидазы. Эта реакция регулируется Ca^{2+} и связывающим его белком кальмодулином и катализируется NAD-киназой. Из NAD^+ образуется NADP⁺, который может затем превращаться в NADPH с помощью пентозофосфатного пути [7].

В реакциях образования АФК O_2^- возникает в результате одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода. O_2^- – эффективный ингибитор [4Fe, 4S]-групп различных белков. После протонирования O_2^- становится сильным одновалентным окислителем этих групп, которые, теряя стабильность, подвергаются затем разрушению [8]. Одноэлектронное восстановление O_2^- ведет к образованию H_2O_2 , а двухэлектронное – гидроксильного радикала (OH^*), способного окислить практически любое соединение в клетке и обладающее временем жизни 10^{-9} с.

Растения защищает от АФК супероксиддисмутаза (СОД), катализирующая реакцию: $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$. Образующийся H_2O_2 может быть утилизирован каталазой или пероксидазами. СОД подразделяют на четыре основные группы: Cu,Zn-СОД, Mn-СОД, Fe-СОД и Ni-СОД. Кроме того, имеются данные о Fe,Zn- и Co,Zn-

СОД [9]. У растений имеются СОД первых трёх групп, расположенные в различных клеточных компартментах: Fe-СОД – в хлоропластах, Mn-СОД – в митохондриях и пероксисомах, Cu,Zn-СОД – в хлоропластах, пероксисомах и цитоплазме, а также в ядре и апопласте [9, 10]. Нарушение действия этих ферментов ведёт к гибели клеток [11]. Активность Cu,Zn-СОД, как показано у бактерий, дрожжей и животных, подавляется агентами, хелирующими Cu^{2+} : N,N'-диэтилдитиокарбаматом (ДДК) [12–15] и триэтилтетраамином (триеном) [16–18]. Цианид, азид и H_2O_2 в миллимолярных концентрациях ингибируют СОД разных групп [9].

Энергетический метаболизм регулируется в зависимости от состояния и потребностей клеток. O_2 снижает потребление глюкозы и подавляет образование лактата из пирувата (эффект Пастера [19, 20]). В расчёте на 1 молекулу потреблённой глюкозы выход АТФ при гликолизе составляет 2 молекулы, а при окислительном фосфорилировании – до 36 молекул [21]. Несмотря на это, быстро растущие клетки предпочитают использовать гликолиз как источник АТФ при аэробной пролиферации – аэробный гликолиз [22], свойственный опухолевым клеткам, лимфоцитам, эндотелиальным клеткам, дрожжам. Благодаря высокой скорости аэробный гликолиз может дать АТФ даже больше, чем окислительное фосфорилирование [23]. Аэробный гликолиз обеспечивает превращение глюкозы в пируват и лактат при недостатке O_2 для поддержания ЦТК и окислительного фосфорилирования в функционально активных митохондриях (эффект Варбурга [24, 25]). Главная роль аэробного гликолиза, по-видимому, заключается в поддержании постоянного уровня его промежуточных продуктов для синтеза макромолекулярных соединений при делении клеток [22]: из рибозо-5-фосфата, синтезированного из глюкозо-6-фосфата или фруктозо-6-фосфата, образуется фосфорибозилпирофосфат, используемый в синтезе нуклеотидов; промежуточный продукт гликолиза, 3-фосфоглицериновый альдегид, является предшественником дигидроксиацетонфосфата, из которого синтезируются липиды (фосфолипиды и триацилглицеролы) – компоненты клеточных мембран; из продуктов гликолиза 3-фосфоглицерата образуется аминокислота серин (а из серина – глицин и цистеин), из пирувата – аланин. Окислительное фосфорилирование эффективнее в синтезе АТФ, тогда как гликолиз предпочтителен в синтезе биомассы, видимо, поэтому покоящиеся клетки главным образом используют митохондриальное окислительное фосфорилирование, а быстро пролиферирующие – гликолиз [26]. Следует от-

метить, что в быстро растущих опухолевых клетках, для которых характерен аэробный гликолиз, содержание АФК выше, чем в нормальных клетках той же ткани [27].

Глюкоза ускоряет гликолиз и подавляет окислительное фосфорилирование — это эффект Кребттри [28], характерный для дрожжей и некоторых опухолевых клеток и имеющий общие черты с эффектом Варбурга [29]. Цитозольный NADH, продуцируемый при гликолизе, снижает проницаемость наружной мембраны митохондрий из клубней картофеля для ADP и тем самым тормозит их дыхание, имитируя эффект Кребттри [30]. Данные об аэробном гликолизе у растений в литературе отсутствуют.

В настоящей работе ДДК и триен, ингибирующие СОД, испытаны на клетках эпидермиса листьев растений. В опытах использованы листья из проростков гороха разного возраста: «молодые», 6–11-суточные, быстро растущие с интенсивными обменными реакциями и «старые», 14–26-суточные, с замедленным ростом. Исследован эффект глюкозы в комбинации с ингибиторами СОД на гибель клеток и генерацию АФК в эпидермисе из молодых и старых листьев гороха.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проростки гороха (*Pisum sativum* L. сорта Альфа) выращивали при периодическом освещении (свет — 16 ч, темнота — 8 ч) металлогалогеновой лампой ДРi3, 250 Вт, с интенсивностью света ~ 100 мкЕ·м⁻²·с⁻¹. Использовали быстро растущие нераскрывшиеся листья с верхушки побегов молодых проростков, выращиваемых 6–11 суток, или медленно растущие листья, отделённые от середины побегов зрелых растений (14–26 суток), которые обозначены в работе как «молодые» или «старые» листья соответственно.

Гибель устьичных клеток гороха регистрировали по разрушению клеточных ядер [3]. Плёнки эпидермиса отделяли от листьев пинцетом, помещали в бидистиллированную воду и добавляли реагенты (см. подписи к рисункам). Инфильтрацию реагентов проводили под вакуумом, создаваемым с помощью вакуумного насоса в течение 1 мин. Плёнки эпидермиса инкубировали с реагентами в полистирольных планшетах. После инкубации их обрабатывали фиксатором Батталья (смесь хлороформа, 96%-ного этанола, ледяной уксусной кислоты и 40%-ного формалина в соотношении 5/5/1/1) 5 мин, промывали этанолом 10 мин для удаления фиксатора, инкубировали 5 мин в воде и окрашивали ядерным красителем гематоксилином Карацци

20 мин. Окрашенные плёнки эпидермиса промывали водой и исследовали на световом микроскопе («Carl Zeiss», Германия). Для каждого варианта опыта подсчитывали долю клеток с разрушенными ядрами и лишённых ядер из 300–500 клеток в 2–3 плёнках эпидермиса.

Поглощение или светозависимое выделение O₂ высечками из листьев гороха (20 мг) измеряли с помощью закрытого платинового электрода в полярографической ячейке, содержащей 1,5 мл среды инкубации: 50 мМ Tricine-KOH, pH 7,8, 35 мМ NaCl и 1 мМ MgCl₂. Высечки листьев гороха освещали сфокусированным светом галогеновой лампы, 250 Вт, с интенсивностью света ~ 2000 мкЕ·м⁻²·с⁻¹. Интенсивность света измеряли сенсором Quantitherm PAR/Temp («Hansatech», Великобритания).

Для определения содержания глюкозы и лактата в листьях гороха гомогенизировали 200 мг нарезок листьев, к гомогенату добавляли 300 мкл бидистиллированной воды, центрифугировали 15 мин при 12 000 g, отбирали 300 мкл надосадочной жидкости и измеряли в ней глюкозу или лактат с помощью биохимического анализатора Random Access A-25 («BioSystems S.A.», Испания). Определение осуществлялось по глюкозооксидазной и лактатоксидазной реакциям с образованием H₂O₂, который затем в реакциях с 4-аминоантипирином и фенолом или N-этил-N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-3-метиланилином, катализируемых пероксидазой, образовывал окрашенные хинонимины с максимумами поглощения при 505 или 555 нм соответственно.

АФК определяли по образованию 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF) из диацетата 2',7'-дихлорфлуоресцина (DCFH-DA). Проникая в клетки, DCFH-DA дезацетируется внутриклеточными эстеразами и окисляется АФК, преимущественно H₂O₂ с участием пероксидаз, превращаясь в интенсивно флуоресцирующий DCF. Образованию DCF могут способствовать ионы металлов переменной валентности, например, Fe²⁺ и цитохром c, обладающий активностью, сходной с пероксидазной [31, 32]. Образование АФК детектировали двумя способами. 1. Плёнку эпидермиса, закреплённую на пластиковой пластинке с помощью силиконового геля, помещали в кювету с 2 мл среды инкубации, содержащей 50 мМ Tricine-KOH, pH 7,8, 35 мМ NaCl и 1 мМ MgCl₂, добавляли 20 мкМ DCFH-DA. Флуоресценцию DCF измеряли с помощью флуориметра VersaFluor («BioRad», США), возбуждая светом 485–495 нм и регистрируя при 515–525 нм. 2. Плёнки эпидермиса окрашивали 20 мкМ DCFH-DA в течение 30 мин и исследовали под микроскопом

Axiovert 200M с конфокальной приставкой LSM 510Meta («Carl Zeiss», Германия). Флуоресценцию DCF возбуждали светом лазера 488 нм и регистрировали при 500–530 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ДДК и триен, соединения, хелирующие Cu^{2+} и используемые в качестве ингибиторов СОД, вызывали разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе из листьев гороха (рис. 1). Действие глюкозы зависело от возраста листьев. Глюкоза сама по себе не влияла на состояние ядер устьичных клеток, но усиливала разрушение ядер, вызванное ингибиторами СОД в эпидермисе из молодых листьев, и не оказывала влияния на ДДК- и триен-зависимое разрушение ядер в эпидермисе из старых листьев. 2-Дезоксиглюкоза, ингибитор гликолиза, снимала эффект глюкозы на клетки из молодых листьев, не оказывая влияния на разрушение ядер в клетках из старых листьев под действием ингибиторов СОД и глюкозы (рис. 1).

Было испытано действие других соединений, хелирующих ионы металлов, на разруше-

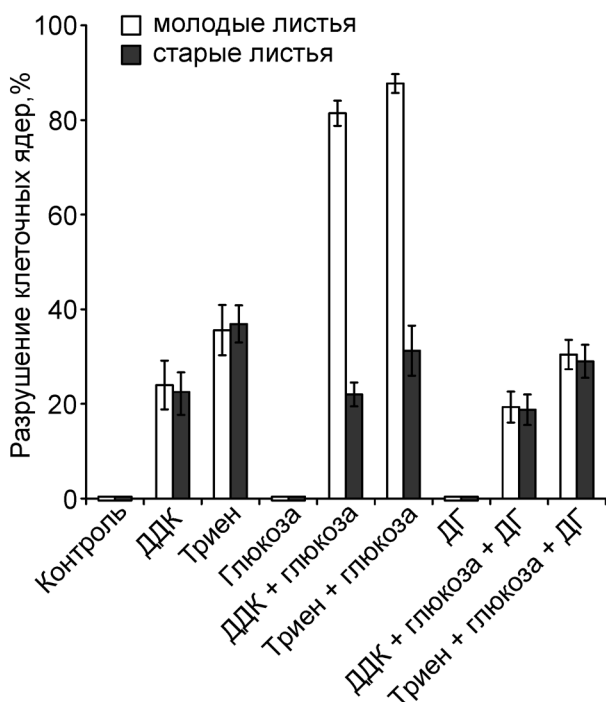


Рис. 1. Действие ДДК, триена, глюкозы и 2-дезоксиглюкозы (ДГ) на состояние ядер устьичных клеток в плёнках эпидермиса из молодых и старых листьев гороха. Молодые и старые листья из 8- или из 14-суточных проростков соответственно. К плёнкам эпидермиса добавляли 10 мМ ДДК, 10 мМ триена, 10 мМ глюкозы и 10 мМ ДГ, вакуумировали 1 мин и инкубировали 23 ч в темноте

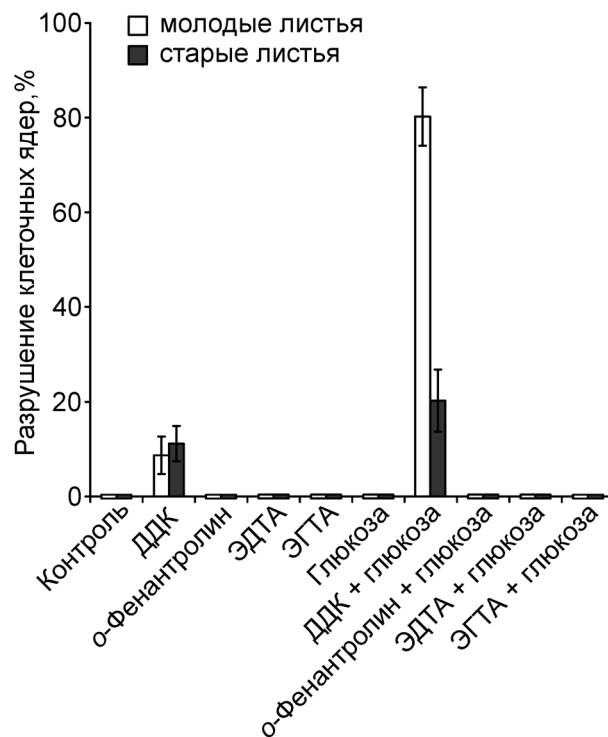


Рис. 2. Действие ДДК, *o*-фенантролина, ЭДТА, ЭГТА и глюкозы на состояние ядер устьичных клеток в плёнках эпидермиса из молодых и старых листьев гороха. Молодые и старые листья из 8- или из 22-суточных проростков соответственно. К плёнкам эпидермиса добавляли 10 мМ ДДК, 10 мМ *o*-фенантролина, 10 мМ ЭДТА, 10 мМ ЭГТА и 5 мМ глюкозы, вакуумировали 1 мин и инкубировали 22 ч в темноте

ние ядер устьичных клеток в эпидермисе из молодых или старых листьев гороха. *o*-Фенантролин, ЭДТА и ЭГТА, в отличие от ДДК, не вызывали разрушения ядер клеток сами по себе или в комбинации с глюкозой (рис. 2).

Оксиметрически и по содержанию лактата сравнивали реакции энергетического обмена (дыхание, фотосинтетическое выделение O_2 и гликолиз) в молодых и старых листьях. Скорости выделения O_2 на свету и темнового дыхания в высечках из молодых листьев гороха были в среднем в 2–3 раза выше, чем в высечках из старых листьев (рис. 3). Это согласуется с данными о возрастных изменениях фотосинтеза и дыхания в листьях растений [33, 34]. Добавка глюкозы не влияла на скорость дыхания. ДДК примерно в 1,5 раза снижал скорость поглощения O_2 в темноте молодыми листьями, но не влиял на дыхание старых листьев, а триен не действовал на молодые листья, но на 80% ускорял поглощение O_2 старыми листьями (рис. 3). Поскольку реакция, катализируемая СОД, происходит с выделением O_2 , ингибиторы СОД будут усиливать поглощение O_2 . Этот их эффект

проявляется в большей степени на старых листьях, что может свидетельствовать об увеличении в них скорости реакции, осуществляемой СОД, т.е. о повышенном содержании O_2^- и/или СОД в старых листьях. Так, в старых листьях рапса активность СОД была выше, чем в молодых, а концентрация O_2^- , напротив, уменьшалась с возрастом [35].

Концентрация глюкозы в молодых и старых листьях гороха поддерживалась на одном уровне, но содержание лактата в старых листьях было в 3–4 раза выше, чем в молодых (рис. 4). Это может быть обусловлено потреблением промежуточных продуктов гликолиза в молодых листьях для синтеза органических соединений, а также использованием пирувата в митохондриальном дыхании.

Пропилгаллат, антиоксидант, имитирующий действие СОД [36], подавлял разрушение ядер клеток в эпидермисе из молодых листьев гороха, вызванное ДДК и глюкозой, но не оказывал влияния на разрушение ядер устьичных клеток из старых листьев (рис. 5).

Глюкоза стимулировала образование АФК в плёнке эпидермиса из листьев гороха, которое



Рис. 3. Дыхание и фотосинтетическое выделение O_2 в высечках из молодых (а, б) или старых (в, г) листьев гороха: действие глюкозы, ДДК и триена. Молодые и старые листья из 10- или 21-суточных проростков соответственно. ВЛ – высечки листьев. Вк и Вык – включение и выключение света соответственно. Добавки: 20 мг ВЛ, 10 мМ глюкозы, 10 мМ ДДК и 10 мМ триена

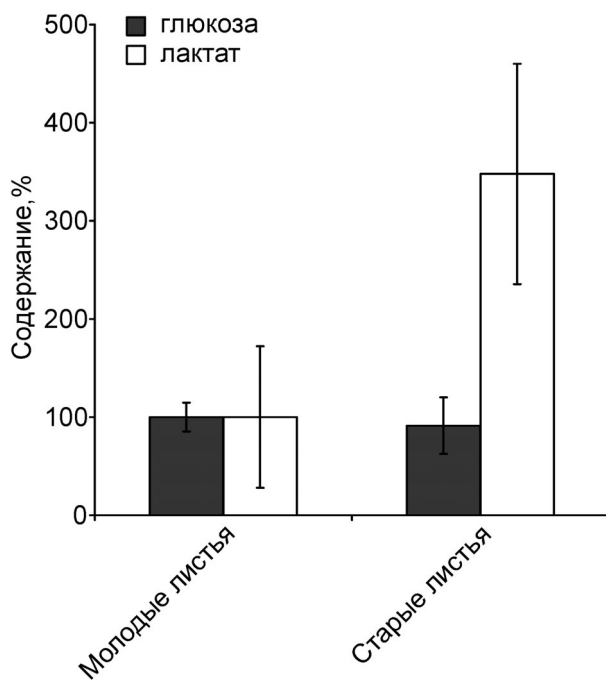


Рис. 4. Содержание глюкозы и лактата в молодых или старых листьях гороха. Молодые и старые листья из 10- или 17-суточных проростков соответственно. За 100% принято усреднённое содержание глюкозы или лактата в молодых листьях, которое соответствует 1,37 мг глюкозы или 10,2 мкг лактата на 1 г сырой массы листьев

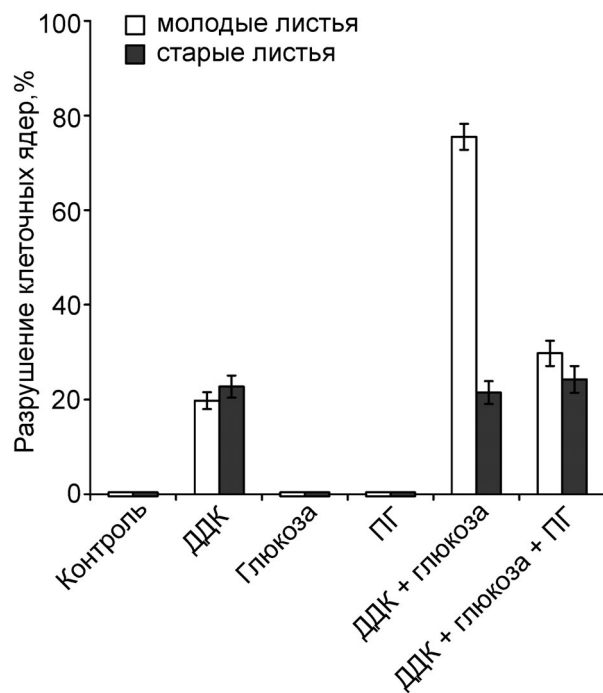


Рис. 5. Действие ДДК, глюкозы и пропилгаллата (ПГ) на состояние ядер устьичных клеток в плёнках эпидермиса из молодых и старых листьев гороха. Молодые и старые листья из 11- или из 26-суточных проростков соответственно. К плёнкам эпидермиса добавляли 10 мМ ДДК, 10 мМ глюкозы и 0,1 мМ ПГ, вакуумировали 1 мин и инкубировали 23 ч в темноте

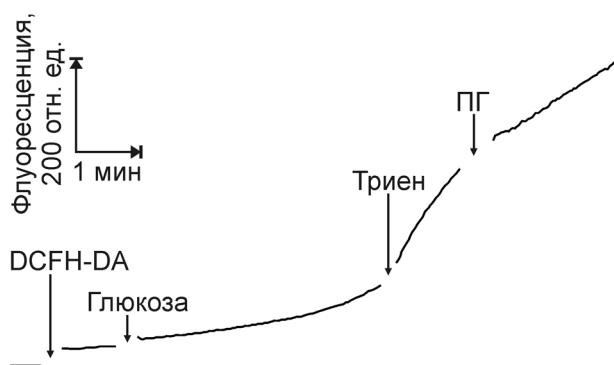


Рис. 6. Действие глюкозы, триена и пропилгаллата (ПГ) на образование АФК в плёнке эпидермиса из листьев гороха, регистрируемое по флуоресценции DCF. Использовали молодые листья из 9-суточных проростков. Флуоресценцию измеряли с помощью флуориметра. Добавки: 20 мкМ DCFH-DA, 10 мМ глюкозы, 10 мМ триена и 0,5 мМ ПГ

регистрировали по флуоресценции DCF (рис. 6). Триен, ингибирующий СОД, увеличивал выход флуоресценции DCF. Антиоксидант, пропилгаллат, снижал рост флуоресценции DCF, вызванный глюкозой и триеном.

Обработка клеток протонофорными разобщителями значительно усиливает гликолиз [37]. Протонофорный разобщитель *m*-хлоркарбонилцианидфенилгидразон (ХКФ) снижал выход флуоресценции DCF в устьичных клетках эпидермиса из листьев гороха (рис. 7, а). Обработка плёнок эпидермиса из молодых или старых листьев гороха ХКФ с последующей отмывкой от него усиливала разрушение ядер устьичных клеток, вызванное ингибиторами СОД ДДК и триеном (рис. 7, б и в). При обработке плёнок эпидермиса ХКФ в течение 2 ч стимуляция разрушения ядер клеток, вызванного ДДК (без глюкозы), проявлялась лишь в старых листьях.

Данные о разрушении ядер клеток при действии ингибиторов СОД (рис. 1), отсутствии эффекта других комплексоннов на ядра клеток (рис. 2) и подавлении разрушения ядер пропилгаллатом, имитирующим СОД (рис. 5), подтверждают, что ДДК- и триен-зависимая гибель клеток обусловлена подавлением активности СОД. Глюкоза усиливает зависимое от ингибиторов СОД разрушение ядер клеток. Действие глюкозы проявляется только на клетках из молодых листьев и предотвращается ингибитором гликолиза 2-дезоксиглюкозой (рис. 1) — это свидетельствует о том, что эффект глюкозы опосредован гликолизом. В этом процессе задействованы АФК, образование которых стимулируется глюкозой и триеном (рис. 6).

Полученные данные соответствуют результатам исследования роли СОД в аэробном гли-

колизе у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [38]. В этой работе высокое содержание глюкозы в питательной среде дрожжей подавляло митохондриальное дыхание (эффект Кребтри [28]), но усиливало образование O_2^- , что свидетельствует о зависимом от глюкозы образовании АФК. Источником O_2^- мог быть подобный NADPH-оксидазе белок YNO1. С использованием мутантов дрожжей с делецией в генах, кодирующих СОД, установлено, что O_2^- , генерируемый при аэробном росте дрожжей на глюкозе, при участии Cu,Zn-СОД превращается в H_2O_2 . Действуя локально H_2O_2 стабилизирует казеинкиназу YCK1 плазматической мембраны, регулирующую подавление дыхания и рецепцию глюкозы и аминокислот [38].

Ингибирование СОД приводит к накоплению в клетках АФК (рис. 6) и разрушению клеточных ядер, а глюкоза усиливает разрушение ядер в устьичных клетках в эпидермисе из молодых листьев гороха (рис. 1). Представляет интерес, как добавка глюкозы может стимулировать образование АФК. Глюкоза эффективно действует на клетки из молодых листьев (рис. 1), которые активнее пролиферируют, следовательно, гликолиз играет более значительную роль в их энергетическом и строительном обмене.

Зависимая от глюкозы генерация АФК, скорее всего, не связана с митохондриями. Об этом свидетельствуют результаты действия протонофорного разобщителя. В митохондриях протонофорные разобщители подавляют окислительное фосфорилирование и образование АФК [39]. Действительно, ХКФ снижал выход флуоресценции DCF в устьичных клетках гороха (рис. 7, а), но разрушение ядер, напротив, усиливалось ХКФ (рис. 7, б и в). По-видимому, в клетках из старых листьев после обработки разобщителем происходит активация гликолиза [37] и возрастает разрушение ядер клеток — как в клетках из молодых листьев при добавке глюкозы. В молодых листьях ХКФ был менее эффективен, чем в старых (рис. 7, б и в).

Не исключено, что стимуляция разрушения ядер протонофорным разобщителем связана не с АФК, а с деэнергизацией клеток: ХКФ усиливал разрушение ядер устьичных клеток гороха, вызванное цианидом; ХКФ и 2-дезоксиглюкоза сами по себе вызывали гибель устьичных клеток при инкубации, длящейся двое суток и более [40].

Предположительно, эффект глюкозы может быть опосредован гликолизом или пентозофосфатным путём, в которых происходит восстановление NAD^+ или $NADP^+$ соответственно. С одной стороны, NADH может играть роль антиоксиданта: в митохондриях клеток он является ос-

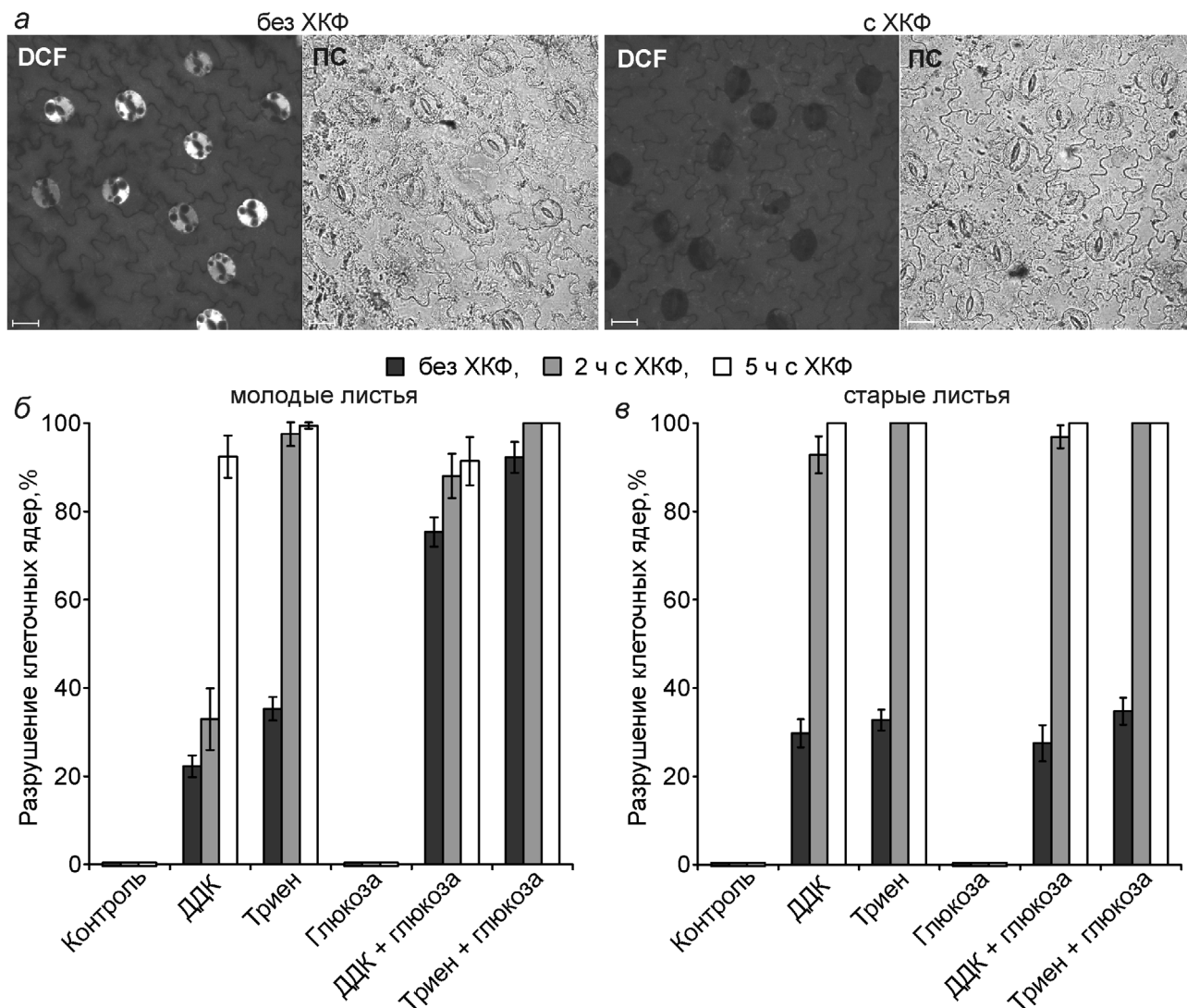


Рис. 7. Действие *m*-хлоркарбонилицианидфенилгидразона (ХКФ) на образование АФК в устьичных клетках, регистрируемое по флуоресценции DCF (*a*) и действие ДДК, триена и глюкозы на состояние ядер устьичных клеток после обработки ХКФ в плёнках эпидермиса из молодых (*б*) и старых (*в*) листьев гороха. Молодые листья из 9-суточных проростков (*б*), старые листья из 16-суточных проростков (*a*) или из 21-суточных проростков (*в*). *a* – Плёнки эпидермиса 30 мин инкубировали с 20 мкМ DCFH-DA без ХКФ или с 1 мкМ ХКФ. Изображения получали методом конфокальной микроскопии. Обозначения: DCF – флуоресценция DCF, ПС – изображение в проходящем свете. Масштабный отрезок – 20 мкм. *б, в* – К плёнкам эпидермиса, необработанным ХКФ или преинкубированным 2 или 5 ч в темноте с 1 мкМ ХКФ, а затем отмытым от ХКФ полосканием в 100 мл дистиллированной воды, добавляли 10 мМ ДДК, 10 мМ триена и 10 мМ глюкозы, вакуумировали 1 мин и инкубировали 22 (*б*) или 21 (*в*) ч в темноте

новой мишенью для синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) [41]. С другой стороны, NADH как донор электронов для пероксидазы способствует образованию O_2^- [6]. Фенольные соединения ускоряют окисление NADH пероксидазой [42]. Так, NADH вызывал образование O_2^- в суспензии митохондрий из корней гороха, которое стимулировалось фенольными соединениями и было обусловлено пероксидазой. NADH, добавленный в среду инкубации, вызывал разрушение ядер устьичных клеток гороха, а фенольные соединения усиливали его [43]. NADPH может быть

использован в качестве субстрата NADPH-оксидазы плазматической мембраны, генерирующей внеклеточный O_2^- . Судя по всему, NADPH-оксидаза плазматической мембраны задействована в гибели клеток растений: её ингибиторы хинакрин и дифенилениодоний подавляли разрушение ядер устьичных клеток гороха, вызванное CN^- [44]. АФК в форме O_2^- , тем более образованного снаружи клеток, не будут детектироваться DCF, что не противоречит данным рис. 7, *a*.

Полученные результаты описывают действие ингибиторов СОД и глюкозы на гибель

клеток и генерацию АФК в эпидермисе из молодых и старых листьев гороха. В совокупности данные могут свидетельствовать об образовании АФК, зависящем от гликолиза.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121042600047-9.

Благодарности. Авторы благодарны сотрудникам Центра коллективного пользования МГУ

имени М.В. Ломоносова за предоставленную возможность использовать оборудование, приобретенное за счет средств Программы развития МГУ при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Samuilov, V. D., Kiselevsky, D. B., Shestak, A. A., Nesov, A. V., and Vasil'ev, L. A. (2008) Reactive oxygen species in programmed death of pea guard cells, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1076-1084, doi: 10.1134/s0006297908100039.
- Sachdev, S., Ansari, S. A., Ansari, M. I., Fujita, M., and Hasanuzzaman, M. (2021) Abiotic stress and reactive oxygen species: generation, signaling, and defense mechanisms, *Antioxidants*, **10**, 277, doi: 10.3390/antiox10020277.
- Samuilov, V. D., Lagunova, E. M., Kiselevsky, D. B., Dzyubinskaya, E. V., Makarova, Y. V., and Gusev, M. V. (2003) Participation of chloroplasts in plant apoptosis, *Biosci. Rep.*, **23**, 103-117, doi: 10.1023/a:1025576307912.
- Vasil'ev, L. A., Dzyubinskaya, E. V., Kiselevsky, D. B., Shestak, A. A., and Samuilov, V. D. (2011) Programmed cell death in plants: protective effect of mitochondrial-targeted quinones, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1120-1130, doi: 10.1134/S0006297911100051.
- Samuilov, V. D., Kiselevsky, D. B., and Oleskin, A. V. (2019) Mitochondria-targeted quinones suppress the generation of reactive oxygen species, programmed cell death and senescence in plants, *Mitochondrion*, **46**, 164-171, doi: 10.1016/j.mito.2018.04.008.
- Yamazaki, I., and Yokota, K. (1973) Oxidation states of peroxidase, *Mol. Cell. Biochem.*, **2**, 39-52, doi: 10.1007/BF01738677.
- Dell'Aglio, E., Giustini, C., Kraut, A., Couté, Y., Costa, A., et al. (2019) Identification of the Arabidopsis calmodulin-dependent NAD⁺ kinase that sustains the elicitor-induced oxidative burst, *Plant Physiol.*, **181**, 1449-1458, doi: 10.1104/pp.19.00912.
- Imlay, J. A. (2013) The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium, *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 443-454, doi: 10.1038/nrmicro3032.
- Wang, W., Xia, M. X., Chen, J., Yuan, R., Deng, F. N., and Shen, F. F. (2016) Gene expression characteristics and regulation mechanisms of superoxide dismutase and its physiological roles in plants under stress, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 465-480, doi: 10.1134/S0006297916050047.
- Alscher, R. G., Erturk, N., and Heath, L. S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, *J. Exp. Bot.*, **53**, 1331-1341.
- Tsunoda, S., Kibe, N., Kurahashi, T., and Fujii, J. (2013) Differential responses of SOD1-deficient mouse embryonic fibroblasts to oxygen concentrations, *Arch. Biochem. Biophys.*, **537**, 5-11, doi: 10.1016/j.abb.2013.06.008.
- Heikkilä, R. E., Cabbat, F. S., and Cohen, G. (1976) *In vivo* inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate, *J. Biol. Chem.*, **251**, 2182-2185.
- Cocco, D., Calabrese, L., Rigo, A., Argese, E., and Rotilio, G. (1981) Re-examination of the reaction of diethyldithiocarbamate with the copper of superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.*, **256**, 8983-8986.
- Benov, L., and Fridovich, I. (1996) Functional significance of the Cu,ZnSOD in *Escherichia coli*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **327**, 249-253, doi: 10.1006/abbi.1996.0117.
- Lushchak, V., Semchysyn, H., Lushchak, O., and Mandryk, S. (2005) Diethyldithiocarbamate inhibits *in vivo* Cu,Zn-superoxide dismutase and perturbs free radical processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1739-1744, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.10.147.
- Kelner, M. J., Bagnell, R., Hale, B., and Alexander, N. M. (1989) Inactivation of intracellular copper-zinc superoxide dismutase by copper chelating agents without glutathione depletion and methemoglobin formation, *Free Radic. Biol. Med.*, **6**, 355-360, doi: 10.1016/0891-5849(89)90079-8.
- An, J., and Hsie, A. W. (1992) Effects of an inhibitor and a mimic of superoxide dismutase on bleomycin mutagenesis in Chinese hamster ovary cells, *Mutat. Res.*, **270**, 167-175, doi: 10.1016/0027-5107(92)90127-n.
- An, J., and Hsie, A. W. (1993) Polymerase chain reaction-based deletion screening of bleomycin induced 6-thioguanine-resistant mutants in Chinese hamster ovary cells: the effects of an inhibitor and a mimic of superoxide dismutase, *Mutat. Res.*, **289**, 215-222, doi: 10.1016/0027-5107(93)90072-n.
- Pasteur, L. (1861) Expériences et vues nouvelles sur la nature de fermentations, *C. R. Acad. Sci.*, **52**, 1260-1264.
- Racker, E. (1974) History of the Pasteur effect and its pathobiology, *Mol. Cell. Biochem.*, **5**, 17-23, doi: 10.1007/BF01874168.
- Ленинджер А. (1985) *Основы биохимии*, Мир, Москва.
- Lunt, S. Y., and Vander Heiden, M. G. (2011) Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **27**, 441-464, doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.
- Pfeiffer, T., Schuster, S., and Bonhoeffer, S. (2001) Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways, *Science*, **292**, 504-507, doi: 10.1126/science.1058079.
- Warburg, O., Posener, K., and Negelein, E. (1924) Über den stoffwechsel der carcinomzelle, *Biochem. Z.*, **152**, 309-344.
- Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells, *Science*, **123**, 309-314, doi: 10.1126/science.123.3191.309.
- Sokolov, S. S., Balakireva, A. V., Markova, O. V., and Severin, F. F. (2015) Negative feedback of glycolysis and oxidative phosphorylation: mechanisms of and reasons for it, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 559-564, doi: 10.1134/S0006297915050065.
- Aykin-Burns, N., Ahmad, I. M., Zhu, Y., Oberley, L. W., and Spitz, D. R. (2009) Increased levels of superoxide and

- H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation, *Biochem. J.*, **418**, 29-37, doi: 10.1042/BJ20081258.
28. Crabtree, H. G. (1929) Observations on the carbohydrate metabolism of tumours, *Biochem. J.*, **23**, 536-545, doi: 10.1042/bj0230536.
 29. Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M., and Devin, A. (2011) The Warburg and Crabtree effects: on the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 568-576, doi: 10.1016/j.bbabo.2010.08.010.
 30. Lee, A. C., Zizi, M., and Colombini, M. (1994) Beta-NADH decreases the permeability of the mitochondrial outer membrane to ADP by a factor of 6, *J. Biol. Chem.*, **269**, 30974-30980.
 31. LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., and Bondy, S. C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 227-231, doi: 10.1021/tx00026a012.
 32. Karlsson, M., Kurz, T., Brunk, U. T., Nilsson, S. E., and Frennesson, C. I. (2010) What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem. J.*, **428**, 183-190, doi: 10.1042/BJ20100208.
 33. Sesay, A., Stewart, C. R., and Shibles, R. M. (1986) Effects of KCN and salicylhydroxamic acid on respiration of soybean leaves at different ages, *Plant Physiol.*, **82**, 443-447, doi: 10.1104/pp.82.2.443.
 34. Moore, B. D., and Edwards, G. E. (1988) The influence of leaf age on C₄ photosynthesis and the accumulation of inorganic carbon in *Flaveria trinervia*, a C₄ Dicot, *Plant Physiol.*, **88**, 125-130, doi: 10.1104/pp.88.1.125.
 35. Hajiboland, R., Rahmat, S., Zeinalzadeh, N., Farsad-Akhtar, N., and Hosseinpour-Feizi, M.-A. (2019) Senescence is delayed by selenium in oilseed rape plants, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **55**, 96-106, doi: 10.1016/j.jtemb.2019.06.005.
 36. Reddan, J. R., Giblin, F. J., Sevilla, M., Padgaonkar, V., Dziedzic, D. C., et al. (2003) Propyl gallate is a superoxide dismutase mimic and protects cultured lens epithelial cells from H₂O₂ insult, *Exp. Eye Res.*, **76**, 49-59, doi: 10.1016/s0014-4835(02)00256-7.
 37. Sugiyama, Y., Shudo, T., Hosokawa, S., Watanabe, A., Nakano, M., and Kakizuka, A. (2019) Emodin, as a mitochondrial uncoupler, induces strong decreases in adenosine triphosphate (ATP) levels and proliferation of B16F10 cells, owing to their poor glycolytic reserve, *Genes Cells*, **24**, 569-584, doi: 10.1111/gtc.12712.
 38. Reddi, A. R., and Culotta, V. C. (2013) SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration, *Cell*, **152**, 224-235, doi: 10.1016/j.cell.2012.11.046.
 39. Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett.*, **416**, 15-18, doi: 10.1016/s0014-5793(97)01159-9.
 40. Dzyubinskaya, E. V., Kiselevsky, D. B., Lobysheva, N. V., Shestak, A. A., and Samuilov, V. D. (2006) Death of stoma guard cells in leaf epidermis under disturbance of energy provision, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 1120-1127, doi: 10.1134/s0006297906100105.
 41. Petrat, F., Pindiur, S., Kirsch, M., and de Groot, H. (2003) NAD(P)H, a primary target of ¹O₂ in mitochondria of intact cells, *J. Biol. Chem.*, **278**, 3298-3307, doi: 10.1074/jbc.M204230200.
 42. Brooks, J. L. (1983) Stimulation of peroxidase reactions by hydroxamates, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **116**, 916-921.
 43. Самуилов В. Д., Киселевский Д. Б. (2016) Салицилгидроксамат усиливает НАДН-оксидазную активность пероксидазы в суспензиях митохондрий и хлоропластов гороха, *Вестник Московского университета. Серия 16, Биология*, **1**, 23-28, doi: 10.3103/S0096392516010089.
 44. Samuilov, V. D., Kiselevsky, D. B., Sinityn, S. V., Shestak, A. A., Lagunova, E. M., and Nesov, A. V. (2006) H₂O₂ intensifies CN⁻-induced apoptosis in pea leaves, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 384-394, doi: 10.1134/s0006297906040067.

EFFECTS OF SUPEROXIDE DISMUTASE INHIBITORS AND GLUCOSE ON CELL DEATH AND GENERATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN PEA LEAVES

V. D. Samuilov^{1*}, D. B. Kiselevsky^{1*}, E. V. Dzyubinskaya¹, and O. Yu. Frolova²

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia;
E-mail: vdsamuilov@mail.ru; dkiselevs@mail.ru

² Lomonosov Moscow State University, Institute of Mitoengineering, 119234 Moscow, Russia

The effect of diethyldithiocarbamate (DDC) and triethylenetetramine (triene), superoxide dismutase (SOD) inhibitors, and their combination with glucose on cells of the epidermis from pea leaves of different ages (fast growing young leaves and old leaves with slow growth) was investigated. DDC and triene caused the death of guard cells, which was determined from the destruction of their nuclei. Glucose did not affect the destruction of nuclei that was induced by SOD inhibitors in cells from old leaves, but increased it in cells from young leaves. 2-Deoxyglucose, a glycolysis inhibitor, and propyl gallate, an antioxidant that mimics SOD, suppressed the destruction of nuclei in cells of the epidermis from young, but not from old leaves, which was caused by SOD inhibitors with glucose. Glucose and triene stimulated, and propyl gallate reduced the generation of reactive oxygen species (ROS) in the pea epidermis, that was determined from the fluorescence of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP), a protonophoric uncoupler of oxidative and photosynthetic phosphorylation, suppressed DCF fluorescence in guard cells. Treatment of cells with CCCP followed by removing it by washing increased the destruction of the nuclei that was caused by SOD inhibitors and glucose. In young leaves, CCCP was less effective than in old ones. The results obtained demonstrate the effects of SOD inhibitors and glucose on cell death and generation of ROS and apparently testify to glycolysis-dependent ROS production.

Keywords: glucose, superoxide dismutase, reactive oxygen species, programmed cell death, guard cells, pea

УДК 577.25

ДОФАМИНОВЫЙ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР МОЗГА (CDNF): СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

Обзор

© 2021 Д.В. Ерёмин, Т.В. Ильчибаева, А.С. Цыбко*

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск,
Новосибирская обл., Россия; электронная почта: antoncybko@mail.ru

Поступила в редакцию 28.04.2021

После доработки 29.05.2021

Принята к публикации 06.06.2021

Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (CDNF) вместе с мезэнцефалическим астроцитарным нейротрофическим фактором (MANF) формируют уникальное семейство нейротрофических факторов, структурно и функционально отличных от других белков с нейротрофической и ростовой активностью. CDNF не имеет рецепторов на клеточной мембране и локализован преимущественно в полости эндоплазматического ретикулума (ЭПР); его первостепенной функцией является регуляция стресса ЭПР. Кроме того, CDNF способен подавлять воспаление и апоптоз. В силу своих функций CDNF демонстрирует выдающиеся защитные и восстановительные свойства в различных моделях нейропатологий, связанных со стрессом ЭПР, к которым относится и болезнь Паркинсона. Благодаря таким эффектам, CDNF уже прошёл клинические испытания с участием пациентов, страдающих болезнью Паркинсона. Несмотря на название, функции CDNF распространяются далеко за пределы дофаминовой системы мозга. В частности, имеются данные об участии CDNF в созревании и поддержании других нейротрансмиттерных систем, регуляции процессов нейропластичности и немоторного поведения. В данном обзоре мы рассматриваем особенности структуры и функций CDNF, его защитные и регенеративные свойства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нейротрофические факторы, дофаминовый нейротрофический фактор мозга CDNF, стресс ЭПР, ответ развёрнутого белка UPR, нейропротекция, болезнь Паркинсона.

DOI: 10.31857/S0320972521070071

ВВЕДЕНИЕ

Нейротрофические факторы (НТФ) — это большая группа полипептидов (длиной до 200 а.о.), играющих ключевую роль в развитии и сохранении структур как центральной и периферической нервных систем, так и многих других систем организма [1]. Они принимают участие в регуляции роста, развития, дифференциации, миграции и выживания клеточных популяций, процессах их адаптации к внешним воздействиям. Эволюционно НТФ являются очень древними, они существовали ещё до появления позвоночных животных [2].

Принятые сокращения: БП — болезнь Паркинсона; ДА — дофамин; НТФ — нейротрофический фактор; CDNF — дофаминовый нейротрофический фактор мозга (cerebral dopamine neurotrophic factor); MANF — мезэнцефалический астроцитарный нейротрофический фактор (mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor); МРТР — 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; UPR — ответ развёрнутого белка (unfolded protein response); 5-НТ — серотонин или 5-гидрокситриптамин (5-hydroxytryptamine); 6-ОНДА — 6-гидроксидофамин.

* Адресат для корреспонденции.

НТФ изучают ещё с 1940-х гг., когда был открыт первый из них — фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF). Среди наиболее известных на настоящий момент НТФ можно отметить нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), нейротрофины (NT3–7), а также глиальный нейротрофический фактор (GDNF). Кроме того, нейротрофной активностью обладает группа разнообразных белков, классифицируемых как ростовые факторы [3]. Все НТФ секретируются клеткой и связываются с рецепторами на плазматической мембране, большинство из которых работают как тирозинкиназы или активируют последние, запуская нижележащие (downstream) сигнальные пути, такие как путь регулируемой внеклеточными сигналами киназы (Ras/ERK) или путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K/Akt) [4]. Эти сигнальные каскады обеспечивают формирование синапсов, выживание, дифференциацию и созревание нейронов.

Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (cerebral dopamine neurotrophic factor, CDNF) вместе с мезэнцефалическим астроцитарным нейротрофическим фактором (mesen-

cephalic astrocyte-derived neurotrophic factor, MANF) образуют особое семейство секретируемых белков с нейротрофической активностью [5, 6]. Своё название CDNF получил благодаря способности защищать и восстанавливать дофаминергические (ДА) нейроны, продемонстрированной в двух моделях болезни Паркинсона (БП) – индуцированной 6-гидроксидофамином (6-OHDA) или 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (MPTP) у грызунов и приматов соответственно [6–8]. Нейротрофические эффекты CDNF, оказываемые на нигростриарные ДА-нейроны, послужили основой для клинических испытаний с участием пациентов с БП [9].

CDNF не обнаруживается в эмбриональном мозге и может быть детектирован в нейрональных клетках только с 10-го постнатального дня. Однако во взрослом мозге CDNF распространён широко – его можно обнаружить в слоях II–VI коры, в CA1-, CA3-областях и зубчатой извилине гиппокампа, голубом пятне и клетках Пуркиньи мозжечка [6]. Несмотря на своё название, CDNF экспрессируется и за пределами центральной нервной системы (ЦНС) и действует как на периферические нейроны (например, в кишечнике), так и на клетки отличной от нейрональной природы, особенно в тканях с высокой метаболической активностью [6, 10]. К примеру, CDNF наиболее заметно экспрессируется в сердце, мышцах и бурой жировой ткани [10].

CDNF локализуется в просвете эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и усиленно секретируется из клетки в условиях стресса. Он оказывает трофический эффект на многие ткани и типы клеток в секретируемой форме, однако также может обеспечивать защиту клеток изнутри ЭПР. Несмотря на классификацию CDNF как НТФ в силу нейропротекторного и восстанавливающего действия, структурно он не похож на какие-либо другие НТФ, к примеру, NGF, BDNF или GDNF. Кроме того, для CDNF (как, впрочем, и для MANF) не было идентифицировано рецепторов на клеточной поверхности. В этом обзоре мы рассмотрим особенности структуры и функций CDNF, а также механизмы, путём которых он обеспечивает выживание клеток при различных патологических состояниях ЦНС.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ CDNF

Структура CDNF уникальна среди нейротрофических факторов. По аминокислотному составу он на 59% сходен с MANF, но не гомоло-

гичен другим хорошо описанным НТФ (например, NGF, BDNF, GDNF), в связи с чем CDNF и MANF классифицируют как уникальное семейство белков [11]. Ген *CDNF* консервативен среди позвоночных, будь то мышь, человек или рыбка данио (*Danio rerio*) [6, 12]. В то же время беспозвоночные, такие как плодовая мушка *Drosophila melanogaster*, круглый червь *Caenorhabditis elegans* и губка *Suberites domuncula*, имеют лишь один ортологичный ген *MANF/CDNF* [13–15].

CDNF – это относительно небольшой (18–20 кДа) растворимый белок, состоящий из 187 а.о. В структуре CDNF выделяют глобулярный N-конец и неструктурированный C-конец, связанные гибкой перемычкой [11, 16, 17]. В отличие от классических НТФ, CDNF не имеет пропоследовательности для осуществления процесса ферментативной активации. На N-конце имеется только сигнальная пептидная последовательность из 26 а.о., которая необходима для перемещения белка в ЭПР, где она отщепляется. В дополнение к сигнальному пептиду N-конец содержит сапозин-подобный домен. Сапозин-подобные белки (SAPLIP), такие как гранулизин и НК-лизин, известны своей способностью взаимодействовать с мембранными липидами. В работе Bai et al. [18] было показано, что MANF взаимодействует с сульфатидом – липидом, присутствующим во внеклеточной створке клеточных мембран и во внеклеточной жидкости. Несмотря на структурную схожесть с MANF и наличие SAPLIP-домена, для CDNF взаимодействия с сульфатидом описано не было. Данный факт, вероятно, может быть объяснён функционалом остатка лизина в позиции 122, обладающей высокой консервативностью (K122). В белке MANF человека в данной позиции присутствует лизин, в то время как в CDNF – лейцин; известно, что замена K112L в MANF значительно снижает связывание сульфатидов у *H. sapiens* [18]. Вместе с тем существуют данные, указывающие на возможное участие CDNF в обмене липидов у *D. melanogaster* [19]. Факт взаимодействия с липидами сапозин-подобного домена MANF, но не CDNF, поднимает интересный вопрос о фундаментальных различиях этих двух НТФ. Связывает ли CDNF отличный по сравнению с MANF набор липидов, или связывает липиды в других условиях (например, при другом уровне pH)? Возможные роли MANF и CDNF в регуляции липидов и свойств мембран, вероятно, опосредуют различные функции, которые они выполняют при поддержании гомеостаза ЭПР.

CDNF человека содержит N-связанный и O-связанный сайты гликозилирования [20, 21].

Гликозилированная и негликозилированная формы белка обнаружены в клетках со сверхэкспрессией CDNF [20]. Вместе с тем показано, что гликозилирование не играет роли в секреции и нейропротекторной активности CDNF [6, 21].

CDNF имеет 2 мотива СХХС (Cys-X-X-Cys, где X – любая аминокислота), при этом один из них расположен на N-конце, а другой – на C-конце [11]. СХХС-мотив присутствует во многих белках с антиоксидантными свойствами, таких как дисульфидные изомеразы, которые локализуются в ЭПР и являются критически важными для фолдинга белков [22]. Кроме того, цистеины в СХХС-мотиве дисульфидных изомераз катализируют перестройку дисульфидных связей в субстратных белках, обеспечивая их правильный фолдинг [22]. Ни CDNF, ни MANF не демонстрируют оксидоредуктазной активности, однако их C-концевой СХХС-мотив важен для обеспечения цитопротективной активности. В частности, недавно было показано, что СХХС-мотив играет значимую роль при выполнении MANF функции шаперона и укладке белков в ЭПР [23]. Исходя из структуры, можно ожидать наличия сходной функции и у CDNF.

C-конец CDNF содержит SAP-подобный (SAF-A/B, Acinus, PIAS) домен, предположительно являющийся доменом связывания ДНК/РНК, однако его точная функция до сих пор не известна. Аналогичный SAP-подобный домен MANF демонстрирует связывание с рб5-субъединицей транскрипционного фактора NFκB [24] и BiP/GRP78 в его ADP-связанном состоянии, предотвращая замену нуклеотида на АТФ и таким образом регулируя активность BiP/GRP78 [25].

C-конец CDNF частично не структурирован и содержит последовательность удержания в ЭПР (ER retention sequence, ERS). C-концевые хвосты с ERS, которые взаимодействуют с KDEL-рецепторами, способствуют локализации белков-резидентов в ЭПР в состоянии гомеостаза [26]. Каноническая ERS состоит из последовательности четырёх аминокислот – лизин-аспаратат-глутамат-лейцин («KDEL» в однобуквенном коде). У CDNF – это последовательность KTEL (лизин-треонин-глутамат-лейцин), которой должно быть достаточно для удержания белка в ЭПР [27]. KTEL-последовательность играет важную роль в регуляции секреции CDNF в ответ на стресс ЭПР, связанный со снижением в нём уровня кальция [28]. Показано, что удаление ERS на C-конце CDNF приводит к его секреции и оставляет клетки беззащитными к действию тапсигаргина (индуктор стресса ЭПР) [29].

Совместно эти данные подтверждают, что CDNF является белком ЭПР с уникальными структурой и свойствами, значительно отличающимися от других хорошо изученных НТФ. Небольшие структурные отличия CDNF от MANF тем не менее могут существенно влиять на выполняемые им функции. Об этом красноречиво свидетельствуют данные, полученные на нокаутных мышцах по генам *Manf* и *Cdnf*. Так, гомозиготные нокаутные животные (*Manf*^{-/-}) отличаются серьёзными нарушениями роста, кроме того, у них развивается инсулин-зависимый диабет [30]. У гетерозиготных мышеч с дефицитом MANF наблюдается стеатоз (повышенная агрегация липидов) и фиброз печени, а также хроническое воспаление во многих тканях [31]. Напротив, гомозиготные нокаутные по *Cdnf* мыши (*Cdnf*^{-/-}) характеризуются хорошей выживаемостью, фертильностью и продолжительностью жизни, не демонстрируют заметных нарушений в развитии и обмене веществ [32]. Из этого следует, что CDNF и MANF различаются не только структурно, но и функционально, и рассматривать биологию CDNF исключительно путём сопоставления с имеющимися данными по MANF было бы ошибкой. Тем не менее представления о функциях, выполняемых CDNF, сформировались в значительной степени под влиянием исследований белка MANF.

CDNF В РЕГУЛЯЦИИ СТРЕССА ЭПР

Ответ развёрнутого белка (unfolded protein response, UPR). Эндоплазматический ретикулум является ответственным за многие критические функции, такие как синтез липидов, хранение кальция и созревание белков [33]. Когда клетка переживает различные негативные воздействия, в просвете ЭПР происходит нарушение протеостаза, что приводит к стрессу ЭПР. Ответ развёрнутого белка – это эволюционно консервативный защитный механизм клетки, призванный снизить стресс путём подавления трансляции, деградации неправильно свёрнутых белков и активации сигнальных путей, которые ведут к продукции молекулярных шаперонов, вовлечённых в фолдинг белков [34, 35]. Основным регулятором связывания с неправильно свёрнутыми белками в ЭПР является связывающий белок иммуноглобулина (BiP, также именуемый GRP78) [36]. Когда BiP отсоединяется от «сенсоров» UPR, локализованных в мембране ЭПР, происходит активация трёх связанных сигнальных путей: PKR-подобной киназы эндоплазматического ретикулума

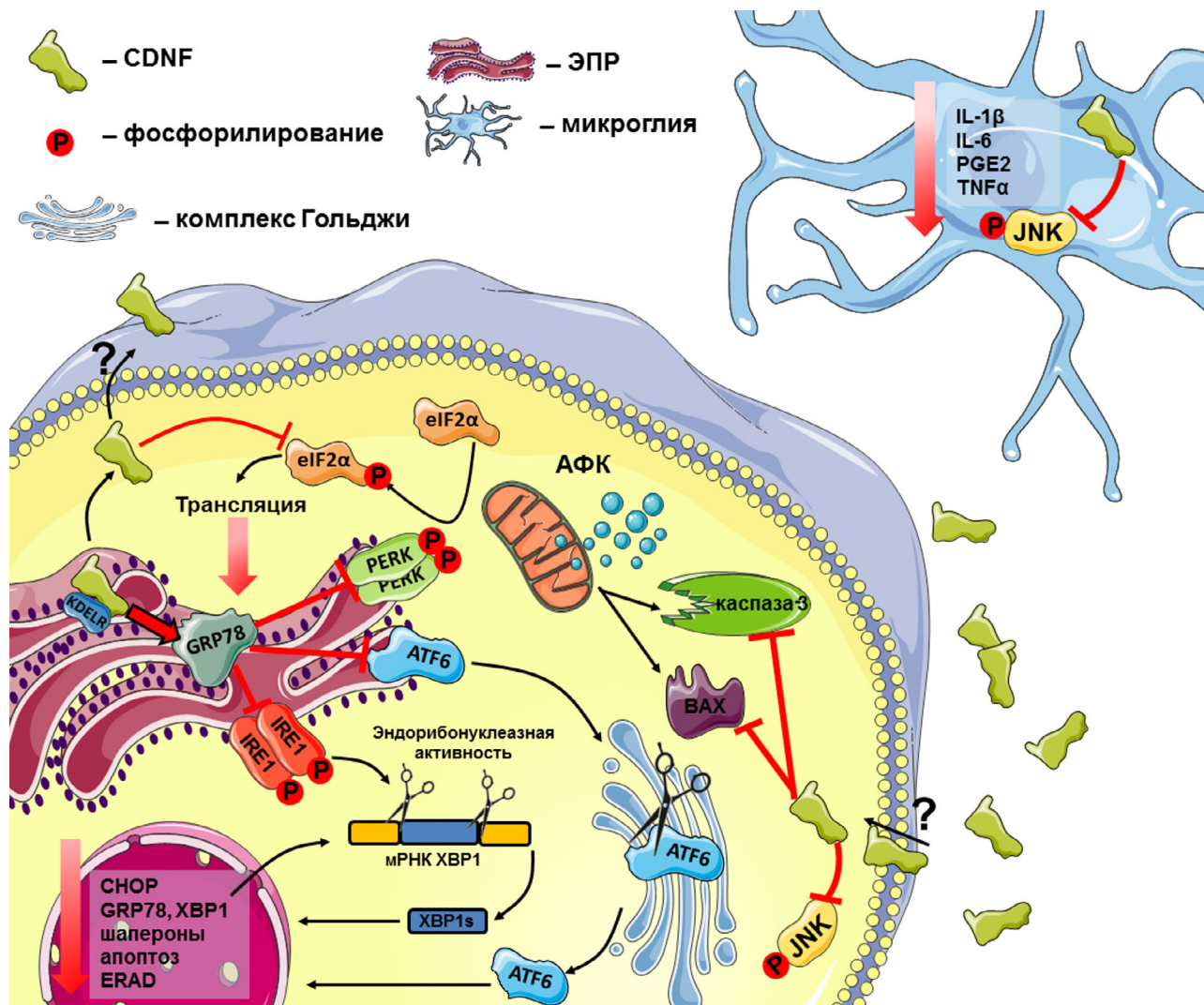


Рис. 1. Предполагаемые молекулярные механизмы нейропротекторного действия CDNF. В норме GRP78 взаимодействует с сенсорами UPR, предотвращая их активацию. Во время стресса ЭПР GRP78 диссоциирует от ATF6, IRE1 и PERK, что приводит к их активации. ATF6 переносится в комплекс Гольджи, где происходит его расщепление. Активный ATF6 действует как транскрипционный фактор, индуцируя транскрипцию шаперонов, таких как GRP78, проапоптотического фактора CHOP и белка XBP1, а также белков-регуляторов апоптоза. IRE1 активируется путём димеризации и транс-аутофосфорилирования. Цитоплазматический домен активированного IRE1 обладает эндорибонуклеазной активностью и удаляет интроны в транскрипте *XBP1*, благодаря чему формируется усечённый белок XBP1s, который выполняет функцию транскрипционного фактора. XBP1s активирует транскрипцию генов, ответственных за деградацию белков ЭПР (ERAD), а также шаперонов. Активированный PERK в форме димера фосфорилирует фактор инициации трансляции eIF2 α , что приводит к общему ингибированию трансляции белков в клетке. Вероятно, CDNF в ЭПР связывается с GRP78, стабилизирует его и предотвращает диссоциацию от ATF6, IRE1 и PERK, благодаря чему они не активируются, и вышеописанные пути не запускаются. Когда рецептор KDEL (KDELRL) не удерживает CDNF в ЭПР, тот переходит в секретированную форму и, находясь в цитоплазме, блокирует фосфорилирование eIF2 α . Кроме того, свободный CDNF связывается с эффекторами апоптоза (возможно, напрямую), BAX и каспазой-3, и блокирует их. CDNF может секретироваться и во внеклеточное пространство, однако точный механизм его взаимодействия с мембранными липидами неизвестен. В микроглиальных клетках блокада киназы JNK блокирует экспрессию и секрецию цитокинов (IL-1 β , IL-6, PGE2, TNF α), благодаря чему достигается противовоспалительный эффект. Стоит отметить, что блокада JNK может происходить также в астроцитах и нейрональных клетках. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>)

(PERK), активирующего фактора транскрипции 6 (ATF6) и инозитол-зависимого фермента 1 (IRE1) [35] (рис. 1). Аутофосфорилирование PERK приводит к фосфорилированию

eIF2 α [37], что снижает общий синтез белка, но избирательно увеличивает экспрессию белков, участвующих в окислительном стрессе, фолдинге и апоптозе. Таким образом, PERK обес-

печивает передачу сигналов выживания и смерти [38]. ATF6 расщепляется в аппарате Гольджи, и его N-концевой домен переносится в ядро для индукции транскрипции шаперонов и белков деградации, ассоциированных с ЭПР [39]. Активация IRE1 индуцирует в цитоплазме сплайсинг транскрипта *XBP1*. Усечённая версия белка XBP1 (XBP1s) переносится в ядро, где индуцирует экспрессию генов, ответственных за деградацию белков ЭПР (ERAD), а также шаперонов [40] (рис. 1).

Нарушение регуляции UPR связано со многими патологическими состояниями, такими как рак, диабет и нейродегенеративные заболевания [41, 42]. Во многих исследованиях показана причинная связь между изменением протеостаза в ЭПР и прогрессированием нейродегенеративных заболеваний, что характеризуется повышенными уровнями маркёров UPR [43].

Экспрессия CDNF при UPR. На сегодняшний день *Manf* классифицируют как один из генов-маркёров UPR, наряду с *Grp78*, *Perk* и *Xbp1* [44]. Его экспрессия усиливается в ответ на обработку клеток туникамицином – препаратом, вызывающим нарушение протеостаза в ЭПР [45], а также при индукции стресса ЭПР с помощью неверно свёрнутых пептидов [46]. Рассматривать же *Cdnf* в качестве гена-маркёра UPR пока преждевременно: нам известна единственная работа, в которой было показано усиление экспрессии CDNF в первичной культуре нейронов в ответ на воздействие туникамицина [47]. Вместе с тем исследования по взаимодействию генов, проведенные на *D. melanogaster* и *C. elegans*, имеющих лишь один гомолог *Manf/Cdnf*, подтвердили, что путь IRE1/XBP1 вовлечен в транскрипционную регуляцию вышеуказанных генов [13, 48]. Кроме того, секреция белков CDNF, как и MANF, снижается в ответ на сверхэкспрессию GRP78 и KDELR (рецептор KDELR) *in vitro* [49]. Все эти данные указывают на фундаментальное сходство механизмов, регулирующих экспрессию и секрецию CDNF и MANF. Поэтому можно ожидать, что с поступлением новых данных *Cdnf* также займёт место в числе генов-маркёров UPR.

CDNF как модулятор UPR. Представление о том, как CDNF может регулировать UPR, сложилось во многом под влиянием данных, полученных при исследовании MANF. Последний не только напрямую связывается с GRP78 [50], но и блокирует высвобождение им ADP и присоединение АТР, что позволяет стабилизировать комплекс GRP78 с «сенсорами» UPR и предотвратить запуск данной реакции [25]. Считается, что механизм регуляции стресса ЭПР с помощью CDNF сходен с таковым у MANF, т.е.

опосредуется путём стабилизации «сенсоров» UPR через связывание с GRP78 [9, 44]. Известно несколько работ, подтверждающих, что CDNF является супрессором UPR. При изучении смоделированной на крысах болезни Альцгеймера (БА) было показано, что CDNF снижает вызванную β -амилоидом активацию UPR в нейронах гиппокампа [51]. Сходным образом CDNF действовал в DA-нейронах, подверженных действию 6-OHDA в модели БП [52]. Однако нельзя расценивать функцию CDNF в UPR как исключительно супрессорную. Во-первых, *Cdnf*^{-/-} мыши с не демонстрировали увеличенную экспрессию генов-маркёров UPR в среднем мозге [32]. Во-вторых, в работе Arancibia et al. [29] продемонстрировано усиление экспрессии генов-маркёров UPR в клетках НЕК293 и первичной культуре нейронов, трансфицированных плазмидой, экспрессирующей CDNF. При этом сверхэкспрессия CDNF ингибировала апоптоз и индуцированную тапсигаргином смерть клеток [29]. Эти данные можно трактовать как свидетельство модулирующего влияния CDNF на UPR. Вероятно, в зависимости от формы и степени стресса ЭПР CDNF способен либо полностью останавливать развитие UPR, либо умеренно активировать его. В умеренной степени UPR через такие эффекторы, как ATF6 и XBP1, индуцирует экспрессию шаперонов, эффективно устраняющих последствия неправильного фолдинга белков.

АНТИАПОПТОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА CDNF

Апоптоз является важным индикатором степени нейрональной дисфункции при нейродегенеративных заболеваниях [53]. При этом известно, что стресс ЭПР значительно усиливает чувствительность клетки к индукции апоптоза [54, 55]. CDNF может предотвращать дегенерацию нейронов и подавлять апоптоз не только за счёт ингибирования стресса ЭПР, но и напрямую, модулируя вовлечённые в апоптоз пути. Было показано, что выживаемость клеток линии PC12, обработанных 6-OHDA, усиливалась с увеличением дозы белка CDNF, добавлявшегося в клеточную культуру [56]. Одновременно с этим, также дозозависимо, повышалось соотношение Bcl-2/Bax и снижалась активность каспазы-3 [56]. Точный механизм, с помощью которого CDNF подавляет активность проапоптотических белков, неизвестен, однако некоторые предположения можно сделать по аналогии с MANF. Обнаружено, что домен на C-конце MANF гомологичен SAP-домену белка Ku70

[57], ингибитора проапоптотического белка Вах [58–60]. Также было показано, что отдельно синтезированный С-конец MANF, введённый в нейроны, защищал их от индуцированного Вах апоптоза [57]. Хотя на сегодняшний день доказать прямое связывание MANF с Вах так и не удалось [61], значительное сходство С-концов MANF и CDNF оставляет возможность такого связывания и для последнего. Впрочем, можно предполагать существование и каких-либо других механизмов.

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ CDNF

Цитопротективные свойства CDNF тесно связаны с противовоспалительной активностью, чему накоплено достаточно свидетельств. Обработка туникамицином культуры первичных астроцитов крысы приводит к увеличению уровня мРНК и секреции провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α и IL-6), а сверхэкспрессия CDNF в астроцитах перед обработкой уменьшала этот воспалительный цитокиновый ответ [62]. В дальнейшем было показано усиление экспрессии CDNF в первичной культуре микроглии крысы, обработанной липополисахаридом (LPS), индуцирующим воспаление [63]. LPS – это бактериальный эндотоксин, который связывается с толл-подобным рецептором 4 (TLR4) на клеточной мембране и усиливает экспрессию провоспалительных цитокинов, таких как PGE2, IL-1 β и TNF α . Рекombинантный белок CDNF уменьшал опосредованную LPS продукцию PGE2 и IL-1 β , а вместе с этим и токсичность в микроглиальных клетках крысы [63]. Эти эффекты CDNF коррелировали со сниженным уровнем фосфорилирования киназы JNK, которая активируется под воздействием LPS одной из первых. Также было показано, что в микроглии, обработанной LPS, CDNF уменьшал активацию пути Akt/FoxO1/mTor с сопутствующим снижением уровня внеклеточного TNF α [64], что также подтверждает предположение о способности CDNF снижать секрецию цитокинов. Вместе с тем сверхэкспрессия CDNF в черной субстанции крыс, получавших 6-OHDA, ослабляла проявление воспалительных маркёров (нитрозативный стресс, глиоз и уровень IL-6), но не влияла на экспрессию цитокинов (например, TNF α и IL-1 β) в стриатуме [65]. Таким образом, противовоспалительное действие CDNF основано не только на снижении экспрессии цитокинов, а включает также иные механизмы подавления воспалительного ответа.

УЧАСТИЕ CDNF В СОЗРЕВАНИИ И ПОДДЕРЖАНИИ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ

Начиная с момента открытия, CDNF прочно ассоциируется с дофаминовой системой, что и отражено в его названии. И действительно, CDNF эффективно защищает и восстанавливает ДА-нейроны во многих моделях БП [66], а недавно было показано, что аналогичную функцию CDNF выполняет и в модели болезни Гентингтона [67]. Установлено, что экспрессия *Cdnf*, как и многих других ключевых генов дофаминовой системы, изменилась во время длительного космического полёта (на биоспутнике Бион-М1) [68, 69], что косвенно свидетельствует о его участии в адаптации ДА-нейронов к условиям микрогравитации. У мышей с нокаутом по *Cdnf* (*Cdnf*^{-/-}) наблюдается снижение экспрессии тирозингидроксилазы (ТГ), дофаминового транспортёра (ДАТ), уменьшение содержания ДА в дофаминовых нейронах подслизистой области тонкого кишечника, число самих нейронов с возрастом также значительно снижается [70]. Удивительно, но в мозге *Cdnf*^{-/-} мышей не изменяется ни число ДА-нейронов в чёрной субстанции, ни метаболизм дофамина [32]. Тем не менее авторами указанного исследования отмечены возрастные нарушения функции ДА-системы: нарушается работа ДАТ, возникает индуцированная D-амфетамином гиперактивность, что сопровождается повышенной секрецией дофамина. Всё вместе это указывает на нарушения в аксональных терминалах ДА-нейронов в стриатуме *Cdnf*^{-/-} мышей [32]. Интересно, что в одном исследовании была обнаружена ассоциация между развитием БП в позднем возрасте и полиморфизмом rs7094179 в гене *CDNF* [71]. При этом важно отметить, что данный полиморфизм, по мнению авторов исследования, вероятно, не функционален.

Недавно полученные данные указывают на то, что эффекты CDNF могут не ограничиваться исключительно дофаминовой системой. Так, у *Cdnf*^{-/-} мышей в подслизистой области тонкого кишечника продемонстрировано существенное снижение числа нейронов, экспрессирующих NO-синтазу (nNOS) и белок, связанный с геном кальцитонина (calcitonin gene-related protein, CGRP), а также ГАМКергических нейронов [70].

Показано, что рыбы *Danio rerio* с полным нокаутом гена *Cdnf* отличаются гиперактивностью и нарушениями в поведении, связанными с тревогой, социальными предпочтениями и сплоченностью стаи [72]. У этих животных также наблюдались сниженная коммуникабельность и

повышенная восприимчивость к припадкам, индуцированным пентилентетразолом, которые могут быть связаны с дефицитом сразу нескольких нейромедиаторных систем, включая ДА-нейроны, ГАМКергические и гистаминергические нейроны. Несмотря на то что уровень дофамина в головном мозге не изменялся, у рыб с дефицитом CDNF были обнаружены отклонения в группировке ДА-нейронов в кластеры. Одновременно с этим было показано снижение числа гистаминергических нейронов, окружающих ДА-нейроны. Аномально низкое количество ГАМКергических нейронов было обнаружено в гипоталамусе, а экспрессия глутаматдекарбоксилазы была снижена во всём мозге рыб, нокаутных по *Cdnf* [72]. Эти данные свидетельствуют о том, что CDNF действует как общий модулятор, регулирующий нейрогенез и созревание медиатор-специфических типов нейронов во время развития и на протяжении всей взрослой жизни, а не ограничивается только дофаминергической системой [70]. Кроме того, в исследовании Voutilainen et al. [52] было показано, что CDNF способен активировать PI3K/Akt сигнальный путь как *in vitro*, так и *in vivo*, причём даже в неповреждённом мозге. Поскольку указанный сигнальный путь является необходимым компонентом процесса долговременной потенциации [73, 74], можно предположить, что CDNF принимает самое активное участие в процессах нейропластичности, связанных с обучением и памятью – и этому уже найдены первые доказательства. В работе Kemppainen et al. [75] было продемонстрировано, что введение в гиппокамп белка CDNF или вирусного конструкта, обеспечивающего его сверхэкспрессию, улучшало формирование долговременной пространственной памяти у мышей. Работы, выполненные авторами настоящего обзора, показали, что однократная инъекция белка CDNF в желудочек мозга мышей влияет на ассоциативное обучение животных даже через 10 дней после инъекции, при этом наблюдаются изменения в транскрипции ряда генов серотониновой (5-гидрокситриптамин, 5-НТ) системы мозга, например, кодирующих фермент триптофангидроксилазу 2 и серотониновый рецептор подтипа 2A (5-НТ_{2A}) [76]. В другом исследовании мы обнаружили, что индукция сверхэкспрессии CDNF в дорсальном гиппокампе крыс ухудшает формирование условно-рефлекторного страха, что сопровождается повышенными уровнями мРНК генов, кодирующих *c-Fos*, CREB и 5-НТ_{1B} рецептор [77]. Также нами получено косвенное свидетельство того, что не только CDNF модулирует развитие и функцию медиаторных систем, но и сами медиаторы че-

рез свои рецепторы могут влиять на экспрессию данного НТФ. Так, в МРTP-модели БП на мышцах в повреждённом токсинном стриатуме уровень мРНК CDNF был ожидаемо повышен, однако при введении атипичных антипсихотических препаратов, клозапина или кветиапина, уровень мРНК снижался до базового [78]. Поскольку клозапин и кветиапин являются полными или частичными антагонистами ДА- и 5-НТ-рецепторов (здесь стоит отметить значительное сродство с 5-НТ_{2A}-рецепторами), а также гистаминовых и мускариновых рецепторов, можно предположить, что и нейромедиаторы могут модулировать экспрессию CDNF через указанные рецепторы. Интересно, что для хорошо изученных НТФ, таких как BDNF и GDNF, модуляция со стороны различных нейромедиаторных систем является одной из характерных черт [79, 80].

Вышеприведённые факты свидетельствуют о том, что несмотря на значительные структурные особенности и уникальный механизм действия, функционально CDNF гораздо ближе к классическим НТФ, чем считалось изначально. Даже больше – сегодня у нас есть все основания классифицировать CDNF как полноценный НТФ.

ТРОФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ CDNF ПРИ НЕЙРОПАТОЛОГИЯХ, СВЯЗАННЫХ СО СТРЕССОМ ЭПР

Изменения в экспрессии CDNF отмечены при заболеваниях, связанных со стрессом ЭПР, включая ишемию мозга [20, 47, 81] и БП [82]. Несмотря на то что данные об участии CDNF в патогенезе тех или иных заболеваний ограничены [71, 83–85], результаты многочисленных испытаний на различных моделях нейропатологий убедительно демонстрируют выдающиеся защитные и восстановительные эффекты CDNF (таблица).

Болезнь Паркинсона. Существует множество свидетельств значительной роли UPR в патогенезе БП [86]. В постмортальных исследованиях ДА-нейронов чёрной субстанции у пациентов с БП было выявлено чрезмерное фосфорилирование PERK и IRE1; эти же белки в активированной форме обнаруживаются в нейронах с включениями α -синуклеина, который является главным компонентом телец Леви, основного нейропатологического маркера БП [87–90]. В моделях БП с применением токсинов (МРTP, 6-ОНДА) также наблюдается активация молекулярных путей UPR [91–93]. Более того, применение ингибитора PERK, GSK2606414 [90], или сверхэкспрессия XBP1 [94] позволяют достичь значительных улучшений у эксперимен-

CDNF в моделях нейропатологий

Заболевание	Модельная система	Вид/культура	Эффект	Механизм	Ссылки
Болезнь Паркинсона	MPTP	макак-резус	регенерация ДА-нейронов и восстановление моторных функций	ТГ-позитивные клетки в SN ↑	[9]
	6-OHDA	мармозетка	регенерация ДА-нейронов	ДАТ ↑	[8]
	6-OHDA	крыса	регенерация ДА-нейронов и восстановление моторных функций	ТГ-позитивные клетки в SN ↑	[6]
	6-OHDA	крыса	регенерация ДА-нейронов и восстановление моторных функций	ТГ-позитивные клетки в SN ↑; ТГ-позитивные фибробласты в St ↑	[97]
	6-OHDA	крыса	защита ДА-нейронов и восстановление моторных функций	частичная защита ТГ-позитивных нейронов и волокон в SN и St	[100]
	6-OHDA	крыса	регенерация ДА-нейронов и восстановление моторных функций	ТГ-позитивные клетки в SN ↑; ТГ-позитивные волокна в St ↑; функция ДА-нейронов ↑	[101]
	6-OHDA	крыса	защита ДА-нейронов и восстановление моторных функций	комбинированная сверхэкспрессия CDFN и MANF; защита ТГ-позитивных клеток; ТГ-позитивные волокна в St ↑	[102]
	6-OHDA	крыса	регенерация ДА-нейронов и восстановление моторных функций	экспрессия маркеров стресса ЭПР ↓; ТГ-позитивные клетки в SN ↑; ТГ-позитивные волокна в St ↑	[52]
	6-OHDA	крыса	регенерация ДА-нейронов и восстановление моторных функций (через 2, но не 5 недель после повреждения)	ТГ-позитивные клетки в SN ↑ при введении AAV8-CDNF не более чем через 2 недели после воздействия 6-OHDA	[105]
	6-OHDA	крыса	улучшение моторных функций при комбинировании CDFN и DBS	ТГ в SN ↑	[104]
	MPTP	мышь	защита и регенерация ДА-нейронов и восстановление моторных функций	ТГ-позитивные клетки в SN ↑; ТГ-позитивные волокна в St ↑	[7]
	6-OHDA и α-синуклеин	ДА-нейроны мыши	защита ДА-нейронов	олигомеры α-синуклеина ↓	[95]
	α-синуклеин	мышь, крыса, нейроны гиппокампа	защита нейронов, восстановление моторных функций	олигомеры α-синуклеина ↓	[96]
MPP ⁺	ДА-нейроны крысы	защита ДА-нейронов	комбинированное действие CDFN и синтетического нейртурина (N4); функция ДАТ ↑	[103]	
Болезнь Альцгеймера	линия APP/PS1	мышь	улучшение пространственного обучения и памяти	не известен	[75]

Окончание таблицы

Заболевание	Модельная система	Вид/культура	Эффект	Механизм	Ссылки
	β-амилоид	нейроны гиппокампа крысы	защита клеток от вызван- ной β-амилоидом синапто- токсичности	стресс ЭПР ↓	[51]
Повреждения нервов	перерезка седалищ- ного нерва	крыса	регенерация нерва и вос- становление его функции, предотвращение атрофии иннервируемой мышечной ткани	регенерация аксона и шванновских клеток; тол- щина миелинового слоя ↑	[62]
	перерезка седалищ- ного нерва	крыса	регенерация нерва и вос- становление его функции, предотвращение атрофии иннервируемой мышечной ткани	регенерация аксонов и шванновских клеток при трансплантации продуци- рующих CDNF MSCs; тол- щина миелинового слоя ↑	[110]
	травматическое повреждение спин- ного мозга	крыса	регенерация нервных во- локон, восстановление мо- торных и сенсомоторных функций	нейровоспаление ↓; про- воспалительные цито- кины ↓; ремиелинизация и регенерация волокон при трансплантации продуци- рующих CDNF MSCs	[111]
Ишемия	окклюзия средней мозговой артерии	крыса	уменьшение ишемической области и улучшение мо- торных функций	апоптоз ↓	[47]
	ишемия/реперфузия	крыса	улучшение показателей асимметрии тела и сниже- ние баллов по шкале Би- дерсона	без эффекта на регенера- цию нейронов и фагоци- тарную активность	[107]

Примечание. 6-OHDA – 6-гидроксидофамин; MPTP – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; ДА – дофаминергические; ТГ – тирозингидроксилаза; ДАТ – транспортёр дофамина; SN – чёрная субстанция; St – стриатум; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; DBS – глубокая стимуляция мозга; MSCs – мезенхимальные стволовые клетки, AAV8 – аденоассоциированный вирусный вектор 8. В квадратных скобках указаны ссылки на соответствующие публикации в списке литературы.

тальных животных. Способность модулировать UPR – это уникальное свойство CDNF, которое отличает его от других НТФ, также рассматриваемых в качестве терапевтических средств при БП. Так, при сравнении CDNF и GDNF в модели 6-OHDA, только введение белка CDNF снижало экспрессию маркёров стресса ЭПР [52]. Кроме того, в исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано, что CDNF может защищать ДА-нейроны от токсичного влияния олигомеров α-синуклеина [95, 96]. Более того, в недавней работе Albert et al. [96] показали, что CDNF физически связывается с α-синуклеином, предотвращая интернализацию его фибрилл в нейроны, и способствует образованию нерастворимых фосфорилированных включений α-синуклеина, ингибируя образование токсичных олигомеров дан-

ного белка. Этот эффект был продемонстрирован не только в культуре первичных нейронов гиппокампа, но и на животных. Мышам и старым крысам через месяц после инъекции фибрилл α-синуклеина в стриатум остро или хронически вводили CDNF. Несмотря на то что увеличения числа ТГ-позитивных нейронов показано не было, у животных наблюдалось значительное улучшение моторных функций. Надо сказать, что такие эффекты по отношению к α-синуклеину совершенно не характерны для других НТФ.

К настоящему моменту проведён целый ряд испытаний CDNF на различных моделях БП. Уже в первом из них было показано, что односторонняя инъекция белка CDNF в стриатум крыс в 6-OHDA модели приводит к значитель-

ному восстановлению моторных функций, защите и регенерации ДА-нейронов и их отростков в нигростриарном пути [6]. Схожего эффекта на этой же модели БП удалось добиться при двухнедельном введении CDNF в стриатум с помощью осмотической минипомпы [97]. GDNF в указанном исследовании показал довольно скромный эффект. Стоит также отметить, что CDNF диффундировал в ткани значительно лучше по сравнению с GDNF [97]. Как стало известно из исследования Mätlik et al. [98], белок CDNF с большой эффективностью транспортируется ретроградно по аксонам ДА-нейронов и после инъекции в стриатум он наблюдается исключительно в их телах в чёрной субстанции. В МРТР-модели на мышах двусторонняя инъекция CDNF в стриатум за 20 ч до или 1 неделю после воздействия МРТР улучшала горизонтальную и вертикальную двигательную активность, что сопровождалось увеличением числа ДА-нейронов и их отростков в чёрной субстанции и стриатуме соответственно [99]. Сверхэкспрессия CDNF с помощью вектора AAV2 в стриатуме также оказывает защитный эффект на ДА-нейроны и, таким образом, противодействует токсичным эффектам 6-OHDA, предотвращая двигательные нарушения [100, 101]. В одном исследовании был показан аддитивный эффект от сверхэкспрессии CDNF и MANF в чёрной субстанции [102], однако по уровням обоих НТФ после генной терапии данных нет, как и не ясна биологическая активность этих белков при доставке в нейроны с помощью лентивирусного вектора. Также недавно был показан аддитивный эффект белка CDNF и синтетического варианта нейртурина (N4) на культуру ДА-нейронов из чёрной субстанции, обработанную MPP+ (токсичный метаболит МРТР) [103].

Ожидается, что терапевтические эффекты CDNF зависят от числа сохранившихся ДА-нейронов в нигростриарном пути. В тех моделях БП, что пытаются воспроизвести позднюю стадию болезни со значительной потерей нейронов, введение белка CDNF [104] или его сверхэкспрессия [105] позволяют достичь лишь ограниченного эффекта.

CDNF был протестирован в двух моделях БП на приматах. В одном исследовании на мартышках (*Callithrix jacchus*) с односторонней инъекцией 6-OHDA хроническое введение CDNF в поражённый стриатум привело к увеличению радиолигандного связывания DAT, зафиксированного с помощью позитронно-эмиссионной томографии [8], что свидетельствует о восстановлении терминалей ДА-нейронов. GDNF, использовавшийся в качестве положительного контроля в данном исследовании, по-

добного эффекта не продемонстрировал [8]. У пожилых макак-резус (*Macaca mulatta*), которым была проведена унилатеральная инъекция МРТР, введение CDNF способствовало улучшению моторных функций и восстановлению ДА-нейронов в чёрной субстанции [9].

Токсикологические исследования повторных двусторонних инъекций рекомбинантного белка CDNF в стриатум макак-резус показали полную безопасность данного НТФ [9]. Это позволило перейти к клиническим испытаниям с участием добровольцев с БП. В рандомизированном плацебо-контролируемом мультицентровом исследовании фазы I–II, начатом в конце 2017 г., приняли участие 18 пациентов с идиопатической БП средней степени тяжести (идентификатор NCT03295786 на ClinicalTrials.gov), которым CDNF вводился в стриатум ежемесячно в течение 6 мес. Полные результаты исследования, которое завершилось в августе 2020 г., ещё не опубликованы, однако, по предварительным данным, показана безопасность CDNF через 6 и 12 мес. после начала введения, а также сообщается об усилении функции DAT и моторных функций пациентов [106].

Ишемия. Исследований, посвященных оценке защитных и восстановительных свойств CDNF при ишемическом поражении головного мозга, известно значительно меньше по сравнению с MANF. У крыс в модели ишемии, вызванной окклюзией средней мозговой артерии, уровни CDNF в перинфарктной области повышались через 2 ч [47], что прямо указывает на участие CDNF в устранении последствий стресса ЭПР. Более того, при введении CDNF перед окклюзией наблюдалось не только уменьшение ишемической области и снижение в ней уровня апоптоза, но также улучшение моторных функций животных [47]. Введение белка CDNF в таламус крыс на 7-й день после кортикальной ишемии/реперфузии обеспечило функциональное восстановление животных, что отразилось в улучшении показателей асимметрии тела и снижении баллов по шкале Бидерсона (Bederson's score) [107]. Тем не менее функциональные улучшения не сопровождалось восстановлением утраченных нейронов и снижением фагоцитарной активности [107].

Болезнь Альцгеймера. Несмотря на то что большинство исследований CDNF при нейродегенеративных заболеваниях сосредоточено на БП, существуют также доказательства того, что CDNF оказывает положительное влияние и в моделях БА. В работе Zhou et al. [51] на первичной культуре нейронов гиппокампа крысы добавление в среду рекомбинантного белка CDNF снижало стресс ЭПР, вызванный обработкой

β -амилоидом, и защищало клетки от вызванной β -амилоидом синаптотоксичности, которая, как считается, предшествует потере нейронов и соответствует проявлению когнитивных нарушений, наблюдаемых при БА.

Чрезвычайно интересные результаты были получены на модели БА *in vivo* — двойных трансгенных мышях APP/PS1 (белок-предшественник амилоида/пресенилин 1). Данная линия является широко используемой моделью БА. У этих мышей обнаруживаются отложения β -амилоида, накапливающиеся в мозге с течением времени, причём они регистрируются в значительном количестве уже в возрасте 6 месяцев [108]. Данный процесс сопровождается дефицитом кратковременной и долговременной памяти [109]. Группой ученых под руководством Kemppainen в 2015 г. [75] было показано, что введение в гиппокамп рекомбинантного белка CDNF или AAV2-конструкта, обеспечивающего сверхэкспрессию CDNF, улучшало долговременную память как у мышей линии APP/PS1, так и у животных дикого типа. При этом никакого влияния на проявление неophobia и ранние стадии пространственного обучения выявлено не было. Важно отметить, что улучшение долговременной памяти у мышей APP/PS1 не было связано со снижением накопления β -амилоида или усилением нейрогенеза в гиппокампе [75], что заставляет предполагать существование пока не известного механизма, благодаря которому CDNF оказывает влияние на синаптическую пластичность и память.

Повреждение периферических нервов. Повреждения периферических нервов часто приводят к дегенерации аксонов и потере нейронов, что ведёт к ухудшению регенерации и тяжёлым функциональным нарушениям. У крыс с перерезанным седалищным нервом индукция сверхэкспрессии CDNF с помощью лентивирусного вектора приводила к значительным улучшениям регенерации аксонов и шванновских клеток, что способствовало увеличению толщины миелинового слоя [62]. В другом исследовании на аналогичной модели мезенхимальные стволовые клетки были трансдуцированы CDNF с помощью вектора на основе лентивируса и помещены в коллагеновые трубки для оценки регенеративного эффекта [110]. И вновь влияние CDNF позволило достичь значительного усиления регенерации аксонов и шванновских клеток, увеличило уровень миелинизации и диаметр аксонов. В обоих вышеописанных исследованиях наблюдалось восстановление перерезанного седалищного нерва, его функции, предотвращение атрофии иннервируемой им мышечной ткани [62, 110]. Регенерационный потенциал CDNF был продемонстрирован и в модели травматического повреждения спинного мозга. Введение мезенхимальных стволовых клеток со сверхэкспрессией CDNF в область поражения подавляло нейровоспаление, снижало продукцию провоспалительных цитокинов, активировало ремиелинизацию и регенерацию нервных волокон, что в итоге приводило к восстановлению моторных и сенсомоторных функ-

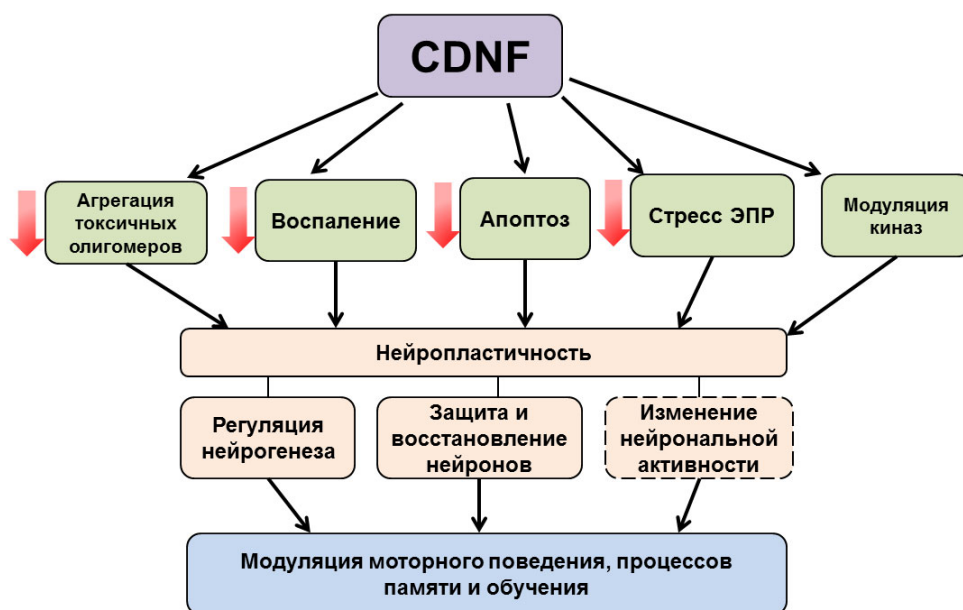


Рис. 2. Обобщающая схема эффектов CDNF. Пунктиром обозначен гипотетический механизм

ций у животных [111]. Способность CDNF обеспечивать регенерацию и функциональное восстановление нервных волокон делает этот НТФ многообещающим средством для лечения повреждений периферических нервов и спинного мозга, эффективная терапия которых на данный момент отсутствует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

CDNF обладает уникальной структурой и свойствами, отличающими его от других НТФ. Благодаря способности негативно регулировать UPR, подавлять апоптоз и воспаление, терапевтический потенциал CDNF значительно превосходит аналогичные возможности прочих НТФ. К примеру, попытки клинического применения GDNF в терапии БП имеют уже 20-летнюю историю, однако существенного прогресса добиться пока не удалось. Напротив, применение CDNF открывает новые возможности в терапии БП, как и в лечении других неврологических расстройств. Вместе с тем множатся данные об участии CDNF в созревании и функционировании не только дофаминергической, но и других нейротрансмиттерных систем. Кроме того, как показывают результаты некоторых исследований, CDNF, вероятно, вовлечён в контроль сложных форм поведения, таких как пространственное обучение (рис. 2). Есть основания полагать, что благодаря нейротрофным свойствам CDNF спектр регулируемых им форм поведения может быть даже шире. Сосредоточенность большинства работ на участии CDNF в контроле моторных

функций понятна в контексте терапии БП, однако исследовательский охват стоит расширить – как по причине возможного применения данного НТФ в терапии других нейропатологий, так и в фундаментальном плане, для лучшего понимания процессов нейропластичности в здоровом мозге.

Перспектива клинического применения CDNF диктует необходимость изучения точных механизмов, с помощью которых данный НТФ регулирует процессы нейропластичности, однако и уже знакомые функции CDNF требуют более тщательного исследования. Последние данные показывают, что в некоторых аспектах CDNF и близкородственный MANF имеют фундаментальные отличия (например, это касается взаимодействия с липидами). Из этого следует, что хорошо изученные молекулярные особенности MANF не могут быть полностью транслированы на CDNF. В частности, это касается модулирующей роли CDNF в регуляции UPR при различных формах стресса ЭПР. В каких случаях белки UPR блокируются, в каких – активируются, и как это способствует выживанию нейронов? Эти вопросы ещё ждут ответов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-00016).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Skaper, S. D. (2018) Neurotrophic factors: an overview, *Methods Mol. Biol.*, **1727**, 1-17, doi: 10.1007/978-1-4939-7571-6_1.
- Bothwell, M. (2014) NGF, BDNF, NT3, and NT4, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **220**, 3-15, doi: 10.1007/978-3-642-45106-5_1.
- Voutilainen, M. H., Arumäe, U., Airavaara, M., and Saarma, M. (2015) Therapeutic potential of the endoplasmic reticulum located and secreted CDNF/MANF family of neurotrophic factors in Parkinson's disease, *FEBS Lett.*, **589**, 3739-3748, doi: 10.1016/j.febslet.2015.09.031.
- Airaksinen, M. S., and Saarma, M. (2002) The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value, *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, 383-394, doi: 10.1038/nrn812.
- Petrova, P., Raibekas, A., Pevsner, J., Vigo, N., Anafi, M., et al. (2003) MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons, *J. Mol. Neurosci.*, **20**, 173-188, doi: 10.1385/jmn:20:2:173.
- Lindholm, P., Voutilainen, M. H., Laurén, J., Peränen, J., Leppänen, V. M., et al. (2007) Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons *in vivo*, *Nature*, **448**, 73-77, doi: 10.1038/nature05957.
- Airavaara, M., Harvey, B. K., Voutilainen, M. H., Shen, H., Chou, J., et al. (2012) CDNF protects the nigrostriatal dopamine system and promotes recovery after MPTP treatment in mice, *Cell Transplant.*, **21**, 1213-1223, doi: 10.3727/096368911X600948.
- Garea-Rodríguez, E., Eesmaa, A., Lindholm, P., Schlumbohm, C., König, J., et al. (2016) Comparative analysis of the effects of neurotrophic factors CDNF and GDNF in a nonhuman primate model of Parkinson's disease, *PLoS One*, **11**, e0149776, doi: 10.1371/journal.pone.0149776.
- Huttunen, H. J., and Saarma, M. (2019) CDNF protein therapy in Parkinson's disease, *Cell Transplant.*, **28**, 349-366, doi: 10.1177/0963689719840290.
- Danilova, T., Galli, E., Pakarinen, E., Palm, E., Lindholm, P., et al. (2019) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) is highly expressed in mouse tissues with metabolic function, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **10**, 765, doi: 10.3389/fendo.2019.00765.

11. Parkash, V., Lindholm, P., Peränen, J., Kalkkinen, N., Oksanen, E., et al. (2009) The structure of the conserved neurotrophic factors MANF and CDNF explains why they are bifunctional, *Protein Eng. Des. Sel.*, **22**, 233-241, doi: 10.1093/protein/gzn080.
12. Chen, Y. C., Baronio, D., Semenova, S., Abdurakhmanova, S., and Panula, P. (2020) Cerebral dopamine neurotrophic factor regulates multiple neuronal subtypes and behavior, *J. Neurosci.*, **40**, 6146-6164, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2636-19.2020.
13. Lindström, R., Lindholm, P., Kallijärvi, J., Yu, L. Y., Piepponen, T. P., et al. (2013) Characterization of the structural and functional determinants of MANF/CDNF in *Drosophila in vivo* model, *PLoS One*, **8**, e73928, doi: 10.1371/journal.pone.0073928.
14. Sereno, D., Müller, W. E. G., Bausen, M., Elkhooly, T. A., Markl, J. S., and Wiens, M. (2017) An evolutionary perspective on the role of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF): at the crossroads of proliferant innate immune and apoptotic pathways, *Biochem. Biophys. Rep.*, **11**, 161-173, doi: 10.1016/j.bbrep.2017.02.009.
15. Richman, C., Rashid, S., Prashar, S., Mishra, R., Selvaganapathy, P. R., and Gupta, B. P. (2018) *C. elegans* MANF homolog is necessary for the protection of dopaminergic neurons and ER unfolded protein response, *Front. Neurosci.*, **12**, 544, doi: 10.3389/fnins.2018.00544.
16. Hellman, M., Peränen, J., Saarma, M., and Permi, P. (2010) ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of the human mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor, *Biomol. NMR Assign.*, **4**, 215-217, doi: 10.1007/s12104-010-9251-8.
17. Latgé, C., Cabral, K. M., Almeida, M. S., and Foguel, D. (2013) (¹H)-, (¹³C)- and (¹⁵N)-NMR assignment of the N-terminal domain of human cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF), *Biomol. NMR Assign.*, **7**, 101-103, doi: 10.1007/s12104-012-9388-8.
18. Bai, M., Vozdek, R., Hnizda, A., Jiang, C., Wang, B., et al. (2018) Conserved roles of *C. elegans* and human MANFs in sulfatide binding and cytoprotection, *Nat. Commun.*, **9**, 897, doi: 10.1038/s41467-018-03355-0.
19. Palgi, M., Greco, D., Lindström, R., Auvinen, P., and Heino, T. I. (2012) Gene expression analysis of *Drosophila Manf* mutants reveals perturbations in membrane traffic and major metabolic changes, *BMC Genomics*, **13**, 134, doi: 10.1186/1471-2164-13-134.
20. Apostolou, A., Shen, Y., Liang, Y., Luo, J., and Fang, S. (2008) Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death, *Exp. Cell Res.*, **314**, 2454-2467, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.05.001.
21. Sun, Z. P., Gong, L., Huang, S. H., Geng, Z., Cheng, L., and Chen, Z. Y. (2011) Intracellular trafficking and secretion of cerebral dopamine neurotrophic factor in neurosecretory cells, *J. Neurochem.*, **117**, 121-132, doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07179.x.
22. Appenzeller-Herzog, C., and Ellgaard, L. (2008) The human PDI family: versatility packed into a single fold, *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 535-548, doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.11.010.
23. Arrieta, A., Blackwood, E. A., Stauffer, W. T., Santo Domingo, M., Bilal, A. S., et al. (2020) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is an ER-resident chaperone that protects against reductive stress in the heart, *J. Biol. Chem.*, **295**, 7566-7583, doi: 10.1074/jbc.RA120.013345.
24. Chen, L., Feng, L., Wang, X., Du, J., Chen, Y., et al. (2015) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is involved in inflammation by negatively regulating the NF- κ B pathway, *Sci. Rep.*, **5**, 8133, doi: 10.1038/srep08133.
25. Yan, Y., Rato, C., Rohland, L., Preissler, S., and Ron, D. (2019) MANF antagonizes nucleotide exchange by the endoplasmic reticulum chaperone BiP, *Nat. Commun.*, **10**, 541, doi: 10.1038/s41467-019-08450-4.
26. Mei, M., Zhai, C., Li, X., Zhou, Y., Peng, W., et al. (2017) Characterization of aromatic residue-controlled protein retention in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **292**, 20707-20719, doi: 10.1074/jbc.M117.812107.
27. Henderson, M. J., Richie, C. T., Airavaara, M., Wang, Y., and Harvey, B. K. (2013) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) secretion and cell surface binding are modulated by KDEL receptors, *J. Biol. Chem.*, **288**, 4209-4225, doi: 10.1074/jbc.M112.400648.
28. Trychta, K. A., Bäck, S., Henderson, M. J., and Harvey, B. K. (2018) KDEL receptors are differentially regulated to maintain the ER proteome under calcium deficiency, *Cell Rep.*, **25**, 1829-1840.e6, doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.055.
29. Arancibia, D., Zamorano, P., and Andrés, M. E. (2018) CDNF induces the adaptive unfolded protein response and attenuates endoplasmic reticulum stress-induced cell death, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.*, **1865**, 1579-1589, doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.08.012.
30. Lindahl, M., Danilova, T., Palm, E., Lindholm, P., Vöikar, V., et al. (2014) MANF is indispensable for the proliferation and survival of pancreatic β cells, *Cell Rep.*, **7**, 366-375, doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.023.
31. Sousa-Victor, P., Neves, J., Cedron-Craft, W., Ventura, P. B., Liao, C. Y., et al. (2019) MANF regulates metabolic and immune homeostasis in ageing and protects against liver damage, *Nat. Metab.*, **1**, 276-290, doi: 10.1038/s42255-018-0023-6.
32. Lindahl, M., Chalazonitis, A., Palm, E., Pakarinen, E., Danilova, T., et al. (2020) Cerebral dopamine neurotrophic factor deficiency leads to degeneration of enteric neurons and altered brain dopamine neuronal function in mice, *Neurobiol. Dis.*, **134**, 104696, doi: 10.1016/j.nbd.2019.104696.
33. Schwarz, D. S., and Blower, M. D. (2016) The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling, *Cell. Mol. Life Sci.*, **73**, 79-94, doi: 10.1007/s00018-015-2052-6.
34. Walter, P., and Ron, D. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 519-529, doi: 10.1038/nrm2199.
35. Hetz, C. (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 89-102, doi: 10.1038/nrm3270.
36. Dudek, J., Benedix, J., Cappel, S., Greiner, M., Jalal, C., et al. (2009) Functions and pathologies of BiP and its interaction partners, *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 1556-1569, doi: 10.1007/s00018-009-8745-y.
37. Sonenberg, N., and Hinnebusch, A. G. (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets, *Cell*, **136**, 731-745, doi: 10.1016/j.cell.2009.01.042.
38. McQuiston, A., and Diehl, J. A. (2017) Recent insights into PERK-dependent signaling from the stressed endoplasmic reticulum, *F1000Res.*, **6**, 1897, doi: 10.12688/f1000research.12138.1.
39. Nagelkerke, A., Bussink, J., Sweep, F. C., and Span, P. N. (2014) The unfolded protein response as a target for cancer therapy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1846**, 277-284, doi: 10.1016/j.bbcan.2014.07.006.
40. Majumder, M., Huang, C., Snider, M. D., Komar, A. A., Tanaka, J., et al. (2012) A novel feedback loop regulates the response to endoplasmic reticulum stress via the cooperation of cytoplasmic splicing and mRNA translation, *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 992-1003, doi: 10.1128/MCB.06665-11.

41. Brown, M. K., and Naidoo, N. (2012) The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases, *Front. Physiol.*, **3**, 263, doi: 10.3389/fphys.2012.00263.
42. Roussel, B. D., Kruppa, A. J., Miranda, E., Crowther, D. C., Lomas, D. A., and Marciniak, S. J. (2013) Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease, *Lancet Neurol.*, **12**, 105-118, doi: 10.1016/S1474-4422(12)70238-7.
43. Ghemrawi, R., and Khair, M. (2020) Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in neurodegenerative diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6127, doi: 10.3390/ijms21176127
44. Jäntti, M., and Harvey, B. K. (2020) Trophic activities of endoplasmic reticulum proteins CDNF and MANF, *Cell Tissue Res.*, **382**, 83-100, doi: 10.1007/s00441-020-03263-0.
45. Mizobuchi, N., Hoseki, J., Kubota, H., Toyokuni, S., Nozaki, J. I., et al. (2007) ARMET is a soluble ER protein induced by the unfolded protein response via ERSE-II element, *Cell. Struct. Funct.*, **32**, 41-50, doi: 10.1247/csf.07001.
46. Bergmann, T. J., Fregno, I., Fumagalli, F., Rinaldi, A., Bertoni, F., et al. (2018) Chemical stresses fail to mimic the unfolded protein response resulting from luminal load with unfolded polypeptides, *J. Biol. Chem.*, **293**, 5600-5612, doi: 10.1074/jbc.RA117.001484.
47. Zhang, G. L., Wang, L. H., Liu, X. Y., Zhang, Y. X., Hu, M. Y., et al. (2018) Cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) has neuroprotective effects against cerebral ischemia that may occur through the endoplasmic reticulum stress pathway, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1905, doi: 10.3390/ijms19071905.
48. Hartman, J. H., Richie, C. T., Gordon, K. L., Mello, D. F., Castillo, P., et al. (2019) MANF deletion abrogates early larval *Caenorhabditis elegans* stress response to tunicamycin and *Pseudomonas aeruginosa*, *Eur. J. Cell Biol.*, **98**, 151043, doi: 10.1016/j.ejcb.2019.05.002.
49. Norisada, J., Hirata, Y., Amaya, F., Kiuchi, K., and Ohhashi, K. (2016) A comparative analysis of the molecular features of MANF and CDNF, *PLoS One*, **11**, e0146923, doi: 10.1371/journal.pone.0146923.
50. Glembotski, C. C., Thuerauf, D. J., Huang, C., Vekich, J. A., Gottlieb, R. A., and Doroudgar, S. (2012) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor protects the heart from ischemic damage and is selectively secreted upon sarco/endoplasmic reticulum calcium depletion, *J. Biol. Chem.*, **287**, 25893-25904, doi: 10.1074/jbc.M112.356345.
51. Zhou, W., Chang, L., Fang, Y., Du, Z., Li, Y., et al. (2016) Cerebral dopamine neurotrophic factor alleviates A β 25-35-induced endoplasmic reticulum stress and early synaptotoxicity in rat hippocampal cells, *Neurosci. Lett.*, **633**, 40-46, doi: 10.1016/j.neulet.2016.09.008.
52. Voutilainen, M. H., De Lorenzo, F., Stepanova, P., Bäck, S., Yu, L. Y., et al. (2017) Evidence for an additive neurorestorative effect of simultaneously administered CDNF and GDNF in hemiparkinsonian rats: implications for different mechanism of action, *eNeuro*, **4**, ENEURO.0117-16.2017, doi: 10.1523/ENEURO.0117-16.2017.
53. Radi, E., Formichi, P., Battisti, C., and Federico, A. (2014) Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *J. Alzheimer's Dis.*, **42**, S125-152, doi: 10.3233/JAD-132738.
54. Hetz, C., and Papa, F. R. (2018) The unfolded protein response and cell fate control, *Mol. Cell*, **69**, 169-181, doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.017.
55. Muneer, A., and Khan, R. M. S. (2019) Endoplasmic reticulum stress: implications for neuropsychiatric disorders, *Chonnam. Med. J.*, **55**, 8-19, doi: 10.4068/cmj.2019.55.1.8.
56. Mei, J. M., and Niu, C. S. (2014) Effects of CDNF on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells via modulation of Bcl-2/Bax and caspase-3 activation, *Neurol. Sci.*, **35**, 1275-1280, doi: 10.1007/s10072-014-1700-1.
57. Hellman, M., Arumae, U., Yu, L. Y., Lindholm, P., Peranen, J., et al. (2011) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) has a unique mechanism to rescue apoptotic neurons, *J. Biol. Chem.*, **286**, 2675-2680, doi: 10.1074/jbc.M110.146738.
58. Sawada, M., Sun, W., Hayes, P., Leskov, K., Boothman, D. A., and Matsuyama, S. (2003) Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria, *Nat. Cell Biol.*, **5**, 320-329, doi: 10.1038/ncb950.
59. Yoshida, T., Tomioka, I., Nagahara, T., Holyst, T., Sawada, M., et al. (2004) Bax-inhibiting peptide derived from mouse and rat Ku70, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **321**, 961-966, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.054.
60. Vishnudas, V. K., and Miller, J. B. (2009) Ku70 regulates Bax-mediated pathogenesis in laminin-alpha2-deficient human muscle cells and mouse models of congenital muscular dystrophy, *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 4467-4477, doi: 10.1093/hmg/ddp399.
61. Matlik, K., Yu, L. Y., Eesmaa, A., Hellman, M., Lindholm, P., et al. (2015) Role of two sequence motifs of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in its survival-promoting activity, *Cell Death Dis.*, **6**, e2032, doi: 10.1038/cddis.2015.371.
62. Cheng, L., Zhao, H., Zhang, W., Liu, B., Liu, Y., et al. (2013) Overexpression of conserved dopamine neurotrophic factor (CDNF) in astrocytes alleviates endoplasmic reticulum stress induced cell damage and inflammatory cytokine secretion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **435**, 34-39, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.029.
63. Zhao, H., Cheng, L., Liu, Y., Zhang, W., Maharjan, S., et al. (2014) Mechanisms of anti-inflammatory property of conserved dopamine neurotrophic factor: inhibition of JNK signaling in lipopolysaccharide-induced microglia, *J. Mol. Neurosci.*, **52**, 186-192, doi: 10.1007/s12031-013-0120-7.
64. Zhang, Y., Xiang, Y., Wang, X., Zhu, L., Li, H., et al. (2019) Cerebral dopamine neurotrophic factor protects microglia by combining with AKT and by regulating FoxO1/mTOR signaling during neuroinflammation, *Biomed. Pharmacother.*, **109**, 2278-2284, doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.028.
65. Nadella, R., Voutilainen, M. H., Saarma, M., Gonzalez-Barrios, J. A., Leon Chavez, B. A., et al. (2014) Transient transfection of human CDNF gene reduces the 6-hydroxydopamine-induced neuroinflammation in the rat substantia nigra, *J. Neuroinflammation*, **11**, 209, doi: 10.1186/s12974-014-0209-0.
66. Tang, T., Li, Y., Jiao, Q., Du, X., and Jiang, H. (2017) Cerebral dopamine neurotrophic factor: a potential therapeutic agent for Parkinson's disease, *Neurosci. Bull.*, **33**, 568-575, doi: 10.1007/s12264-017-0123-4.
67. Stepanova, P., Srinivasan, V., Lindholm, D., and Voutilainen, M. H. (2020) Cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) protects against quinolinic acid-induced toxicity in *in vitro* and *in vivo* models of Huntington's disease, *Sci. Rep.*, **10**, 19045, doi: 10.1038/s41598-020-75439-1.
68. Tsybko, A. S., Ilchibaeva, T. V., Kulikov, A. V., Kulikova, E. A., Krasnov, I. B., et al. (2015) Effect of microgravity on glial cell line-derived neurotrophic factor and cerebral dopamine neurotrophic factor gene expression in the mouse brain, *J. Neurosci. Res.*, **93**, 1399-1404, doi: 10.1002/jnr.23600.
69. Popova, N. K., Kulikov, A. V., Kondaurova, E. M., Tsybko, A. S., Kulikova, E. A., et al. (2015) Risk neurogenes for

- long-term spaceflight: dopamine and serotonin brain system, *Mol. Neurobiol.*, **51**, 1443-1451, doi: 10.1007/s12035-014-8821-7.
70. Chalazonitis, A., Li, Z., Pham, T. D., Chen, J., Rao, M., et al. (2020) Cerebral dopamine neurotrophic factor is essential for enteric neuronal development, maintenance, and regulation of gastrointestinal transit, *J. Comp. Neurol.*, **528**, 2420-2444, doi: 10.1002/cne.24901.
 71. Choi, J. M., Hong, J. H., Chae, M. J., Ngyuen, P. H., Kang, H. S., et al. (2011) Analysis of mutations and the association between polymorphisms in the cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) gene and Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.*, **493**, 97-101, doi: 10.1016/j.neulet.2011.02.013.
 72. Chen, Y. C., Baronio, D., Semenova, S., Abdurakhmanova, S., and Panula, P. (2020) Cerebral dopamine neurotrophic factor regulates multiple neuronal subtypes and behavior, *J. Neurosci.*, **40**, 6146-6164, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2636-19.2020.
 73. Man, H. Y., Wang, Q., Lu, W. Y., Ju, W., Ahmadian, G., et al. (2003) Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons, *Neuron*, **38**, 611-624, doi: 10.1016/s0896-6273(03)00228-9.
 74. Sui, L., Wang, J., and Li, B. M. (2008) Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex, *Learn Mem.*, **15**, 762-776, doi: 10.1101/lm.1067808.
 75. Kemppainen, S., Lindholm, P., Galli, E., Lahtinen, H. M., Koivisto, H., et al. (2015) Cerebral dopamine neurotrophic factor improves long-term memory in APP/PS1 transgenic mice modeling Alzheimer's disease as well as in wild-type mice, *Behav. Brain Res.*, **291**, 1-11, doi: 10.1016/j.bbr.2015.05.002.
 76. Eremin, D., Ilchibaeva, T., Khotskin, N., Naumenko, V., and Tsybko, A. (2019) Effect of cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) on the behavior and expression of the key genes of the brain serotonin system in C57Bl6/J mice, *IBRO Rep.*, **6**, S58, doi: 10.1016/j.ibror.2019.07.192.
 77. Ilchibaeva, T., Zolotenkova, E., Eremin, D., and Tsybko, A. (2020) Hippocampal overexpression of the cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) impaired fear memory formation in rats, *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2020)*, **376**, doi: 10.18699/BGRS/SB-2020-238.
 78. Tsybko, A. S., Il'chibaeva, T. V., Khotskin, N. V., Kovetskaya, A. I., Naumenko, V. S., and Popova, N. K. (2019) The effect of atypical antipsychotic drugs on the neurotrophic factors gene expression in the MPTP model of Parkinson's disease, *Neurochem. J.*, **13**, 169-175, doi: 10.1134/S1819712419020120.
 79. Popova, N. K., Ilchibaeva, T. V., and Naumenko, V. S. (2017) Neurotrophic factors (BDNF and GDNF) and the serotonergic system of the brain, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 308-317, doi: 10.1134/S0006297917030099.
 80. Tsybko, A. S., Ilchibaeva, T. V., and Popova, N. K. (2017) Role of glial cell line-derived neurotrophic factor in the pathogenesis and treatment of mood disorders, *Rev. Neurosci.*, **28**, 219-233, doi: 10.1515/revneuro-2016-0063.
 81. Joshi, H., McIntyre, W. B., Kooner, S., Rathbone, M., Gabriele, S., et al. (2020) Decreased expression of cerebral dopamine neurotrophic factor in platelets of stroke patients, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, **29**, 104502, doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.104502.
 82. Virachit, S., Mathews, K. J., Cottam, V., Werry, E., Galli, E., et al. (2019) Levels of glial cell line-derived neurotrophic factor are decreased, but fibroblast growth factor 2 and cerebral dopamine neurotrophic factor are increased in the hippocampus in Parkinson's disease, *Brain Pathol.*, **29**, 813-825, doi: 10.1111/bpa.12730.
 83. Lohoff, F. W., Bloch, P. J., Ferraro, T. N., Berrettini, W. H., Pettinati, H. M., et al. (2009) Association analysis between polymorphisms in the conserved dopamine neurotrophic factor (CDNF) gene and cocaine dependence, *Neurosci. Lett.*, **453**, 199-203, doi: 10.1016/j.neulet.2009.02.026.
 84. Yang, Y., Yu, H., Li, W., Liu, B., Zhang, H., et al. (2018) Association between cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) 2 polymorphisms and schizophrenia susceptibility and symptoms in the Han Chinese population, *Behav. Brain Funct.*, **14**, 1, doi: 10.1186/s12993-017-0133-4.
 85. Galli, E., Lindholm, P., Kontturi, L. S., Saarna, M., Urtti, A., and Yliperttula, M. (2019) Characterization of CDNF-secreting ARPE-19 cell clones for encapsulated cell therapy, *Cell Transplant.*, **28**, 413-424, doi: 10.1177/0963689719827943.
 86. Mercado, G., Valdes, P., and Hetz, C. (2013) An ERcentric view of Parkinson's disease, *Trends Mol. Med.*, **19**, 165-175, doi: 10.1016/j.molmed.2012.12.005.
 87. Hoozemans, J. J., van Haastert, E. S., Eikelenboom, P., de Vos, R. A., Rozemuller, J. M., and Scheper, W. (2007) Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 707-711, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.043.
 88. Bellucci, A., Navarra, L., Zaltieri, M., Falarti, E., Bodei, S., et al. (2011) Induction of the unfolded protein response by α -synuclein in experimental models of Parkinson's disease, *J. Neurochem.*, **116**, 588-605, doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07143.x.
 89. Heman-Ackah, S. M., Manzano, R., Hoozemans, J. J. M., Scheper, W., Flynn, R., et al. (2017) Alpha-synuclein induces the unfolded protein response in Parkinson's disease SNCA triplication iPSC-derived neurons, *Hum. Mol. Genet.*, **26**, 4441-4450, doi: 10.1093/hmg/ddx331.
 90. Mercado, G., Castillo, V., Soto, P., López, N., Axtén, J. M., et al. (2018) Targeting PERK signaling with the small molecule GSK2606414 prevents neurodegeneration in a model of Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.*, **112**, 136-148, doi: 10.1016/j.nbd.2018.01.004.
 91. Ryu, E. J., Harding, H. P., Angelastro, J. M., Vitolo, O. V., David, R., and Greene, L. A. (2002) Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease, *J. Neurosci.*, **22**, 10690-10698, doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-24-10690.2002.
 92. Holtz, W. A., and O'Malley, K. L. (2003) Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons, *J. Biol. Chem.*, **278**, 19367-19377, doi: 10.1074/jbc.M211821200.
 93. Egawa, N., Yamamoto, K., Inoue, H., Hikawa, R., Nishi, K., et al. (2011) The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6 α , protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death, *J. Biol. Chem.*, **286**, 7947-7957, doi: 10.1074/jbc.M110.156430.
 94. Sado, M., Yamasaki, Y., Iwanaga, T., Onaka, Y., Ibuki, T., et al. (2009) Protective effect against Parkinson's disease-related insults through the activation of XBP1, *Brain Res.*, **1257**, 16-24, doi: 10.1016/j.brainres.2008.11.104.
 95. Latge, C., Cabral, K. M., de Oliveira, G. A., Raymundo, D. P., Freitas, J. A., et al. (2015) The solution structure and dynamics of full-length human cerebral dopamine neurotrophic factor and its neuroprotective role against α -synuclein oligomers, *J. Biol. Chem.*, **290**, 20527-20540, doi: 10.1074/jbc.M115.662254.
 96. Albert, K., Raymundo, D. P., Panhelainen, A., Eesmaa, A., Shvachiy, L., et al. (2021) Cerebral dopamine

- neurotrophic factor reduces α -synuclein aggregation and propagation and alleviates behavioral alterations *in vivo*, *Mol. Ther.*, doi: 10.1016/j.ymthe.2021.04.035.
97. Voutilainen, M. H., Back, S., Peranen, J., Lindholm, P., Raasmaja, A., et al. (2011) Chronic infusion of CDNF prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease, *Exp. Neurol.*, **228**, 99-108, doi: 10.1016/j.expneurol.2010.12.013.
 98. Mätlik, K., Vihinen, H., Bienemann, A., Palgi, J., Voutilainen, M. H., et al. (2017) Intrastrially infused exogenous CDNF is endocytosed and retrogradely transported to substantia nigra, *eNeuro*, **4**, ENEURO.0128-16.2017, doi: 10.1523/ENEURO.0128-16.2017.
 99. Airavaara, M., Harvey, B. K., Voutilainen, M. H., Shen, H., Chou, J., et al. (2012) CDNF protects the nigrostriatal dopamine system and promotes recovery after MPTP treatment in mice, *Cell Transplant.*, **21**, 1213-1223, doi: 10.3727/096368911X600948.
 100. Back, S., Peranen, J., Galli, E., Pulkila, P., Lonka-Nevalaita, L., et al. (2013) Gene therapy with AAV2-CDNF provides functional benefits in a rat model of Parkinson's disease, *Brain Behav.*, **3**, 75-88, doi: 10.1002/brb3.117.
 101. Ren, X., Zhang, T., Gong, X., Hu, G., Ding, W., and Wang, X. (2013) AAV2-mediated striatum delivery of human CDNF prevents the deterioration of midbrain dopamine neurons in a 6-hydroxydopamine induced parkinsonian rat model, *Exp. Neurol.*, **248**, 148-156, doi: 10.1016/j.expneurol.2013.06.002.
 102. Cordero-Llana, O., Houghton, B. C., Rinald, F., Taylor, H., Yanez-Munoz, R. J., et al. (2015) Enhanced efficacy of the CDNF/MANF family by combined intranigral overexpression in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease, *Mol. Ther.*, **23**, 244-254, doi: 10.1038/mt.2014.206.
 103. Jaumotte, J. D., Saarma, M., and Zigmond, M. J. (2021) Protection of dopamine neurons by CDNF and neurturin variant N4 against MPP⁺ in dissociated cultures from rat mesencephalon, *PLoS One*, **16**, e0245663, doi: 10.1371/journal.pone.0245663.
 104. Huotari, A., Penttinen, A. M., Back, S., Voutilainen, M. H., Julku, U., et al. (2018) Combination of CDNF and deep brain stimulation decreases neurological deficits in late-stage model Parkinson's disease, *Neuroscience*, **374**, 250-263, doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.01.052.
 105. Wang, L., Wang, Z., Xu, X., Zhu, R., Bi, J., et al. (2017) Recombinant AAV8-mediated intrastriatal gene delivery of CDNF protects rats against methamphetamine neurotoxicity, *Int. J. Med. Sci.*, **14**, 340-347, doi: 10.7150/ijms.18623.
 106. Sidorova, Y. A., and Saarma, M. (2020) Can growth factors cure Parkinson's disease? *Trends Pharmacol. Sci.*, **41**, 909-922, doi: 10.1016/j.tips.2020.09.010.
 107. Anttila, J. E., Pöyhönen, S., and Airavaara, M. (2019) Secondary pathology of the thalamus after focal cortical stroke in rats is not associated with thermal or mechanical hypersensitivity and is not alleviated by intra-thalamic post-stroke delivery of recombinant CDNF or MANF, *Cell Transplant.*, **28**, 425-438, doi: 10.1177/0963689719837915.
 108. Kurt, M. A., Davies, D. C., Kidd, M., Duff, K., Rolph, S. C., et al. (2001) Neurodegenerative changes associated with beta-amyloid deposition in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes, *Exp. Neurol.*, **171**, 59-71, doi: 10.1006/exnr.2001.7717.
 109. Trinchese, F., Liu, S., Ninan, I., Puzzo, D., Jacob, J. P., and Arancio, O. (2004) Cell cultures from animal models of Alzheimer's disease as a tool for faster screening and testing of drug efficacy, *J. Mol. Neurosci.*, **24**, 15-21, doi: 10.1385/JMN:24:1:015.
 110. Liu, Y., Nie, L., Zhao, H., Zhang, W., Zhang, Y. Q., et al. (2014) Conserved dopamine neurotrophic factor-transduced mesenchymal stem cells promote axon regeneration and functional recovery of injured sciatic nerve, *PLoS One*, **9**, e110993, doi: 10.1371/journal.pone.0110993.
 111. Zhao, H., Cheng, L., Du, X., Hou, Y., Liu, Y., et al. (2016) Transplantation of cerebral dopamine neurotrophic factor transduced BMSCs in contusion spinal cord injury of rats: promotion of nerve regeneration by alleviating neuroinflammation, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 187-199, doi: 10.1007/s12035-014-9000-6.

CEREBRAL DOPAMINE NEUROTROPHIC FACTOR (CDNF): STRUCTURE, FUNCTIONS, AND THERAPEUTIC POTENTIAL

Review

D. V. Eremin, T. V. Ilchibaeva, and A. S. Tsybko*

*Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS,
630090 Novosibirsk, Russia; E mail: antoncybko@mail.ru*

The cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) together with the mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) form a unique family of neurotrophic factors (NTFs) structurally and functionally different from other proteins with neurotrophic activity. CDNF has no receptors on the cell membrane, is localized mainly in the cavity of endoplasmic reticulum (ER), and its primary function is to regulate ER stress. In addition, CDNF is able to suppress inflammation and apoptosis. Due to its functions, CDNF has demonstrated outstanding protective and restorative properties in various models of neuropathology associated with ER stress, including Parkinson's disease (PD). That is why CDNF already passed clinical trials in patients with PD. However, despite the name, CDNF functions extend far beyond the dopamine system in the brain. In particular, there are data on participation of CDNF in the maturation and maintenance of other neurotransmitter systems, regulation of the processes of neuroplasticity and non-motor behavior. In the present review, we discuss the features of CDNF structure and functions, its protective and regenerative properties.

Keywords: neurotrophic factors, cerebral dopamine neurotrophic factor CDNF, ER stress, unfolded protein response UPR, neuroprotection, Parkinson's disease

ДЕФИЦИТ РТИР В В-ЛИМФОЦИТАХ СНИЖАЕТ ЗАПАСАНИЕ ПОДКОЖНОГО ЖИРА У МЫШЕЙ

© 2021 Y. Xu¹, D. Zhu², Q. Yang², D. Su^{2*}, and Y.Q. Chen^{2,3*}

¹ School of Food Science and Technology, Jiangnan University, 214122 Wuxi, China

² Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, 214122 Wuxi, China;
e-mail: dan.su@jiangnan.edu.cn, yqchen@jiangnan.edu.cn

³ Wuxi Translational Medicine Research Center and Jiangsu Translational Medicine Research Institute Wuxi Branch, Jiangnan University, 214122 Wuxi, China

Поступила в редакцию 06.02.2021

После доработки 26.03.2021

Принята к публикации 08.04.2021

Исследования последних лет были по большей части сосредоточены на роли В-клеток в развитии метаболических заболеваний, в то время как функция В-клеток в гомеостазе жировой ткани остается по-прежнему неясной. Белок, взаимодействующий с доменом трансактивации Pax (Pax transactivation domain-interacting protein, РТИР), являясь одним из ключевых факторов гуморального иммунитета, необходим для развития и активации В-клеток. В настоящей работе мы исследовали роль В-клеток в гомеостазе жировой ткани при физиологических условиях на модели мышей с дефицитом РТИР в В-клетках (*Ptip*^{-/-} мыши). Запасание жира у мышей 8-недельного возраста оценивали с помощью микро-КТ; у *Ptip*^{-/-} мышей наблюдалось значительное снижение отложения подкожно-жировой ткани (ПЖТ). Ненаправленное общее профилирование липидов показало, что у *Ptip*^{-/-} мышей был изменен состав триглицеридов в ПЖТ. Тем не менее согласно результатам проточной цитометрии, разницы в количестве клеток-предшественников адипоцитов в ПЖТ мышей дикого типа (WT) и *Ptip*^{-/-} мышей обнаружено не было. Для изучения влияния устойчивых уровней антител IgM и IgG на отложение жира *Ptip*^{-/-} мышам внутривенно вводили сыворотку от мышей WT один раз в 3–4 дня в течение 4 недель. После 4 недель инъекций масса паховой подкожно-жировой ткани мышей-реципиентов не показала значительного увеличения по сравнению с контролем. Наши результаты демонстрируют, что РТИР, контролируя состояние В-клеток, играет важную роль в регулировании размера подкожных адипоцитов, состава триглицеридов и запаса жира в физиологических условиях. Снижение отложения подкожного жира у *Ptip*^{-/-} мышей, по-видимому, не связано с количеством клеток-предшественников адипоцитов. Значения устойчивых уровней антител IgM и IgG *in vivo* также не связаны с запасанием подкожного жира.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: РТИР, В-лимфоциты, отложение подкожного жира, гомеостаз жировой ткани.

DOI: 10.31857/S0320972521070083

ВВЕДЕНИЕ

Жировая ткань, как метаболический и эндокринный орган, участвует в регуляции гомеостаза и метаболизма организма [1]. Согласно значительному числу клинических данных, размер адипоцитов и распределение жира ассоциированы с метаболическими характеристиками у людей с ожирением [2–4]. В более ранних исследованиях было выявлено влияние макрофа-

гов жировой ткани [5], Т-лимфоцитов [6] и В-лимфоцитов [7] на метаболические нарушения, связанные с ожирением. Иммуные клетки жировой ткани также участвуют в поддержании местного гомеостаза [8]. Липогенез в адипоцитах стимулируется IgM [9], IgG и Fc-фрагментом IgG [10], что позволяет предположить наличие тесной связи между иммунной средой и гомеостазом жировой ткани.

Белок, взаимодействующий с доменом трансактивации Pax (РТИР), представляет собой ядерный белок, содержащий 6 tandemных доменов BRCT и полиглутаминовый тракт (polyQ region) [11]. РТИР необходим для активации Т-лимфоцитов [12], эмбрионального развития [13] и адипогенеза [14]. В В-клетках РТИР играет важную роль в инициации транскрипции сайта переключения в локусе тяжелой цепи иммуноглобулинов [15]. Кроме того, РТИР участвует в

Принятые сокращения: БЖТ – бурая жировая ткань; ВЖТ – висцеральная жировая ткань; ПА – предшественники адипоцитов; пПЖТ – паховая подкожно-жировая ткань; ТАГ – триацилглицерид; АСН – ацетонитрил; Н/Е – гематоксилин и эозин; IPA – изопропиловый спирт; РТИР – белок, взаимодействующий с доменом трансактивации Pax; SVF – стромально-васкулярная фракция (stromal vascular fraction).

* Адресат для корреспонденции.

достижении устойчивого уровня антител, а также в постиммунной продукции антител IgG и IgM *in vivo* путем регулирования развития, активации и выживаемости групп В-клеток, частично через путь NF-κB [16]. У мышей с дефицитом РТИР наблюдается нарушение развития клеток группы В1 и В-клеток маргинальной зоны, но при этом количество фолликулярных В-клеток соответствует норме.

В патологических состояниях, например, при заболеваниях, связанных с ожирением, В-клетки способствуют развитию воспаления. Тем не менее о функции В-клеток в гомеостазе жировой ткани при нормальных физиологических условиях известно мало. В настоящем исследовании на модели мышей, нокаутных по гену *Ptip* В-клеток, мы продемонстрировали, что РТИР играет решающую роль в поддержании гомеостаза жировой ткани при физиологических условиях путем регуляции В-клеток. Дефицит РТИР в В-клетках влияет на запасание жира, размер адипоцитов и состав триглицеридов в подкожном жире мышей. Кроме того, снижение запаса жира у мышей с дефицитом РТИР, по-видимому, не зависит от количества клеток-предшественников адипоцитов и адипогенного потенциала. Значения устойчивых уровней антител IgM и IgG *in vivo* также не влияют на запасание подкожного жира.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование на животных. Условно нокаутные мыши по *Ptip* В-клеток (*Cd19^{cre/+} Ptip^{fllox/fllox}*) были получены путем скрещивания *Cd19^{cre/cre}* мышей с *Ptip^{fllox/fllox}* мышами [15, 16]. Мыши *Cd19^{cre/+} Ptip^{+/+}* (дикий тип, WT) и *Cd19^{cre/+} Ptip^{fllox/fllox} (Ptip^{-/-})*, на которых проводили настоящее исследование, содержались в условиях, свободных от патогенов, при 12/12-часовом цикле свет/темнота. Мыши имели свободный доступ к пище и воде; вес мышей контролировали. Уровни триглицеридов (ТАГ) и общего холестерина (ОХС) в сыворотке крови измеряли с помощью набора реагентов в соответствии с протоколом производителя («Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute», Китай). Для исследования ожирения, вызванного питанием, 8-недельные самцы находились на диете с высоким содержанием жиров (60% kcal fat; «Research Diets», США) в течение 18 недель. В процессе исследования контролировали вес мышей и их паховой подкожной жировой клетчатки.

Анализ распределения жировой ткани в организме. Мышам в возрасте 8 недель проводили анализ распределения жировой ткани в организме с по-

мощью системы микро-КТ «QuantumGXII» («PerkinElmer», США) со следующими настройками: 70 кВ, 88 мкА и 36 нм FOV (поле зрения). Запасание подкожного и висцерального жира анализировали с помощью программного обеспечения «Analyze 12.0» («PerkinElmer»), поставленного вместе с прибором.

Гистология. Паховую подкожную жировую ткань (пПЖТ) выделяли и фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида при 4 °С в течение 24 ч. Срезы пПЖТ окрашивали гематоксилином и эозином (H/E) и визуализировали с помощью микроскопа («Pannoramic MIDI», Венгрия). Для каждого образца случайным образом выбирали 3–5 полей на полученных изображениях (увеличение 200×) и определяли средний размер адипоцитов в каждом поле с помощью программного обеспечения «Image J» (NIH, США).

Цитокины и антитела в паховой подкожной жировой ткани. Свежую пПЖТ взвешивали и затем гомогенизировали с использованием среды для экстракции тканей («Thermo Fisher Scientific», США), содержащей 1% ингибиторов протеаз. Затем образцы центрифугировали («Eppendorf», Германия) при 12 000 об./мин в течение 20 мин при 4 °С и отбирали супернатант. Концентрации антител и цитокинов измеряли методом ИФА с использованием экспериментального протокола, описанного в нашем предыдущем исследовании [16]. Для покрытия ИФА-планшетов использовали антимишьяные антитела IgM или IgG, в каждую лунку добавляли серийные разведения образцов пПЖТ или сыворотки, инкубацию проводили в течение 1,5 ч при 37 °С. После промывания планшетов образцы инкубировали с козьими антимишьяными антителами IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c или IgG3 («Southern Biotechnology», США), конъюгированными с пероксидазой хрена. В завершение во все лунки добавляли субстратную систему Ультра ТМВ-блоттинг (Ultra TMB-Blotting substrate system, «Thermo Fisher Scientific») и измеряли абсорбцию при 450 нм с помощью планшетного ридера «Multiskan Sky» («Thermo Fisher Scientific»). В качестве стандартов использовали образцы очищенного мышьяного иммуноглобулина («Biolegend», США). Концентрацию белка определяли с помощью набора для анализа бичинхоновой кислоты (bicinchoninic acid, BCA) производства «Beyotime Biotechnology» (Китай).

Классификация стромально-васкулярных жировых клеток и В-клеток крови методом FACS (активируемая флуоресценцией сортировка клеток). Для проведения данного эксперимента была выделена стромально-васкулярная фракция

(SVF) пПЖТ в соответствии с описанием, приведенным в предыдущих работах [17, 18]. После удаления лимфатических узлов пПЖТ взвешивали, готовили образцы одинаковой массы и измельчали их на мелкие кусочки. Образцы инкубировали с 0,1%-ным буфером, содержащим коллагеназу I типа («Sangon Biotech», Китай), при 37 °C в шейкере в течение 60–90 мин. Путем расщепления и центрифугирования из каждого образца получали SVF. Для анализа В-клеток крови отбирали образцы крови, далее проводили лизирование эритроцитов лизирующим буфером («BD Biosciences», США), процедуру выполняли два или три раза. Для окрашивания клеток использовали моноклональные антитела, такие как CD24 (клон М1/69), CD29 (клон НМβ1-1), CD31 (клон 390), CD34 (клон НМ34), CD45 (клон 30-F11), Ter-119 (клон TER-119), Sca-1 (клон D7) производства «Biolegend» (США), IgM (клон П/41), CD19 (клон 1D3) производства «eBioscience» (США) и B220 (клон RA3-6B2) производства «BD Biosciences». Клетки SVF и крови анализировали с помощью проточного цитометра BD LSRFortessa («BD Biosciences»). Для идентификации В-клеток (B220⁺, IgM⁺) в крови и клеток-предшественников адипоцитов (Lin⁻: CD29⁺: CD34⁺: Sca-1⁺: CD24⁺) в пПЖТ использовали программное обеспечение FlowJo v10 («BD Biosciences»).

Культура клеток стромально-васкулярной фракции и их дифференцировка. Свежеизолированную SVF культивировали в среде DMEM («Gibco», США) с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки (FBS, «Gibco») и пеницилина/стрептомицина (P/S, «Thermo Fisher Scientific»). Для определения пролиферативной способности SVF-клеток использовали набор «MTT assay kit» («Beyotime Biotechnology»). В клетках третьего поколения индуцировали дифференцировку с применением 0,5 мМ IBMX (3-изобутил-1-метилксантин), 1 мкМ дексаметазона, 0,5 мкМ росиглитазона («MCE», США) и 10 мкг/мл инсулина («Sangon Biotech», Китай). Через 12 дней клетки фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида и окрашивали жирорастворимым красным красителем «Oil Red O» (0,5%-ный раствор в изопропанол). На последнем этапе клетки окрашивали гематоксилином. Концентрацию ТАГ в адипоцитах измеряли с помощью набора реагентов в соответствии с протоколом производителя («Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute»).

Липидомика. Ненаправленное общее профилирование липидов в ткани пПЖТ было проведено в соответствии с нашим предыдущим исследованием [19] с незначительными изменениями.

Для предварительной подготовки образца 10 мг пПЖТ гомогенизировали в 40 мкл воды и 375 мкл метанола (MeOH) («Tedia», США) с использованием гомогенизатора «Tissue Cell-destroyer DS1000» («NewZongke, Viral Disease Control Bio-Tech LTD», Китай). Гомогенаты ткани переносили в новые центрифужные пробирки Eppendorf. Затем в пробирку последовательно добавляли 1250 мкл метил-трет-бутилового эфира («Tedia») и 300 мкл воды, образец тщательно перемешивали на вортексе. Смесь инкубировали в течение 10 мин, а затем центрифугировали на 15 000 g («Eppendorf»). Далее 400 мкл супернатанта лиофилизировали («Labconco Corporation», США) и заново растворяли в 50 мкл смеси CHCl₃ : MeOH (2 : 1) и 200 мкл 5 мМ ацетата аммония (AcONH₄, «Sigma-Aldrich», США) в водном растворе изопропилового спирта и ацетонитрила (IPA : ACN : H₂O в отношении 9 : 4 : 2 соответственно; «Merck», Германия). Образец для контроля качества получали путем смешивания 200 мкл супернатанта из каждого образца.

Профилирование липидов проводили с помощью хроматографической системы Thermo Vanquish, объединенной с масс-спектрометром Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap («Thermo Fisher Scientific»), используя подвижную фазу, состоящую из растворителя А (10 мМ AcONH₄ в ACN : H₂O, 60 : 40 v/v) и растворителя В (10 мМ AcONH₄ в IPA : ACN, 90 : 10 v/v). В эксперименте использовали колонку ВЕН С18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм; «Waters», США), которую выдерживали при 40 °C.

«Сырые» (необработанные) данные из объединенной системы жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (Thermo ЖХ/МС) были преобразованы в файлы формата .ABF и импортированы в MS-DIAL для выравнивания пиков. Идентификация липидов пПЖТ проводилась в основном с использованием встроенной базы данных MS-DIAL; тандемные масс-спектры, время удержания и точное отношение массы к заряду проверялись вручную.

ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК из В-клеток селезенки и пПЖТ взрослых мышей экстрагировали в соответствии с протоколом производителя («CWBio», Китай). Для разделения В-клеток и спленоцитов использовали микроносители α-CD43 («Miltenyi Biotec», Германия). Обратная транскрипция проводилась в соответствии с инструкциями производителя («CWBio»). Количественную ПЦР (SYBR Green PCR Master Mix, «Yasen Biotechnology», Китай) проводили с использованием системы ПЦР в реальном времени («Roche», Швейцария); для нормализации данных экспрессии генов ис-

пользовали экспрессию *Hprt* [15, 16]. Для дальнейшего анализа было использовано пороговое число циклов (cycle threshold, Ct) каждого образца. Используемые праймеры указаны в таблице.

Введение сыворотки. Сыворотку собирали у WT-мышей в возрасте 6–8 недель. Учитывая период полураспада антител (20–23 дня для IgG, 2 дня для IgM и 17–22 ч для IgA) [20], сыворотку вводили внутривенно *Ptip*^{-/-} мышам один раз каждые 3–4 дня в течение 4 недель. Для обеспечения адекватной концентрации антител в сыворотке забор крови у каждой WT-мыши проводили не более двух раз, а частота сбора крови составляла один раз в две недели. Перед инъекцией свежую сыворотку помещали на лед и подвергали воздействию ультрафиолетового света в течение 15 мин.

Статистический анализ. Для статистического анализа использовали программу GraphPad Prism 7, данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Для определения значимости различий между группами применяли двусторонний непарный *t*-критерий с использованием поправки Уэлча.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дефицит РТИР в В-клетках влияет на запасы жира у мышей при нормальных физиологических условиях. В проведенных ранее исследованиях по изучению роли В-клеток при нарушениях метаболизма, связанных с ожирением, мышам давали корм с высоким содержанием жиров. Однако такая диета считается внешним стимулом [21], в то время как ожирение является хроническим воспалительным состоянием низкой степени тяжести [22]. Для изучения роли В-клеток в гомеостазе жировой ткани при нормальных физиологических условиях мы использовали модель мышей с гомозиготной делецией гена *Ptip* в В-клетках, при этом мышам давали стандартный корм. Согласно мониторингу массы тела самцов мышей, результаты не отличались между группами WT (дикий тип) и *Ptip*^{-/-} (рис. 1, а). Тем не менее по результатам микро-КТ, отложение подкожной жировой ткани (ПЖТ) у мышей *Ptip*^{-/-} заметно уменьшилось на ~ 36% по сравнению с контролем, в то время как в отложениях висцеральной жировой ткани (ВЖТ) различия не наблюдалось (рис. 1, б и в). Иссеченная паховая подкожная жировая ткань (пПЖТ, наиболее репрезентативная форма ПЖТ) была на ~ 26% меньше у *Ptip*^{-/-} мышей (рис. 1, в и г). Масса эпидиди-

Последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени

Ген	Последовательность 5'–3'
<i>Ptip</i>	GCAGCAGCAGCAGCTTTTGTG TGCTCGGGATAGTCCGCAAT
<i>Hprt</i>	TGCCGAGGATTTGGAAAAAGTG CACAGAGGGCCACAATGTGATG

мальной жировой ткани (ЭЖТ, наиболее репрезентативная форма ВЖТ) была меньше у *Ptip*^{-/-} мышей, хотя эта разница не достигала статистической значимости. Те же результаты были получены и у самок мышей 8-недельного возраста (рис. S1a в Приложении). Таким образом, роль РТИР в регулировании запаса жира не зависела от пола. Более того, отложения пПЖТ все еще были заметно меньше у 19-месячных *Ptip*^{-/-} мышей, чем у WT-мышей (рис. S1b в Приложении). Примечательно, что подобной характеристики не наблюдалось у мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров, т.е. различия в запасах пПЖТ по сравнению с контролем обнаружено не было (рис. 1, е). Кроме того, окрашивание Н/Е пПЖТ (рис. 1, ж) показало, что у *Ptip*^{-/-} мышей было значительно меньше адипоцитов по сравнению с WT-мышью. Данные результаты показывают, что при нормальных физиологических условиях РТИР участвует в регуляции запаса ПЖТ и размеров адипоцитов, контролируя функционирование В-клеток.

Дефицит РТИР в В-клетках изменяет триглицеридный состав подкожной жировой ткани. Основываясь на вышеизложенных наблюдениях, мы измерили показатели липидов крови и не обнаружили различий между двумя генотипами в уровне ТАГ или ОХС в сыворотке крови (рис. 2, а и б). Жировая ткань является основным органом запаса ТАГ [23], поэтому мы проанализировали состав ТАГ в пПЖТ методом ненаправленного общего профилирования липидов. Результаты демонстрируют очевидные изменения в составе различных ТАГ с определенной длиной углеродной цепи у мышей *Ptip*^{-/-} по сравнению с мышью дикого типа (рис. 2, в), хотя общее количество ТАГ было неизменным (рис. 2, г). Следует отметить, что уровни отдельных ТАГ, связанных с адипогенным потенциалом и прогрессированием заболеваний [24], включая ТАГ56:3, ТАГ56:4, ТАГ56:7 и ТАГ57:4, у мышей *Ptip*^{-/-} были заметно ниже (рис. 2, д). Количество разновидностей основных свобод-

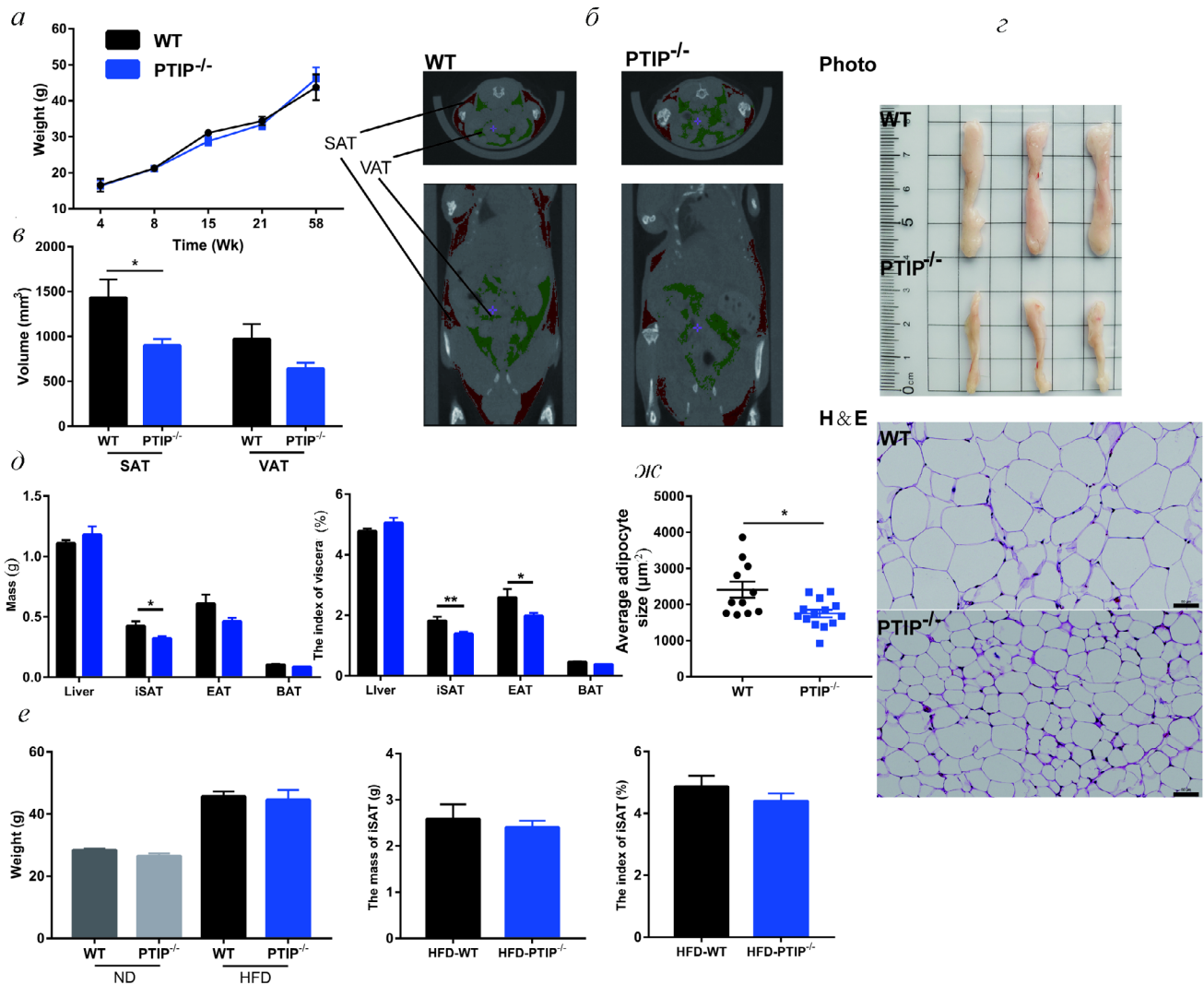


Рис. 1. Дефицит РТИР в В-клетках снижает запасы подкожного жира у мышей. *a* – Изменение массы самцов мышей ($n = 9–12$); *б, в* – распределение жира в организме самцов мышей 8-недельного возраста, данные получены с помощью микро-КТ ($n = 9–12$, красная область – ПЖТ (SAT), зеленая область – ВЖТ (VAT)); *г, д* – репрезентативные изображения пПЖТ (iSAT), массы висцеральной ткани и висцерального индекса (отношение массы висцеральной ткани к массе тела) у самцов мышей 8-недельного возраста ($n = 9–12$, EAT – эпидидимальная жировая ткань, BAT – бурая жировая ткань); *е* – масса тела, масса пПЖТ и индекс пПЖТ у мышей, находившихся на диете с высоким содержанием жиров на протяжении 18 недель (HFD, high-fat diet; $n = 6$); *ж* – изображения ткани пПЖТ с окрашиванием Н/Е (масштаб – 50 мкм) самцов мышей 8-недельного возраста и средний размер пахового подкожного адипоцита ($n = 11–14$). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

ных жирных кислот (FFA, free fatty acid) в пПЖТ не различалось между двумя генотипами (рис. 2, *е*). Чтобы исключить возможность того, что наблюдаемые изменения в гомеостазе жировой ткани у мышей *Ptip*^{-/-} были вызваны измененной экспрессией РТИР в ПЖТ, мы измерили экспрессию *Ptip* на уровне мРНК в пПЖТ и не обнаружили разницы между WT и мышами *Ptip*^{-/-} (рис. S2a в Приложении). В совокупности эти результаты показывают, что дефицит РТИР в В-клетках не изменяет общее содержа-

ние ТАГ, депонированных в пПЖТ, но значительно влияет на состав ТАГ.

Профиль антител и клетки-предшественники адипоцитов в паховой подкожной жировой ткани. В предыдущем исследовании [16] мы продемонстрировали, что РТИР необходим для развития групп В-лимфоцитов, он усиливает постиммунные и устойчивые уровни сывороточных антител IgM и IgG *in vivo*. В дальнейшем мы исследовали уровни антител в пПЖТ у неиммунизированных мышей. Так же, как и в случае снижения уровня

антител в сыворотке крови [16], у мышей с дефицитом РТИР наблюдалось снижение уровня IgM в 2,98 раза, а также значительное снижение уровней IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3 и IgA в пПЖТ (рис. 3, а). Эти данные демонстрируют, что устойчивые уровни антител в пПЖТ у мышей *Ptip*^{-/-} оказались отличными от WT-мышей. Однако уровни нескольких важных цитокинов у мышей *Ptip*^{-/-} оставались неизменными (рис. 3, б). Анализ В-клеток в пПЖТ и в крови продемонстрировал, что *Ptip*^{-/-} мыши имеют аналогичную частоту и количество В-клеток по сравнению с WT-мышью (рис. S2b в Приложе-

нии; данные для В-клеток в пПЖТ не показаны). Клетки-предшественники адипоцитов (ПА) в стромально-васкулярной фракции (SVF) жировой ткани отвечают за адипогенез, а возможность наращивания жировых депо определяется числом и активностью ПА-клеток [25]. Чтобы определить, регулирует ли РТИР отложение жира путем изменения количества ПА-клеток в пПЖТ, мы проанализировали ПА-клетки с помощью FACS и обнаружили, что их количество, как правило, увеличивалось у мышей *Ptip*^{-/-} по сравнению с мышью WT, но эта разница не достигала статистической значимости (рис. 3, в и г).

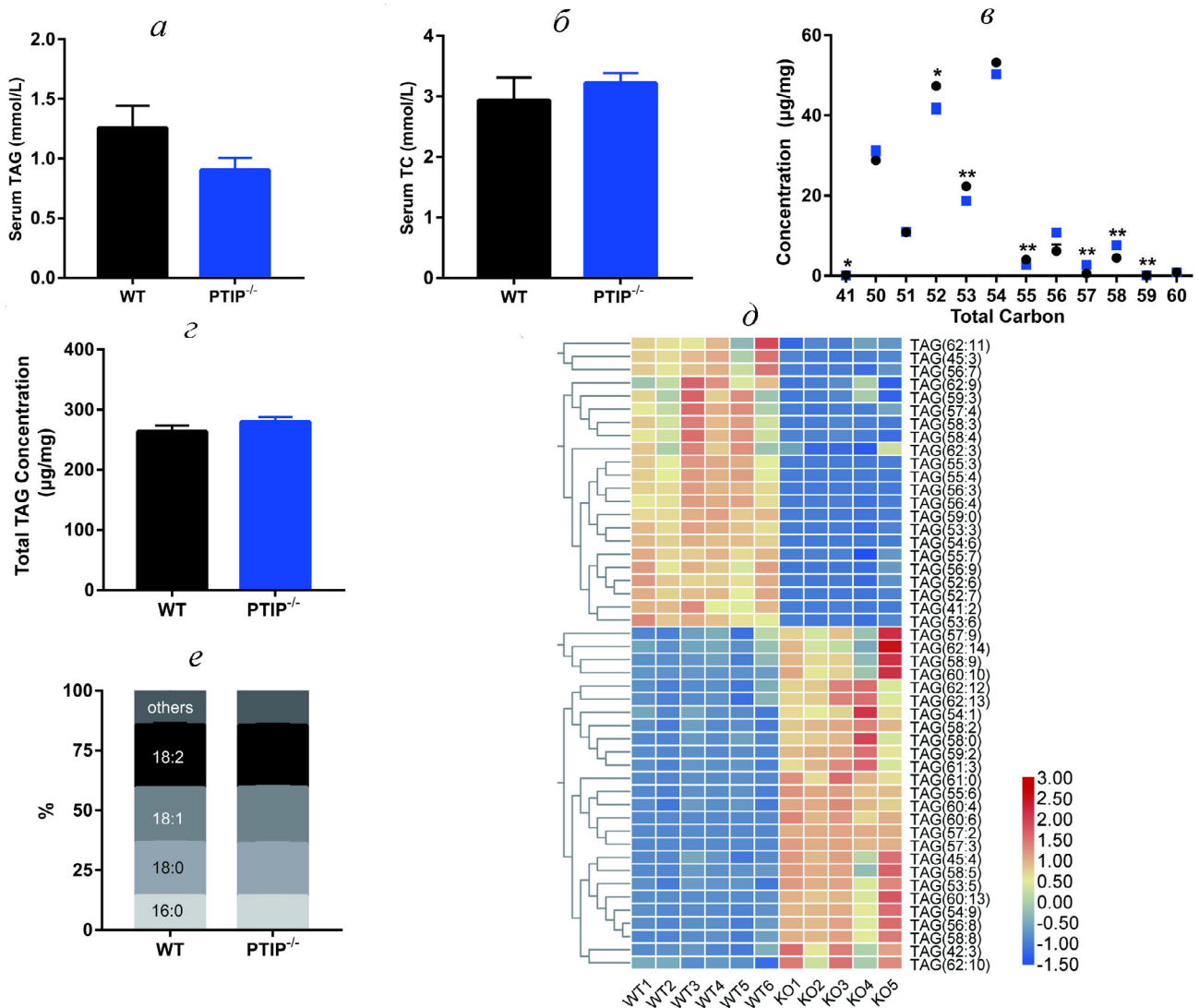


Рис. 2. Дефицит РТИР в В-клетках приводит к изменению состава ТАГ в ПЖТ. Уровни сывороточных ТАГ (ТАГ, а) и ОХС (ТС, б) у 8-недельных мышей ($n = 5-7$); в – изменение количества общего углерода (total carbon) анализировали на основе общей концентрации ТАГ ($n = 5-6$); г – общая концентрация ТАГ в пПЖТ ($n = 5-6$); д – тепловая карта по сравнению типов ТАГ между двумя группами, демонстрирующая ТАГ с кратным изменением > 2 и $< 0,5$. Красным отмечены типы ТАГ, уровень которых значительно увеличен у мышей *Ptip*^{-/-} по сравнению с контролем; синим – уменьшен по сравнению с контролем ($n = 5-6$; КО (knockout) обозначает *Ptip*^{-/-}); е – состав свободных жирных кислот пПЖТ ($n = 5-6$). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Выделенные SVF-клетки мышей WT и *Ptip*^{-/-} показали сходную способность к пролиферации и дифференцировке в адипоциты (рис. S2, с и d в Приложении). Эти результаты показывают, что снижение запаса подкожного жира у мышей *Ptip*^{-/-} вызвано не изменением числа ПА-клеток или адипогенного потенциала ПЖТ.

Устойчивые уровни антител IgM и IgG *in vivo* не связаны с регуляцией запаса подкожного жира. Одна из основных функций В-клеток состоит в регуляции гуморального иммунного ответа путем выработки антител; для обеспечения быстрого ответа на распространенные патогены в стабильном состоянии организм имеет широкий спектр естественных антител [26]. Дефицит РТИР в В-клетках вызывает значительное снижение уровня антител в пПЖТ (рис. 3, а) и в сыворотке крови [16]. Снижение устойчивого уровня антител в сыворотке крови у мышей *Ptip*^{-/-} связано с дефицитом естественных антител [16]. Устойчивые уровни антител у мышей *Ptip*^{-/-} *in vivo* значительно отличались от таковых у мышей WT; поэтому мы исследовали наличие зависимости между снижением уровня устойчивых антител у мышей *Ptip*^{-/-} с уменьшением отложений в пПЖТ. Для повышения уровня устойчивых антител, включая естественные антитела, *Ptip*^{-/-}

мышам в течение 4 недель внутрибрюшинно вводили сыворотку, полученную от WT-мышей. Инъекция сыворотки не оказала влияния на массу тела (рис. 4, а). Через две недели после инъекции у мышей-реципиентов наблюдалось значительное повышение уровней IgG1, IgG3 и IgM в сыворотке крови (рис. 4, б и в). Через 4 недели после инъекции уровни IgG2b и IgG2c в сыворотке крови также были заметно повышены (рис. 4, б и в). Затем мы проанализировали уровень антител в пПЖТ: у мышей-реципиентов наблюдалось значительное повышение уровня антител IgG. Полученные результаты показывают, что сывороточные антитела IgG, перенесенные от WT-мышей, были успешно доставлены в пПЖТ мышей-реципиентов (рис. 4, з). В предыдущих исследованиях мы продемонстрировали, что у мышей *Ptip*^{-/-} были нарушены реакции антител на тимус-зависимые (ТД) и тимус-независимые (ТИ) антигены [16]. В данном исследовании повышенные уровни антител в сыворотке и ПЖТ мышей-реципиентов были получены путем их добавления из сыворотки мышей дикого типа. Таким образом, устойчивые уровни антител у мышей-реципиентов были успешно изменены. Тем не менее каких-либо существенных изменений в массе пПЖТ или индексе пПЖТ

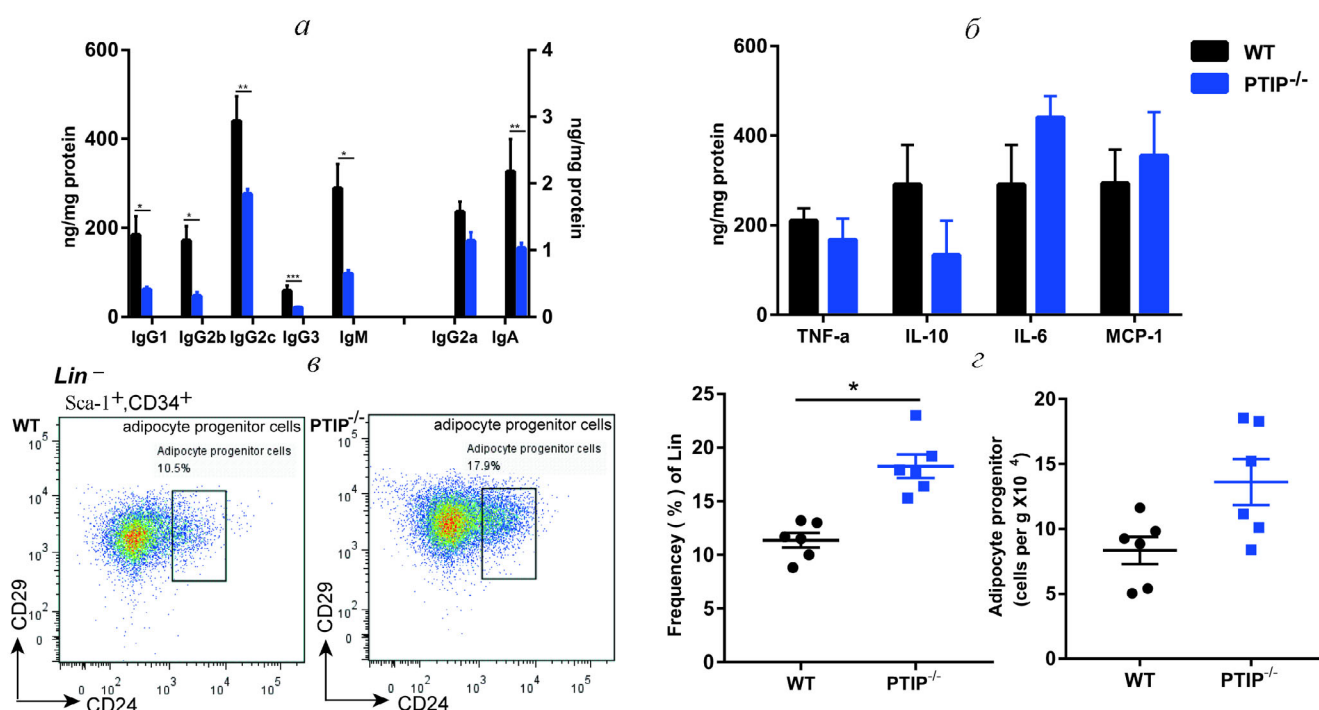


Рис. 3. Профиль антител и клетки-предшественники адипоцитов в пПЖТ. а – Уровни антител в пПЖТ у мышей 8-недельного возраста ($n = 6-14$; правая ось Y – для IgG2a и IgA; WT – черные столбцы, *Ptip*^{-/-} – синие столбцы); б – концентрация цитокинов в пПЖТ у мышей 8-недельного возраста ($n = 3-6$); в – данные проточной цитометрии; г – частота и количество клеток-предшественников адипоцитов из пПЖТ (Lin^-) у мышей 6–8-недельного возраста ($n = 6$). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$), * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$

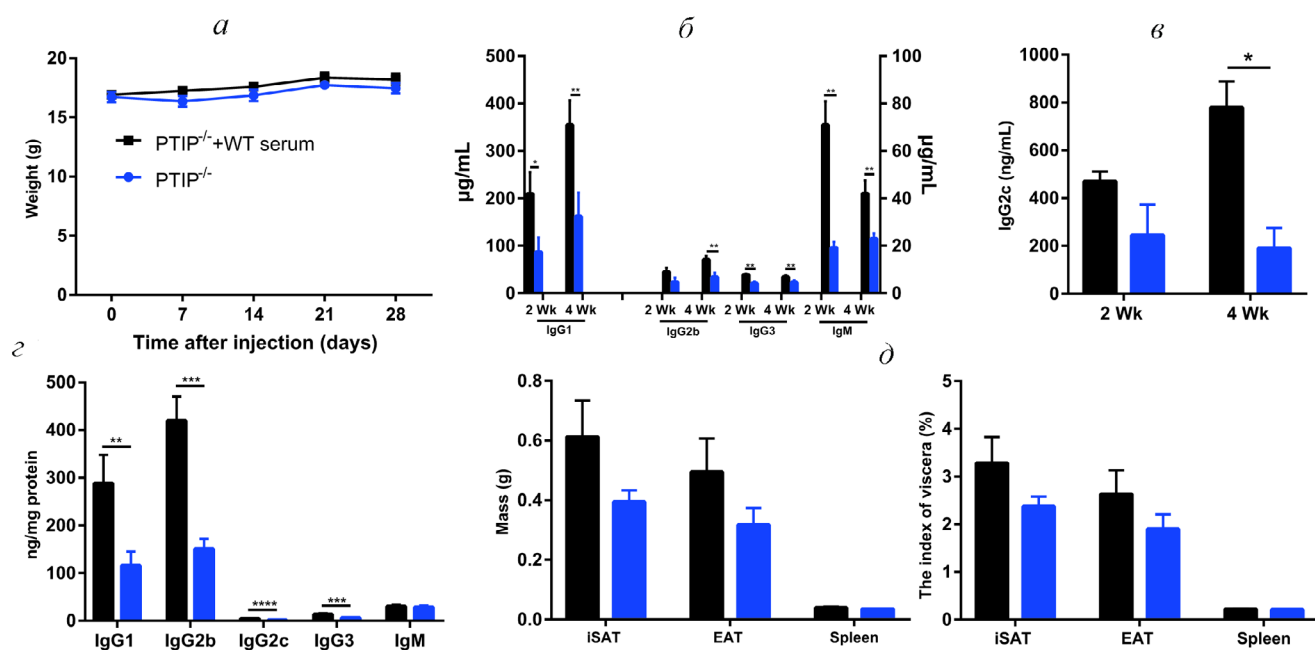


Рис. 4. Устойчивые уровни антител IgM и IgG *in vivo* не связаны с регуляцией запасаения подкожного жира. *a* – Изменение массы тела мышей в течение 4 недель инъекций; *b*, *в* – уровни антител IgG и IgM в сыворотке крови после 2 и 4 недель инъекций (левая ось Y – для данных по IgG1); *г* – уровни антител IgG и IgM в пПЖТ после 4 недель инъекций; *д* – висцеральная масса и висцеральные индексы мышей после 4 недель инъекций (iSAT – пПЖТ, EAT – эпидидимальная жировая ткань, spleen – селезенка). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$) ($n = 5-12$; WT – черные столбцы, *Ptip*^{-/-} – синие столбцы; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

по сравнению с контрольной группой у мышей-реципиентов заметно не было (рис. 4, *д*). В совокупности эти результаты указывают на то, что значения устойчивых уровней антител IgM и IgG *in vivo* не связаны с регуляцией запасаения подкожного жира.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Распределение жира и дисфункция жировой ткани считаются решающими факторами при прогнозировании развития метаболических нарушений, связанных с ожирением [27, 28]. Важность поддержания жировой массы в пределах нормы также подтверждается исследованиями о взаимосвязи избытка или дефицита жира с метаболическими нарушениями [29]. Согласно некоторым исследованиям [30], у мышей, страдающих ожирением, В1-клетки и антитела IgM в ВЖТ способствуют развитию воспалительного процесса в жировой ткани и непереносимости глюкозы. В настоящем исследовании мы впервые демонстрируем, что В-клетки регулируют гомеостаз жировой ткани и в физиологических условиях. Дефицит РТИР в В-клетках нарушает гомеостаз жировой ткани, что приводит к значительному снижению запасаения подкожного жира и размера адипоцитов.

Увеличение жировых депо из-за избыточного потребления энергии может происходить либо за счет повышения количества липидов в зрелых адипоцитах (гипертрофия), либо за счет увеличения количества зрелых адипоцитов путем стимуляции дифференцировки клеток ПА (гиперплазия) [31, 32]. Считается, что увеличение ПЖТ опосредовано гипертрофией адипоцитов, т.е. именно морфология ПЖТ является наиболее уязвимой [33]. В нашем исследовании запасаение пПЖТ и размер адипоцитов у мышей *Ptip*^{-/-}, получавших нормальную диету, были значительно снижены по сравнению с контролем. Тем не менее не было обнаружено никаких различий в запасаении пПЖТ у мышей *Ptip*^{-/-}, получавших диету с высоким содержанием жиров, по сравнению с WT-мышью. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что регуляторное влияние РТИР на запасаение подкожного жира различается у животных в нормальном физиологическом состоянии и при патологии.

Наиболее распространенным типом липидов в жировых депо здорового организма являются ТАГ, их состав влияет на уровень FFA в сыворотке крови, регулируя их высвобождение из жировой ткани [34]. В настоящем исследовании общий уровень ТАГ в пПЖТ мышей *Ptip*^{-/-} не претерпел изменений, в то время как уровни конкретных типов ТАГ с разной длиной углерод-

ной цепи заметно отличались. В пПЖТ мышей *Ptip*^{-/-} были значительно снижены такие ТАГ, как C56:7 (C20:4, C18:1, C18:2), C56:4 (C18:1, C18:2, C20:1) и C56:3 (C18:1, C18:1, C20:1), которые, как известно, ассоциированы с диабетом 2-го типа [24, 35]. Данный результат свидетельствует о том, что В-клетки участвуют в регуляции состава ТАГ в ПЖТ, и риск развития метаболических заболеваний у *Ptip*^{-/-} мышей может быть ниже по сравнению с WT-мышами. Уровни ТАГ, ассоциированных с адипогенным потенциалом ПЖТ (C56:4 и C57:4, содержащие C18:2 и C16:0), были ниже в пПЖТ мышей *Ptip*^{-/-} [24]. В проведенном ранее исследовании также было показано, что отсутствие РТИР в бурой жировой ткани заметно снижает массу жировой ткани и что РТИР влияет на адипогенез в бурой жировой ткани, регулируя экспрессию *PPARγ* и *C/EBPα* [14]. В настоящем исследовании различий в экспрессии РТИР в ПЖТ у мышей WT и *Ptip*^{-/-} обнаружено не было. Учитывая тот факт, что клетки SVF пПЖТ мышей WT и *Ptip*^{-/-} демонстрировали сходный адипогенный потенциал и способность к пролиферации (рис. S1c в Приложении), мы предположили, что снижение запаса подкожного жира может быть не связано с адипогенным потенциалом. Кроме того, было обнаружено, что количество ПА-клеток у мышей *Ptip*^{-/-} было нормальным, что исключает возможность того, что снижение запаса подкожного жира у *Ptip*^{-/-} мышей вызвано недостаточным количеством ПА-клеток в пПЖТ.

Антитела гуморального иммунитета позвоночных подразделяются на постиммунные и естественные. Постиммунные антитела вырабатываются В2-клетками (FO/фолликулярными В-клетками), в то время как естественные антитела в основном вырабатываются подобными врожденным В1-клетками. В настоящем исследовании продемонстрировано, что уровень запаса ПЖТ оставался неизменным, несмотря на значительное повышение уровней устойчивых антител IgG и IgM в сыворотке крови у мышей *Ptip*^{-/-} после инъекции сыворотки от WT-мышей. Это означает, что при нормальных физиологических условиях устойчивые уровни антител IgG и IgM не влияют на запаса ПЖТ. Мыши с дефицитом РТИР имели нормальное количество В2-клеток, однако важно отметить, что эти клетки не подвергаются BCR- и CD40-индуцированной стимуляции пролиферации [16]. Поэтому, предположительно, влияние РТИР на запаса подкожного жира связано в основном с изменением некоторых функций В-клеток, таких как презентация эндогенных липидных антигенов в жировой ткани [8] или регуляцией всасывания липидов в кишеч-

нике путем изменения иммунной среды кишечника [36]. Для проверки этих гипотез требуются дополнительные исследования.

Таким образом, впервые было продемонстрировано на мышах, получавших стандартный корм, что при нормальных физиологических условиях делеция *Ptip* в В-клетках приводит к изменению отложения жира, состава триглицеридов и размеров подкожных адипоцитов. Мы обнаружили неожиданное влияние РТИР на регуляцию гомеостаза жировой ткани через В-клетки. Полученные нами результаты дают ценную информацию для дальнейшего изучения метаболизма при различных физиологических условиях. Дефицит РТИР в В-клетках приводит к нарушению выработки устойчивых и постиммунных IgM и IgG антител у мышей. Подобный первичный дефицит антител является отличительной чертой общей варибельной иммунной недостаточности (ОВИН) у человека. Пациенты с ОВИН или приобретенным иммунодефицитом (таким как следствие ВИЧ-инфекции) также имеют симптомы идиопатической мальабсорбции и низкой прибавки в весе [36]. Таким образом, наши исследования вносят вклад в понимание причин аномального запаса жира, наблюдаемого у пациентов с иммунодефицитными расстройствами.

Финансирование. Исследование было поддержано Национальным фондом естественных наук Китая (грант № 31872794), Фондом естественных наук провинции Цзянсу (№ BK20181346), Национальной программой ключевых исследований и разработок Китая (2017YFD0400200) и Национальным фондом естественных наук Китая (грант № 31771539).

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

Соблюдение этических норм. Все эксперименты, проведенные на животных в этом исследовании, были одобрены Комитетом по этике при работе с лабораторными животными Университета Цзяннань (разрешение JN № 20200710c0440930 [167]). Соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные руководящие принципы по уходу за лабораторными животными и работе с ними.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 7, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murawska-Ciałowicz, E. (2017) Adipose tissue – morphological and biochemical characteristic of different depots, *Postepy Higieny Med. Doswiad. (Online)*, **71**, 466-484, doi: 10.5604/01.3001.0010.3829.
2. Mundi, M. S., Karpyak, M. V., Koutsari, C., Votruba, S. B., O'Brien, P. C., and Jensen, M. D. (2010) Body fat distribution, adipocyte size, and metabolic characteristics of nondiabetic adults, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **95**, 67-73, doi: 10.1210/jc.2009-1353.
3. Abate, N., Garg, A., Peshock, R. M., Stray-Gundersen, J., Adams-Huet, B., and Grundy, S. M. (1996) Relationship of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men with NIDDM, *Diabetes*, **45**, 1684-1693, doi: 10.2337/diab.45.12.1684.
4. Weyer, C., Wolford, J. K., Hanson, R. L., Foley, J. E., Tataranni, P. A., et al. (2001) Subcutaneous abdominal adipocyte size, a predictor of type 2 diabetes, is linked to chromosomal 1q21–q23 and is associated with a common polymorphism in LMNA in Pima Indians, *Mol. Genet. Metab.*, **72**, 231-238, doi: 10.1006/mgme.2001.3147.
5. Dalmas, E. (2019) Role of innate immune cells in metabolism: from physiology to type 2 diabetes, *Semin. Immunopathol.*, **41**, 531-545, doi: 10.1007/s00281-019-00736-5.
6. Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., et al. (2008) T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 1304-1310, doi: 10.1161/atvbaha.108.165100.
7. Winer, D. A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P. P., Yantha, J., et al. (2011) B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies, *Nat. Med.*, **17**, 610-617, doi: 10.1038/nm.2353.
8. Kane, H., and Lynch, L. (2019) Innate immune control of adipose tissue homeostasis, *Trends Immunol.*, **40**, 857-872, doi: 10.1016/j.it.2019.07.006.
9. Khokher, M. A., Woods, R. J., and Dandona, P. (1984) Human immunoglobulin M stimulates adipocyte lipogenesis, *Metab. Clin. Exp.*, **33**, 208-211, doi: 10.1016/0026-0495(84)90037-4.
10. Khokher, M. A., Janah, S., and Dandona, P. (1983) Human immunoglobulin G stimulates human adipocyte lipogenesis, *Diabetologia*, **25**, 264-268, doi: 10.1007/bf00279941.
11. Cho, E. A., Prindle, M. J., and Dressler, G. R. (2003) BRCT domain-containing protein PTIP is essential for progression through mitosis, *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 1666-1673, doi: 10.1128/mcb.23.5.1666-1673.2003.
12. Callen, E., Faryabi, R. B., Luckey, M., Hao, B., Daniel, J. A., et al. (2012) The DNA damage- and transcription-associated protein paxip1 controls thymocyte development and emigration, *Immunity*, **37**, 971-985, doi: 10.1016/j.immuni.2012.10.007.
13. Kim, D., Patel, S. R., Xiao, H., and Dressler, G. R. (2009) The role of PTIP in maintaining embryonic stem cell pluripotency, *Stem Cells*, **27**, 1516-1523, doi: 10.1002/stem.79.
14. Cho, Y. W., Hong, S., Jin, Q., Wang, L., Lee, J. E., et al. (2009) Histone methylation regulator PTIP is required for PPARgamma and C/EBPalpha expression and adipogenesis, *Cell Metab.*, **10**, 27-39, doi: 10.1016/j.cmet.2009.05.010.
15. Daniel, J. A., Santos, M. A., Wang, Z., Zang, C., Schwab, K. R., et al. (2010) PTIP promotes chromatin changes critical for immunoglobulin class switch recombination, *Science*, **329**, 917-923, doi: 10.1126/science.1187942.
16. Su, D., Vanhee, S., Soria, R., Gyllenbäck, E. J., Starnes, L. M., et al. (2017) PTIP chromatin regulator controls development and activation of B cell subsets to license humoral immunity in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E9328-E9337, doi: 10.1073/pnas.1707938114.
17. Rodeheffer, M. S., Birsoy, K., and Friedman, J. M. (2008) Identification of white adipocyte progenitor cells *in vivo*, *Cell*, **135**, 240-249, doi: 10.1016/j.cell.2008.09.036.
18. Cho, K. W., Morris, D. L., and Lumeng, C. N. (2014) Flow cytometry analyses of adipose tissue macrophages, *Methods Enzymol.*, **537**, 297-314, doi: 10.1016/b978-0-12-411619-1.00016-1.
19. Yang, Q., Sun, J., and Chen, Y. Q. (2016) Multi-dimensional, comprehensive sample extraction combined with LC-MS analysis for complex biological samples: application in the metabolomics study of acute pancreatitis, *RSC Adv.*, **6**, 25837-25849, doi: 10.1039/c5ra26708k.
20. Vieira, P., and Rajewsky, K. (1988) The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice, *Eur. J. Immunol.*, **18**, 313-316, doi: 10.1002/eji.1830180221.
21. Li, D., Zhang, L., Xu, L., Liu, L., He, Y., et al. (2017) WIP1 phosphatase is a critical regulator of adipogenesis through dephosphorylating PPARγ serine 112, *Cell. Mol. Life Sci.*, **74**, 2067-2079, doi: 10.1007/s00018-016-2450-4.
22. Saltiel, A. R., and Olefsky, J. M. (2017) Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease, *J. Clin. Invest.*, **127**, 1-4, doi: 10.1172/jci92035.
23. Kotronen, A., Seppänen-Laakso, T., Westerbacka, J., Kiviluoto, T., Arola, J., et al. (2010) Comparison of lipid and fatty acid composition of the liver, subcutaneous and intra-abdominal adipose tissue, and serum, *Obesity*, **18**, 937-944, doi: 10.1038/oby.2009.326.
24. Al-Sulaiti, H., Diboun, I., Banu, S., Al-Emadi, M., Amani, P., et al. (2018) Triglyceride profiling in adipose tissues from obese insulin sensitive, insulin resistant and type 2 diabetes mellitus individuals, **16**, 175, doi: 10.1186/s12967-018-1548-x.
25. Joe, A. W., Yi, L., Even, Y., Vogl, A. W., and Rossi, F. M. (2009) Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet, *Stem Cells*, **27**, 2563-2570, doi: 10.1002/stem.190.
26. Hardy, R. R., Wei, C. J., and Hayakawa, K. (2004) Selection during development of VH11⁺ B cells: a model for natural autoantibody-producing CD5⁺ B cells, *Immunol. Rev.*, **197**, 60-74, doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.0100.x.
27. Goossens, G. H. (2017) The metabolic phenotype in obesity: fat mass, body fat distribution, and adipose tissue function, *Obesity Facts*, **10**, 207-215, doi: 10.1159/000471488.
28. Bracht, J. R., Vieira-Potter, V. J., and De Souza Santos, R. (2020) The role of estrogens in the adipose tissue milieu, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1461**, 127-143, doi: 10.1111/nyas.14281.
29. Zhang, R., Gao, Y., Zhao, X., Gao, M., Wu, Y., et al. (2018) FSP1-positive fibroblasts are adipogenic niche and regulate adipose homeostasis, *PLoS Biol.*, **16**, e2001493, doi: 10.1371/journal.pbio.2001493.
30. Harmon, D. B., Srikakulapu, P., Kaplan, J. L., Oldham, S. N., McSkimming, C., et al. (2016) Protective role for B-1b B cells and IgM in obesity-associated inflammation, glucose intolerance, and insulin resistance, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **36**, 682-691, doi: 10.1161/atvbaha.116.307166.
31. Jeffery, E., Church, C. D., Holtrup, B., Colman, L., and Rodeheffer, M. S. (2015) Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 376-385, doi: 10.1038/ncb3122.
32. Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K., and Scherer, P. E. (2013) Tracking adipogenesis during white adipose tissue

- development, expansion and regeneration, *Nat. Med.*, **19**, 1338-1344, doi: 10.1038/nm.3324.
33. Hou, Y., Liu, Z., Zuo, Z., Gao, T., Fu, J., et al. (2018) Adipocyte-specific deficiency of Nfe2l1 disrupts plasticity of white adipose tissues and metabolic homeostasis in mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **503**, 264-270, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.013.
34. Perona, J. S., Portillo, M. P., Teresa Macarulla, M., Tueros, A. I., and Ruiz-Gutiérrez, V. (2000) Influence of different dietary fats on triacylglycerol deposition in rat adipose tissue, *Br. J. Nutr.*, **84**, 765-774.
35. Hou, B., Zhao, Y., He, P., Xu, C., Ma, P., et al. (2020) Targeted lipidomics and transcriptomics profiling reveal the heterogeneity of visceral and subcutaneous white adipose tissue, *Life Sci.*, **245**, 117352, doi: 10.1016/j.lfs.2020.117352.
36. Shulzhenko, N., Morgun, A., Hsiao, W., Battle, M., Yao, M., et al. (2011) Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut, *Nat. Med.*, **17**, 1585-1593, doi: 10.1038/nm.2505.

PTIP DEFICIENCY IN B LYMPHOCYTES REDUCES SUBCUTANEOUS FAT DEPOSITION IN MICE

Yaqin Xu¹, Doudou Zhu², Qin Yang², Dan Su^{2*}, and Yong Q. Chen^{2,3*}

¹ School of Food Science and Technology, Jiangnan University, 214122 Wuxi, China

² Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, 214122 Wuxi, China;
e-mail: dan.su@jiangnan.edu.cn, yqchen@jiangnan.edu.cn

³ Wuxi Translational Medicine Research Center and Jiangsu Translational Medicine Research Institute Wuxi Branch, Jiangnan University, 214122 Wuxi, China

Recent studies have predominantly focused on the role of B cells in metabolic diseases, yet the function of B cells in adipose homeostasis remains unclear. Pax transactivation domain-interacting protein (PTIP), a licensing factor for humoral immunity, is necessary for B cell development and activation. Here, using mice that lack PTIP in B cells (*Ptip*^{-/-} mice), we explored the role of B cells in adipose homeostasis under physiological conditions. Fat deposition in 8-week-old mice was measured by micro-CT, and *Ptip*^{-/-} mice presented a marked decrease in the deposition of subcutaneous adipose tissue (SAT). Untargeted lipidomics revealed that the triglyceride composition in SAT was altered in *PTIP*^{-/-} mice. In addition, there was no difference in the number of adipocyte progenitor cells in the SAT of wild-type (WT) and *Ptip*^{-/-} mice as measured by flow cytometry. To study the effects of steady-state IgM and IgG antibody levels on fat deposition, *Ptip*^{-/-} mice were injected intraperitoneally with serum from WT mice once every 3-4 days for 4 weeks. The iSAT mass of the recipient mice showed no significant increase in comparison to the controls after 4 weeks of injections. Our findings reveal that PTIP plays an essential role in regulating subcutaneous adipocyte size, triglyceride composition, and fat deposition under physiological conditions by controlling B cells. The decreased subcutaneous fat deposition in *Ptip*^{-/-} mice does not appear to be related to the number of adipocyte progenitor cells. The steady-state levels of IgM and IgG antibodies *in vivo* are not associated with the subcutaneous fat deposition.

Keywords: PTIP, B lymphocytes, subcutaneous fat deposition, adipose homeostasis

СОСТОЯНИЯ 1 И 2 В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОМ АППАРАТЕ КРАСНЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И ЦИАНОБАКТЕРИЙ

© 2021 Ю.В. Большевцева^{1*}, И.В. Тропин², И.Н. Стадничук³

¹ ФИЦ Биотехнологии, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
119071 Москва, Россия; электронная почта: bolychev1@yandex.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия

³ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127726 Москва, Россия

Поступила в редакцию 13.05.2021

После доработки 23.06.2021

Принята к публикации 23.06.2021

У окисленных фототрофов несбалансированное поглощение света фотосистемой I (ФС I) и фотосистемой II (ФС II) нарушает взаимодействие фотосистем, влияя на линейный поток электронов между ними. У растений и зелёных водорослей дисбаланс устраняется перемещением хлорофилл *a/b*-содержащей антенны между коровыми комплексами фотосистем. Эффект отражается на флуоресценции пигментного аппарата и получил название обратимого перехода между Состояниями 1 и 2. У красных водорослей и цианобактерий, имеющих фикобилисомную антенну (ФБС), особенности формирования Состояний 1/2 после ряда лет исследований остаются неясными. Предложенные молекулярные механизмы: латеральное перемещение ФБС по поверхности тилакоидной мембраны от ФС II к ФС I, обратимое отделение ФБС от димерного комплекса ФС II, а также спилlover находят возражения, не отвечая совокупности накопленных данных. Нами осуществлена регистрация изменений в стационарных спектрах флуоресценции красных водорослей и цианобактерий в Состояниях 1/2 при комнатной температуре, что позволило предложить объяснение имеющихся противоречий. Выявлено изменение флуоресценции хлорофилла и постоянство флуоресценции ФБС, связанных с димерами ФС II, при найденном ранее обратимом отделении ФБС от мономерных комплексов ФС I, чем доказана разная роль ФБС в двух фотосистемах. Возрастание флуоресценции ФБС, принадлежащих ФС I, обусловлено изменением степени окисленности ферредоксина как переносчика электрона и увеличением доли циклического транспорта электронов в пигментном аппарате в Состоянии 1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Состояние 1, Состояние 2, фикобилисома, флуоресценция, фотосистема I, фотосистема II, хлорофилл.

DOI: 10.31857/S0320972521070095

ВВЕДЕНИЕ

Быстрая адаптация пигментного аппарата к разному светопоглощению двух фотосистем у окисленных фототрофов, необходимая для коррекции поступления энергии к реакционным центрам ФС I и ФС II, получила название обратимого перехода из Состояния 1 в Состояние 2 [1, 2]. Состояние 1 соответствует большей доле световой энергии, получаемой ФС I, Состояние 2 возникает при преимущественном поглощении света ФС II. Впервые эффект был описан в 1969 г. у красных [3] и зелёных водорослей [4] и позднее нашёл подтверждение для цианобактерий и высших растений [1, 5].

У зелёных водорослей и растений молекулярный механизм переходных Состояний 1/2

считается установленным. В основе лежит перемещение тримеров хлорофилл *a/b*-содержащего антенного комплекса LHCP в плоскости тилакоидной мембраны при его фосфорилировании/дефосфорилировании с примыканием к коровым комплексам той или другой фотосистемы, что увеличивает или уменьшает их сечение поглощения. Процесс регулируется редокс-состоянием пула пластохинона, PQ [6, 7]. При большем поглощении света ФС II происходит восстановление PQ-пула и комплекса цитохромов *b₆f*, что ведёт к появлению дополнительного сайта окисления у образующегося пластохинола, PQN₂, в результате чего активируется специфическая киназа [8]. LHCP, фосфорилируясь киназой, отделяется от корового димерного комплекса ФС II, становясь после перемещения дополнительной антенной ФС I. В итоге реализуется Состояние 2 пигментного аппарата. При большей доле света в спектральной области поглощения ФС I формируется обратная цепь со-

Принятые сокращения: ФБС – фикобилисома; ФС II – фотосистема II; ФС I – фотосистема I.

* Адресат для корреспонденции.

бытий с участием фосфатазы (см. статью Dumas et al. [9] и ссылки к ней) и возникает Состояние 1. Процесс отражается на возрастании или падении уровня флуоресценции двух фотосистем [10].

Цианобактерии и красные водоросли по соотношению реакционных центров характеризуются в среднем примерно трёхкратным преобладанием ФС I в пигментном аппарате над ФС II [11, 12]. Кроме того, коровая антенна ФС II по количеству хлорофилла в 2,7 раза уступает антенне ФС I [13]. Для увеличения светосбора в этих группах фототрофов вместо ЛНСII служат фикобилисомы (ФБС) – водорастворимые пигмент-белковые макрокомплексы, прилегающие к стромальной стороне тилакоидной мембраны [12, 14]. Триггером Состояний 1 и 2 у всех фотосинтетиков является степень окисления PQ-пула [15, 16]. Освещение клеток светом, поглощаемым хлорофиллом, приводит у цианобактерий и красных водорослей к активизации ФС I, уменьшению активности ФС II и увеличению окисленности PQ-пула с реализацией Состояния 1. Освещение светом, поглощаемым ФБС, увеличивая долю энергии, поступающей к ФС II, ведёт к восстановлению PQ-пула и переходу пигментного аппарата в Состояние 2. У цианобактерий предложены три основные гипотезы появления двух Состояний. 1) Обратимое перемещение ФБС по поверхности тилакоидной мембраны от коровых комплексов ФС II к коровым комплексам ФС I с соответствующим усилением или ослаблением флуоресценции каждой из фотосистем. 2) Частичное отделение ФБС от тилакоидной мембраны с увеличением расстояния между ФБС и коровыми комплексами, что приводит к снижению эффективности миграции энергии от ФБС. 3) Спилловер – перемещение пигмент-белковых комплексов ФС II и ФС I в плоскости тилакоидной мембраны с появлением латеральных контактов и прямой передачей энергии между ними (см. статью Federman et al. [17] и ссылки к ней). Допускаются также механизмы, гибридные для трёх перечисленных, а также изменения флуоресценции хлорофилла в составе коровых комплексов ФС I и ФС II за счёт их структурной перестройки [18]. Например, если у всех фототрофов комплексы ФС II в тилакоидной мембране сформированы в виде димеров, то у цианобактерий комплексы ФС I существуют в виде тримеров и мономеров, и высказано предположение, что степень тримеризации может зависеть от появления Состояний 1/2 [19].

Предлагаемые гипотезы и их возможные молекулярные механизмы оставляют много вопросов, причём последние годы изучения Состоя-

ний 1/2 характеризуются как новыми успехами, так и рядом противоречий [2]. Так, мутации у цианобактерии *Synechocystis* 6803, затрагивающие аллофикоцианиновое ядро и длинноволновые терминальные эмиттеры ArcD, ArcE и ArcF в составе ФБС, от которых энергия передаётся хлорофиллу, как и ожидалось, сказываются на флуоресценции пигментного аппарата (см., например, [20, 21]), что свидетельствует об участии ФБС в образовании Состояний 1/2, но не проясняет механизма эффекта. Гипотеза обратимого перемещения ФБС по поверхности тилакоидной мембраны в Состояниях 1/2 базируется на падении и восстановлении интенсивности флуоресценции ФБС после фотовыцветания (FRAP) [18], методе, который не свободен от артефактов, вызванных избыточной энергией используемых при этом лазеров [22]. Допускались появление и распад в тилакоидной мембране некоторой части тройных суперкомплексов (ФС I–ФБС–ФС II), что может влиять на флуоресценцию. Однако доля таких доменов в сравнении с сепаратно расположенными комплексами ФС I и ФС II очень низка, что не соответствует уровню флуоресцентных изменений, наблюдаемых для Состояний 1/2 [23]. Против гипотезы спилловера, предложенной ещё в 1969 г. [1] как причины появления Состояний 1/2, серьёзным возражением является выстраивание мембранных рядов из димеров ФС II, известное по электронным микрофотографиям [24, 25]. При этом флуоресценция ФС I должна была бы падать за счёт очевидного увеличения среднего расстояния между комплексами фотосистем, в то время как, согласно низкотемпературным спектрам, падение достоверно не регистрируется [22]. Предполагалось, что обеспечивать подвижность ФБС в Состояниях 1/2 у цианобактерий могут Ser/Thr-содержащие киназы, подобно их роли в перемещении ЛНСII у растений, но после получения всех возможных делеционных Ser/Thr-киназных мутантов у цианобактерии *Synechocystis* 6803 их участие в подобных процессах не подтвердилось [26]. Поэтому механизм передачи сигнала от пластохинонового пула остаётся неясным.

Появление Состояний 1/2 – быстро обратимый эффект, исчезающий примерно за 30 с. Классическим методом изучения двух Состояний является фиксация при 77 К стационарных спектров флуоресценции после предварительного избирательного для ФС I или ФС II освещения клеток. При возбуждении светом 440 нм низкотемпературная флуоресценция складывается из полос ФС II при 685 и 695 нм и излучения ФС I при 720–730 нм. Возбуждение образцов светом 570–590 нм добавляет к этим полосам

максимум 660 нм, принадлежащий ФБС. Амплитуда полос, принадлежащих ФБС и, возможно, ФС II при нормировании спектров по отношению к длинноволновому максимуму ФС I возрастает в Состоянии 1 в сравнении с Состоянием 2. Вопрос безотносительного изменения собственной флуоресценции каждого комплекса: ФС I, ФС II или ФБС, остаётся при этом открытым.

Вторым методом исследования Состояний 1/2 служит РАМ-флуориметрия. Основными характеристиками излучения являются минимальный уровень модулированной флуоресценции, F_0 , при полностью открытых реакционных центрах ФС II и максимальный — F_M — при насыщающих вспышках света, и изменение этих уровней под воздействием дополнительного освещения. В Состоянии 1 сигнал F_M является более интенсивным, чем наблюдаемый для Состояния 2. Регистрация излучения ведётся в спектральной области ≥ 680 нм, где вклад ФБС в суммарную флуоресценцию остаётся значительным. Поэтому РАМ-флуориметрия не позволяет однозначно решить, ФБС или хлорофилл в большей степени влияют на F_M -уровень.

Известно, что существует недооценка роли ФБС в функционировании ФС I и её участия в феномене Состояний 1/2 [12, 27, 28]. Ранее на примере красной микроводоросли *Galdieria sulphuraria* [29] с использованием спектрофлуориметрии при 77 К нам удалось показать, что в Состоянии 1 происходит обратимое отделение ФБС от мономеров ФС I, в то время как связь ФБС с ФС II остаётся неизменной. Аналогичный вывод был сделан для ФС I у цианобактерий *Synechocystis* sp. 6803 [30]. В данной работе поставлена задача выявления изменений флуоресценции в Состояниях 1/2 отдельно для коровых комплексов ФС II и ФС I, а также для фракций ФБС, связанных с каждой из фотосистем непосредственно в физиологическом состоянии клетки без понижения температуры. В этих целях нами предложен и использован новый в подобных исследованиях методический приём быстрого измерения стационарных спектров флуоресценции при комнатной температуре. Полученные данные сопоставлены с результатами РАМ-флуориметрии, данными по фотоокислению P700 (реакционного центра ФС I) и с предыдущими низкотемпературными измерениями стационарных спектров. Мы исходим из представления об универсальности молекулярного механизма Состояний 1/2 у цианобактерий и красных водорослей, обладающих сходным пигментным аппаратом. Исследование проведено параллельно для красной микроводоросли *G. sulphuraria* и цианобактерии *Arthrospira platensis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования. Клетки цианобактерии *Arthrospira (Spirulina) platensis* IPPAS P-511 из коллекции ИФР РАН выращивали в 150-мл колбах при 30 °С на постоянном белом свете 40 мкМ фотонов·м⁻²·с⁻¹ (лампы SL 20/32-735, Китай) в свежеприготовленной среде Зарука при pH 9,6 на качалке Orbital Shaker PSU-10i («Biosan», Латвия). Аксеничную культуру термоацидофильной красной микроводоросли *G. sulphuraria* (Galdieri) Merola, штамм IPPAS P-513 из коллекции ИФР РАН выращивали в тех же условиях освещения и перемешивания при 36 °С на среде Аллен, создавая pH 2,5 за счёт добавления H₂SO₄. В обоих случаях клетки осаждали мягким центрифугированием при 180 g на 5–7 дни роста, ресуспендировали и доводили до необходимой в экспериментах оптической плотности с помощью культуральной среды.

Стационарные спектры флуоресценции суспензии клеток *G. sulphuraria* и *A. platensis* измеряли при комнатной температуре на спектрофлуориметре RF-5301 PC («Shimadzu», Япония); полуширина спектральной щели для возбуждения флуоресценции хлорофилла при 435 нм и для возбуждения ФБС при 580 нм, а также для регистрируемого излучения составляла 5 нм. Оптическая плотность образцов в красном максимуме поглощения хлорофилла при 678 нм равнялась 0,1 в кювете толщиной 3 мм. Регистрация спектра в области 600–800 нм занимала 6 с, в течение которых, как показали контрольные замеры излучения, сохранялись Состояния 1/2. Каждый спектр являлся средним из трёх измерений. Суспензию клеток выдерживали 5 мин в темноте, после чего аликвоты переносили в измерительные кюветы. Здесь, а также при измерениях флуоресценции в импульсном РАМ-режиме и при регистрации фотоокисления P700 для перевода клеток в Состояние 1 использовали освещение дальним красным светом 715 нм (20 мкМ фотонов·м⁻²·с⁻¹, 2 мин) от управляемой светодиодной лампы (High Power Led-Lamp, control unit HPL-C, «Walz», Германия). Для реализации Состояния 2 использовали свет 580 нм (80 мкМ фотонов·м⁻²·с⁻¹, 2 мин) от галогеновой лампы KL1500 («Schott», Германия) после интерференционного фильтра BPF 580/35 (ООО «Фотооптик», Россия) и теплового фильтра («Balzers», Лихтенштейн). Свет от источников излучения подавался через дополнительное вертикальное отверстие в кюветном отделении спектрофлуориметра с помощью световода.

Флуоресценцию клеток в импульсном режиме освещения регистрировали при помощи флуоро-

метра РАМ-101 («Walz») [31]. Для определения минимального уровня флуоресценции F_0 в приборе применён частотно-модулированный свет 650 нм (< 1 мкМ фотонов·м⁻²·с⁻¹) с регистрацией суммарного излучения для длин волн ≥ 680 нм. Для получения максимального уровня флуоресценции F_M или F_M' использовали насыщающие 1 с импульсы света интенсивностью 5000 мкМ фотонов·м⁻²·с⁻¹ от управляемой лампы на основе светодиодов 620 нм (High Power Led-Lamp, control unit HPL-C, «Walz»).

Фотоокисление P700, реакционного центра ФС I, регистрировали по разности поглощения клеток при 810 и 870 нм на двухволновой приставке ED-P700 DW («Walz») [32], прилагаемой к РАМ-101. Измерения, как и при импульсной регистрации флуоресценции, проводили при концентрации хлорофилла в образцах 10 мкг·мл⁻¹ [31]. Интенсивности действующего света 580, 620 и 715 нм определяли, используя измеритель мощности излучения Optical Power Meter System («Thorlabs», Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Стационарные спектры флуоресценции. При возбуждении флуоресценции клеток, находящихся в Состояниях 1 или 2, учитывали области преимущественного поглощения хлорофилла и ФБС в спектрах, которые ранее неоднократно регистрировались для *G. sulphuraria* и *A. platensis* (см., например, [12, 33]). Полоса Core хлорофилла находится на участке спектра 400–440 нм; широкая полоса поглощения 625 нм принадлежит ФБС, красный пик поглощения хлорофилла расположен при 678 нм. Спектры двух исследуемых видов обладают значительным сходством за счёт одинакового состава полудисковидных ФБС, фикобилипротеинами которых являются С-фикоцианин и аллофикоцианин [12, 33].

При возбуждении светом 580 нм, поглощаемым преимущественно ФБС, спектры флуоресценции клеток *G. sulphuraria* слагаются из излучения фикобилисомной антенны с максимумом 660 нм и возникающей за счёт миграции энергии от ФБС флуоресценции хлорофилла с максимумом при 682 нм (рис. 1, а). Как и следовало ожидать, в Состоянии 1 интенсивность флуоресценции оказывается заметно больше, чем в Состоянии 2. Разностный спектр (Состояния 1 минус Состояние 2) характеризуется единственным максимумом излучения 682 нм (рис. 1, а), положение которого указывает на принадлежность изменяющегося участка спектров хлорофиллу. При возбуждении флуоресценции светом

435 нм в спектре исчезает полоса 660 нм, относимая к ФБС, и наблюдается лишь полоса хлорофилла с максимумом 682 нм (рис. 1, б). Интенсивность флуоресценции в Состоянии 2 в сравнении с Состоянием 1 понижается, как и при возбуждении светом 580 нм, но форма спектра, в отличие от рис. 1, а, остаётся почти неизменной (сравнение рис. 1, а и 1, б). Сопоставление разностного (рис. 1, а, спектр 3) и «хлорофилльного» (рис. 1, б, спектр 2) спектров показывает, что их коротковолновые склоны полностью совпадают. Это означает, что спектральные изменения, сопровождающие обратимые Состояния 1/2, обусловлены хлорофиллом, а изменения флуоресценции ФБС не происходит. Иными словами, интенсивность флуоресценции фракции ФБС, принадлежащей ФС II, при смене Состояний 1/2 сохраняется постоянной.

Излучение хлорофилла в клетке при комнатной температуре, как известно, почти полностью принадлежит ФС II [34–36]. Часть излучения (правый склон спектров, рис. 1) обусловлена флуоресценцией ФС I. Поэтому несовпадение разностного и «хлорофилльного» спектров в их длинноволновой части (рис. 1, в) указывает, что в Состоянии 2 флуоресценция ФС II падает при остающемся неизменным излучении ФС I.

Чтобы с большей достоверностью судить об отсутствии изменений во флуоресценции ФС I, а также показать, что при смене двух Состояний флуоресцентные изменения у красных водорослей и цианобактерий происходят однотипно, спектры цианобактерии *A. platensis* были измерены в условиях, аналогичных условиям, использованным для *G. sulphuraria* (рис. 2).

ФС I в пигментном аппарате *A. platensis* обладает конститутивными наиболее длинноволновыми из известных формами хлорофилла с интенсивной флуоресценцией 760 нм [37] при 77 К, максимум которой сдвигается в область 727 нм при комнатной температуре (рис. 2, б и в). Эта особенность позволяет судить о возможности изменений флуоресценции ФС I или их отсутствии, что не удаётся с полной чёткостью зарегистрировать для *G. sulphuraria*. Отсутствие полосы 727 нм в разностном спектре (рис. 2, в) позволяет утверждать, что, в отличие от ФС II, собственная флуоресценция хлорофилла ФС I при смене двух Состояний остаётся неизменной. В коротковолновом участке спектра ~650 нм также имеются различия (рис. 2, в), которые не удаётся наблюдать в случае *G. sulphuraria* (рис. 1, в) (нельзя исключить, что эта коротковолновая флуоресценция принадлежит ФБС, но это требует дополнительного исследования).

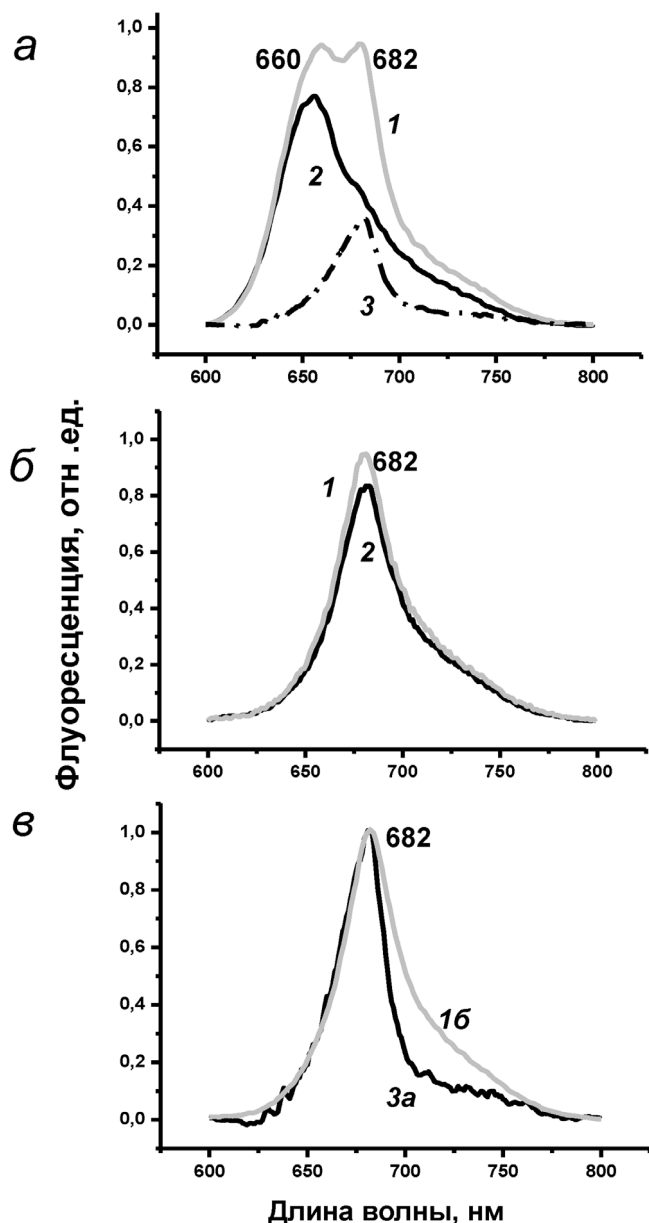


Рис. 1. Спектры флуоресценции клеток *G. sulphuraria* в Состояниях 1/2: *a* – возбуждение светом 580 нм в Состоянии 1 (1), в Состоянии 2 (2) и их разностный спектр (3); *б* – возбуждение светом 435 нм в Состоянии 1 (1) и в Состоянии 2 (2); *в* – сопоставление разностного спектра 3а (соответствует спектру 3 на панели *a*) и спектра 1б (соответствует спектру 1 на панели *б*), нормированных в максимуме 682 нм

РАМ-флуориметрия. Используемые для РАМ-измерений адаптированные к темноте клетки *G. sulphuraria* (рис. 3, *a*) и *A. platensis* (рис. 3, *б*) после освещения 2 мин светом 580 нм, 80 мкМ фотонов·м⁻²·с⁻¹ находились в Состоянии 2. Для определения максимального уровня флуоресценции F_{M2} клетки были подвергнуты высокоинтенсивному краткому (1 с) освещению

светом 620 нм, который, как и свет 650 нм, используемый для определения F_0 , поглощается одновременно хлорофиллом и ФБС. Затем клетки были переведены в Состояние 1 после освещения их 2 мин светом 715 нм интенсивностью 20 мкМ фотонов·м⁻²·с⁻¹. В этом случае после 1 с

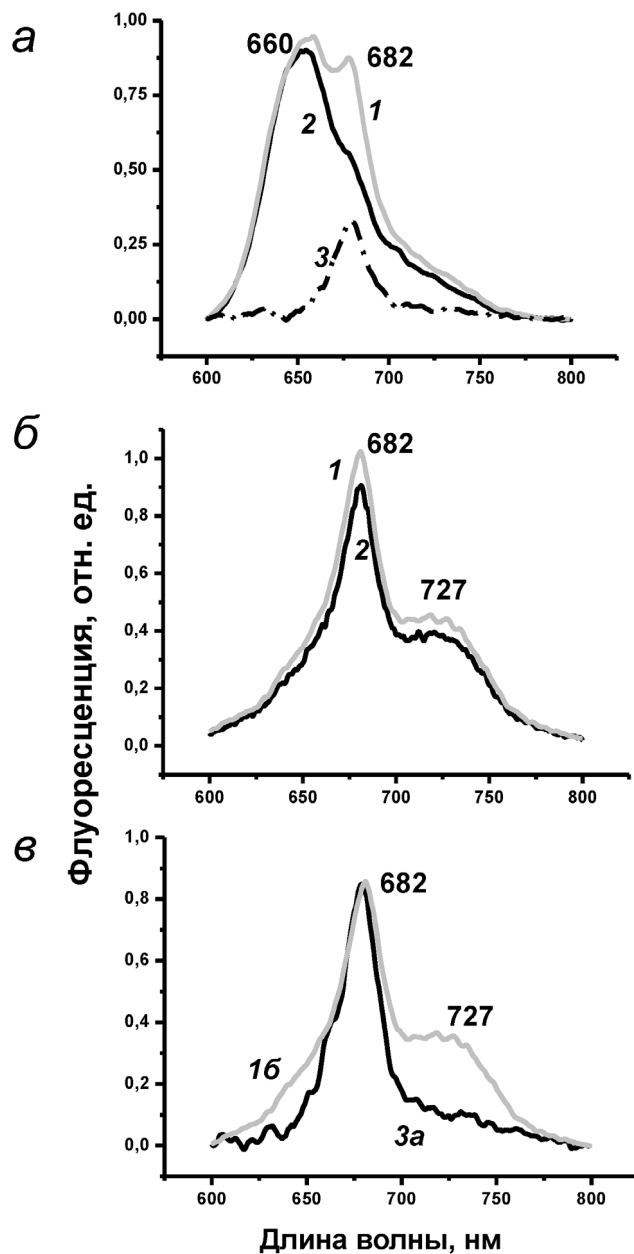


Рис. 2. Спектры флуоресценции клеток *A. platensis* в Состояниях 1/2: *a* – возбуждение светом 580 нм в Состоянии 1 (1), в Состоянии 2 (2) и их разностный спектр (3); *б* – возбуждение светом 435 нм в Состоянии 1 (1) и в Состоянии 2 (2); *в* – сопоставление разностного спектра 3а (соответствует спектру 3 на панели *a*) и спектра 1б (соответствует спектру 1 на панели *б*), нормировка в максимуме 682 нм. Стандартное отклонение интенсивности в разностных спектрах здесь и на рис. 1 $\leq 1,5\%$

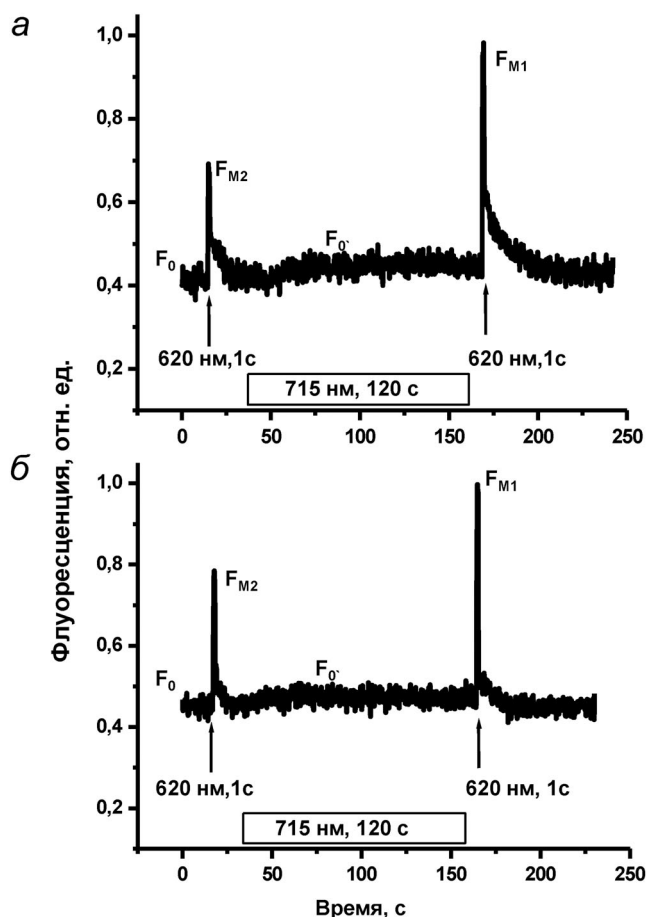


Рис. 3. РАМ-флуориметрия *G. sulphuraria* (а) и *A. platensis* (б), демонстрирующая разную интенсивность флуоресценции пигментного аппарата для клеток, находящихся в Состоянии 2 во время первой насыщающей световой вспышки (F_{M2}) и затем после перевода в Состояние 1 (F_{M1}) во время второй вспышки

вспышки света 620 нм максимальный уровень флуоресценция F_{M1} был почти вдвое выше в сравнении с уровнем F_{M2} , получаемым после вспышки той же длительности. Известное по многочисленным литературным данным некоторое увеличение значения F_0 до F_0' после насыщающей вспышки (рис. 3) пренебрежимо мало в сравнении с изменениями F_{M1} и F_{M2} [35]. Одинаковая реакция на вспышки, полученная для клеток *G. sulphuraria* (рис. 3, а) и *A. platensis* (рис. 3, б), как и в случае измерения спектров (рис. 1 и 2), указывает на однотипность процессов формирования Состояний 1/2 у цианобактерий и красных водорослей. Флуорометр РАМ-101 [35] не позволяет достоверно оценить вклад флуоресценции ФБС в регистрируемое излучение хлорофилла, однако даёт возможность сопоставить результаты флуоресцентных измерений с регистрацией степени фотоокисления Р700, характеризующей активность

ФС I при смене двух Состояний в одновременных экспериментах (Р700-приставка к флуорометру). Если вместо одиночных применяется серия насыщающих вспышек, уровни флуоресценции F_{M1} и F_{M2} снижаются за счёт появления нефотохимического тушения ФС II [2, 35, 36]. Это означает, что два световых адаптационных процесса в этих условиях реализуются одновременно. Поэтому для разграничения эффектов световой адаптации к Состояниям 1/2 и нефотохимического тушения в данной работе (рис. 3) серийные вспышки не использовались.

Фотоокисление Р700 и изменения флуоресценции. Измерения переменной и стационарной флуоресценции остаются малоинформативными в отношении активности ФС I. Как изменяется работа ФС I при переходе от Состояния 2 к Состоянию 1, когда уровень флуоресценции ФС II повышается? Сравнить изменения активности двух фотосистем в Состояниях 1/2

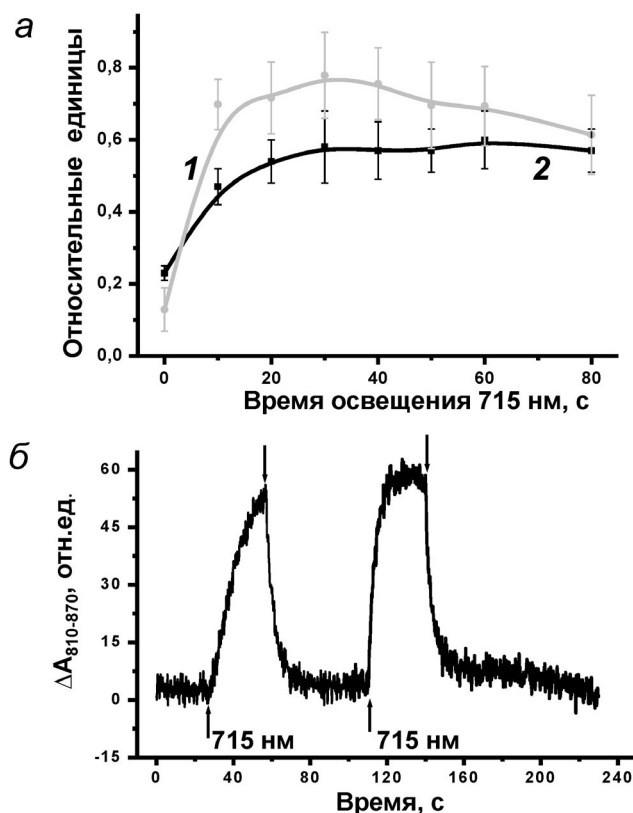


Рис. 4. Фотоокисление Р700 и переменная флуоресценция клеток *G. sulphuraria*: а — изменение относительного уровня $(\Delta A'/\Delta A_{max})$ фотоокисления Р700 (1) и выхода переменной, $\{(F_M - F_0)/F_M\}$, флуоресценции (2) в интервале времени перехода из Состояния 2 в Состояние 1 на свету 715 нм; б — кинетика фотоокисления-восстановления Р700 на свету 715 нм, регистрируемая в течение 30 с на одном образце клеток, находившихся в Состоянии 2 (первое освещение) и затем в Состоянии 1 (второе освещение). Стрелки \uparrow и \downarrow обозначают включение и выключение света

можно, сопоставляя степень фотоокисления P700, как реакционного центра ФС I, и кинетику изменения флуоресценции. Находившиеся в темноте клетки *G. sulphuraria* переводили в Состояние 2, освещая в течение 2 мин светом 580 нм, 100 мкМ фотонов·м⁻²·с⁻¹. Затем осуществляли постепенный переход из Состояния 2 в Состояние 1, освещая образец светом 715 нм интенсивностью 20 мкМ фотонов·м⁻²·с⁻¹, которая позволяла наблюдать кинетику перехода при увеличении времени освещения. Интервалы времени предварительного освещения светом 715 нм составляли 0 с (сразу после света 580 нм) и затем соответственно 10, 20, 30, 40, 50, 60 и 80 с; для каждой точки отсчётного времени использовали новый адаптированный к темноте образец (рис. 4, а). Относительное изменение переменной флуоресценции, $\{(F_M - F_0)/F_M\}$, регистрировали на насыщающей вспышке света 620 нм, 5000 мкМ фотонов·м⁻²·с⁻¹ длительностью 1 с. В параллельной серии опытов активность P700 ($\Delta A'$) при переходе из Состояния 1 в Состояние 2 оценивали по отношению к максимальному уровню фотоокисления (ΔA_{\max}), достигаемому на насыщающем свете 715 нм, 3000 мкМ фотонов·м⁻²·с⁻¹. Иными словами, свет 15 нм разной интенсивности был использован и для осуществления Состояния 1, и для фотоокисления P700. Уровень сигнала от окисленного P700 измеряли в каждой временной точке после освещения образцов светом 715 нм интенсивностью 100 мкМ фотонов·м⁻²·с⁻¹. Сравнение изменения выхода переменной флуоресценции и скорости фотоокисления P700, возможное на качественном уровне, показывает их сходное поведение (рис. 4, а). Судя по обеим временным кривым (рис. 4, а), в условиях опыта время перехода в Состояние 1 занимает ~30 сек. Поэтому применяемое нами во флуоресцентных экспериментах (рис. 1–3) предварительное двухминутное освещение светом 715 нм гарантировало смену Состояний 1/2. Хотя для количественных оценок экспериментальные данные недостаточны, очевидно, что увеличение флуоресценции ФС II после освещения 715 нм коррелирует с возрастанием скорости фотоокисления P700, т.е. с возрастанием активности ФС I. Это возможно только за счёт интенсификации циклического транспорта электрона в ФС I, осуществляемого без поступления электронов по цепи линейного транспорта от ФС II.

Если последовательно рассмотреть кинетику фотоокисления P700 в течение 30 с, достаточных для фотоокисления (рис. 4, а) на одном образце клеток, находившихся в Состоянии 2, сразу после включения действующего света 715 нм

и затем повторив освещение, то окажется, что кинетика процесса в первом случае характеризуется относительно медленным окислением и восстановлением реакционного центра, но уже повторное освещение приводит к ускорению обоих процессов (рис. 4, б). Данное обстоятельство означает активизацию фотоокисления P700 и накопление катион-радикала P700⁺ за счёт увеличения интенсивности циклического транспорта электрона в ФС I и передачи электрона к первичному внешнему акцептору, которым, как известно, является ферредоксин [38, 39].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании рассмотрены адаптационные изменения пигментного аппарата, происходящие в Состояниях 1/2 у красной микроводоросли *G. sulphuraria* и цианобактерии *A. platensis*, которые принадлежат к двум разным группам фотосинтетиков, имеющих фикобилисомную антенну. Кроме наличия ФБС, сходство пигментного аппарата *G. sulphuraria* и *A. platensis*, как у всех красных водорослей и цианобактерий, заключается в присутствии в тилакоидных мембранах димеров ФС II и мономеров ФС I. Наряду с мономерами у цианобактерий имеются тримеры ФС I; у красных водорослей мономеры ФС I обладают дополнительной хлорофилл *a*-содержащей антенной, Lhcg-протеином [40]. Как показали проведённые эксперименты, световые адаптации к Состояниям 1/2 протекают для красных водорослей и цианобактерий одинаковым образом. Логично предположить, что пигмент-белковые комплексы, которыми различаются виды, а именно тримеры ФС I и Lhcg-протеин, играют второстепенную роль в данном феномене.

Эффективность миграции энергии от ФБС к хлорофиллу, принадлежащему двум фотосистемам, близка к 100% [41]. При исследовании Состояний 1/2 наиболее важным остаётся вопрос о том, флуоресценция какого из пигмент-белковых комплексов и по каким причинам меняется в ходе освещения клеток светом разного спектрального состава. При комнатной температуре флуоресценция ФБС, принадлежащих ФС I, не должна наблюдаться [36], так как перенос энергии от ФБС происходит быстрее, чем её излучение, а собственная флуоресценция ФС I минимальна (рис. 1 и 2). Поэтому регистрируемая при комнатной температуре флуоресценция с полосой 660 нм (рис. 1 и 2) относится к клеточной фракции ФБС, связанных с ФС II. Излучение ФБС, связанных с ФС I, ясно проявляется только при низкой температуре 77 К [2, 29, 36].

Ранее благодаря низкотемпературным спектрам удалось показать, что в Состоянии 1 у красных водорослей [29] и цианобактерий [30] происходит отделение ФБС от ФС I с нарушением миграции энергии между ними. Частичное разобщение ФС I со своей фикобилисомной антенной возникает без перемещения ФБС к димерам ФС II [29, 30]. В Состоянии 2 протекает обратный процесс с быстрым восстановлением миграции.

При 77 К совпадение спектральных свойств двух фракций ФБС, принадлежащих каждой из фотосистем, не даёт возможности сделать однозначное заключение о роли ФБС, относящихся к ФС II. Нам впервые удалось выявить различия Состояний 1 и 2 в стационарных спектрах флуоресценции цианобактерий и красных водорослей при комнатной температуре. В Состоянии 1 происходит увеличение, а в Состоянии 2 — уменьшение флуоресценции хлорофилла ФС II (рис. 1 и 2). Указанием на это ранее служило измерение 77 К спектров цианобактерий при недостаточно точном сравнении с флуоресценцией добавляемого к образцам клеток внутреннего стандарта, флуоресцеина или родамина [42, 43]. Флуоресценция ФБС, связанных с ФС II, в отличие от флуоресценции хлорофилла, в ходе смены двух Состояний оказалась неизменной. Сохраняющееся постоянство флуоресценции ФБС, связанных с ФС II, очевидным образом противоречит возможности перемещения фикобилисомной макроантенны от ФС II к ФС I. Кроме того, требуется обоснование вряд ли возможного молекулярного механизма, способного к перемещению в плоскости мембраны белковых макрокомплексов массой в несколько млн дальтон, какими являются ФБС [2, 14, 18]. Спилловер, как ещё одно возможное объяснение Состояний 1/2, предполагает, что за счёт возникновения прямого контакта между комплексами двух фотосистем уменьшение флуоресценции хлорофилла ФС II должно сопровождаться передачей возбуждения и увеличением флуоресценции в ФС I, и наоборот. Постоянство флуоресценции в полосе 727 нм, относящейся у *A. platensis* к хлорофиллу ФС I, в то время как в полосе 682 нм, принадлежащей ФС II, при переходах между Состояниями происходят изменения интенсивности (рис. 2), означает отсутствие спилловера.

Схема процессов, протекающих в ФС II при смене Состояний 1/2 в пигментном аппарате, представлена на рис. 5. Постоянство флуоресценции ФБС (рис. 1 и 2) означает, что миграция энергии от ФБС к ФС II в обоих Состояниях сохраняется на одном уровне, что возможно при неизменности контакта между ФБС и димером

ФС II. Плоская поверхность и соответствие площади димера ФС II размерам ядра ФБС стабилизируют два макрокомплекса [14, 44, 45]. Их тесное взаимодействие обеспечивает синхронность формирования рядов, которые состоят из димеров ФС II, ясно различимых в Состоянии 1 на горизонтальных сколах тилакоидных мембран, и рядов, образуемых ФБС на мембранной поверхности тилакоида [24, 25]. Значение подобной топологии оставалось неясным, и лишь недавно было показано, что формирование рядов обеспечивает в них тесную состыковку соседних димеров ФС II, при которой между ними возможен обмен энергией [46]. Миграция возбуждения в рядах после поглощения кванта света, как установлено [47], увеличивает среднее время жизни возбуждённого состояния для антенного хлорофилла ФС II и подразумевает наблюдаемые (рис. 1 и 2) изменения флуоресценции. Поскольку предполагавшееся участие киназно-фосфатазной системы в реализации Состояний 1/2 у цианобактерий не нашло подтверждения [26], остаётся вопрос о возможных причинах изменения плоскостной геометрии (рис. 5, в и г) димеров ФС II в мембране тилакоидов. В Состоянии 1 при снижении активности ФС II происходит уменьшение притока электронов к пластохинону, что позволяет сбалансировать скорости восстановления и окисления переносчиков электронов между фотосистемами. В этих условиях возникает трансмембранный электрохимический потенциал (необходимый для синтеза АТФ), который образуется в результате разделения зарядов между наружной и внутренней сторонами тилакоидной мембраны. Такое состояние энергизации мембраны соответствует появлению рядов, состоящих из димеров ФС II, за которыми следуют связанные с ними ФБС, также формирующие ряды на поверхности мембраны. На свету, поглощаемом ФБС (Состояние 2), за счёт активизации ФС II возрастает приток электронов к пластохиноновому пулу, вызывая обратный процесс расформирования рядов и появление диффузно расположенных ФБС и ФС II с уменьшением уровня флуоресценции. Воздействие на то или иное расположение в мембране возможно благодаря наличию в составе полипептидов ФС II большого числа несущих заряд поверхностных аминокислотных остатков [48]. Количественные оценки эффекта для столь крупных белковых комплексов, какими являются димеры ФС II, вероятно, станут возможны в будущем.

Контактное взаимодействие ФБС с мономерами ФС I осуществляется в узком участке поверхности между двумя нижними цилиндрами ядра ФБС (рис. 6 и подробно в статье Zlenko et al.

[44]). Три гидрофильные полипептидные субъединицы, PsaC, PsaD и PsaE, образуют на стромальной поверхности комплекса ФС I объёмный микровыступ размером 3 нм, который идеально подходит своей формой к пространственной щели между двумя нижними цилиндрами аллофиоцианина в ядре ФБС [44]. Контакт между ядром ФБС и ФС I в стерической белковой модели столь тесен, что обеспечивает расстояние между терминальными эмиттерами ФБС и ближайшими хлорофиллами в составе ФС I, которое достаточно для переноса энергии возбуждения от антенны [44]. Фосфорилирование линкерных белков и терминального эмиттера Арс Е [49] создаёт на поверхности ФБС отрицательный заряд, в то время как стромальная поверхность комплекса ФС I в области микровыступа заряжена положительно [50], что обес-

печивает электростатическое взаимодействие с ФБС (рис. 6). Тот же (PsaC–PsaD–PsaE)-выступ не позволяет ФБС вступать в контакт с тримерами ФС I из-за несовпадения их трёхмерной симметрии и билатеральной симметрии ядра ФБС [44]. Отсутствие тримеров у красных водорослей поэтому не влияет на возможность использования фикобилисомной антенны в ФС I, а у цианобактерий присутствие мономеров и тримеров ФС I служит способом регулировать соотношение фракций ФБС в составе ФС II и ФС I.

Ферредоксин, как первичный акцептор электрона в ФС I, является небольшим белком массой 11 кДа с поверхностным отрицательным зарядом, что позволяет ему размещаться в той же поверхностной области ФС I, что и ФБС [50]. Приобретая электроны от P700, ферредоксин

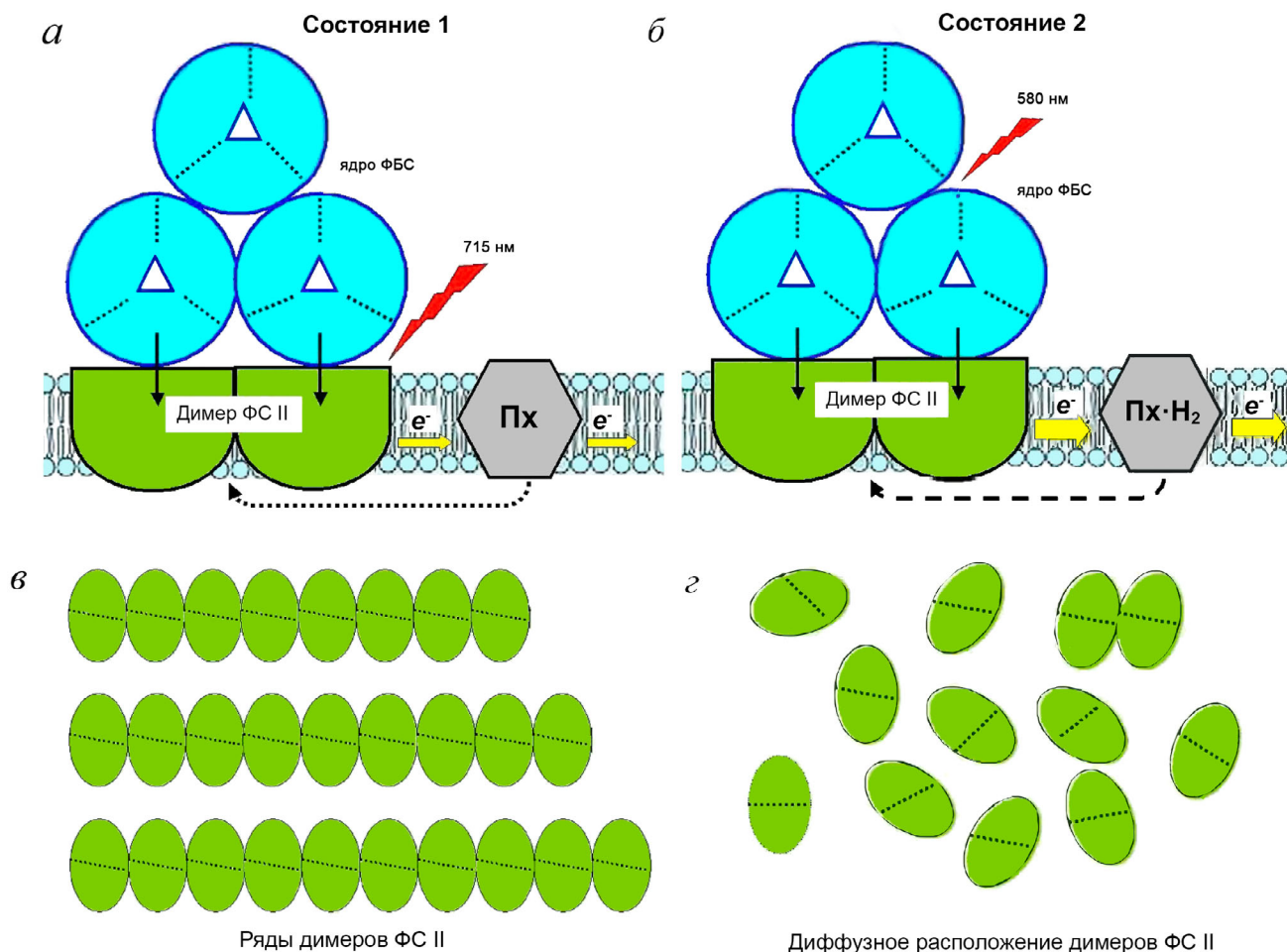


Рис. 5. Пигментный аппарат ФС II в Состояниях 1/2 (а и б). Черные стрелки обозначают миграцию энергии от ядра ФБС к димеру ФС II; красные стрелки – возбуждающий свет для перевода клеток в Состояние 1 (715 нм) и в Состояние 2 (580 нм); горизонтальные жёлтые стрелки разной толщины – линейный транспорт электрона; пунктирные стрелки – влияние окисленной (Pх) и восстановленной (Pх·H₂) форм пластохинона на димеры ФС II. в – Расположение димеров ФС II в плоскости тилакоидной мембраны в виде рядов в Состоянии 1 и неупорядоченное расположение в Состоянии 2 (г)

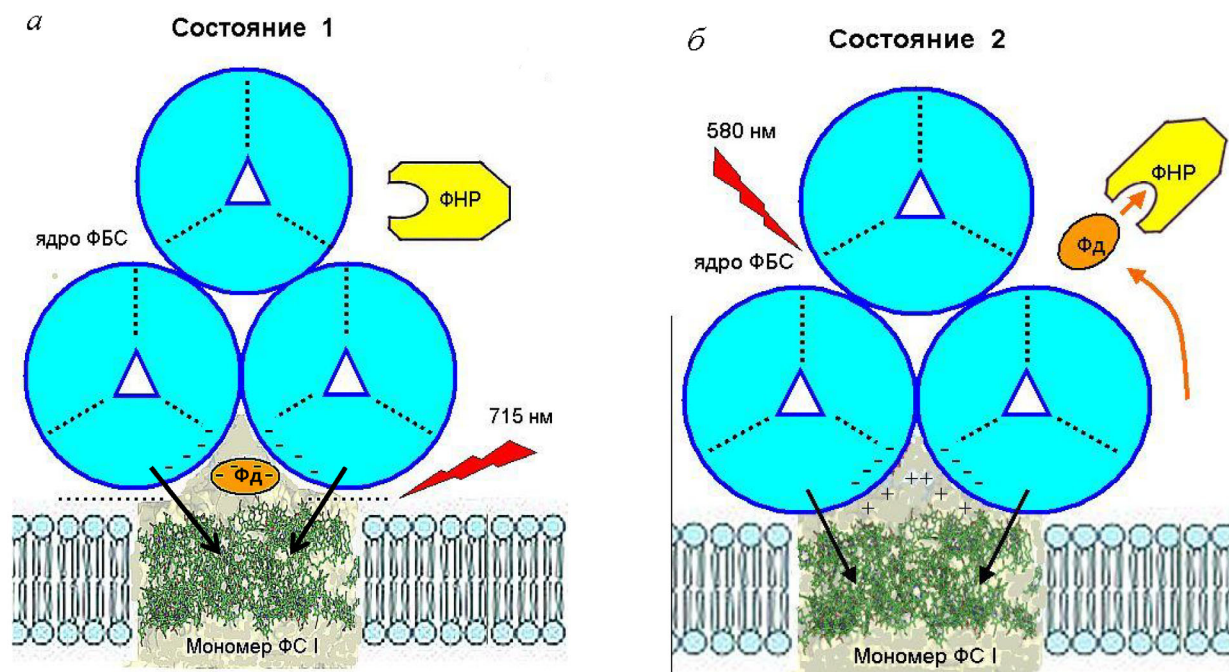


Рис. 6. Изменения в пигментном аппарате ФС I, сопровождающие переходные Состояния 1 (а) и 2 (б). Черные стрелки обозначают миграцию энергии от ядра ФБС к мономеру ФС I, красные стрелки – возбуждающий свет, горизонтальный пунктир на панели а обозначает расхождение ФБС и ФС I, уменьшающее миграцию; Фд – ферредоксин, ФНР – ферредоксин-НАДФ⁺ редуکتаза

покидает поверхность ФС I, присоединяясь к ферредоксин-НАДФ⁺ оксидоредуктазе, связанной с ФБС, принадлежащей ФС I [51, 52]. В Состоянии 1, когда снижается поток электронного транспорта от ФС II, уменьшается и поступление получающих электроны молекул ферредоксина к ферредоксин-НАДФ⁺ оксидоредуктазе. Одноименные отрицательные поверхностные заряды ферредоксина и ядра ФБС приводят к эффекту расхождения ФБС и мономера ФС I и соответствующему возрастанию флуоресценции ФБС (рис. 6, а). В отличие от ФС II, расхождение возможно, так как контактная поверхность ФБС и ФС I меньше, чем в случае ФС II, а ферредоксин с его поверхностным зарядом является принадлежностью лишь ФС I. Подобно ФС II, переход между Состояниями 1/2 не требует для ФС I дополнительных затрат энергии АТФ пигментным аппаратом и автоматически регулируется соотношением долей линейного и циклического транспорта электронов.

В данной работе продемонстрирована универсальность проявления феномена Состояний 1/2 у красных водорослей и цианобактерий. В итоге работы можно утверждать, что две фракции ФБС, входящие в состав пигментного аппарата

ФС I и ФС II, при смене Состояний 1/2 ведут себя по-разному. Связь ФБС с ФС II остаётся постоянной независимо от того, в Состоянии 1 или в Состоянии 2 находится клетка. В то же время ранее полученные нами [29] и в работе Chukhutsina et al. [30] при 77 К сведения указывают на то, что в Состоянии 1 происходит обратимое отделение ФБС от ФС I. Различными являются также изменения флуоресценции собственных хлорофилльных комплексов ФС I и ФС II. Выявлено, что в Состоянии 2 в сравнении с Состоянием 1 уменьшается флуоресценция хлорофилла ФС II, в то время как флуоресценция ФС I остаётся на постоянном уровне. Полученные результаты позволили предложить интерпретацию происходящих флуоресцентных изменений, как результат обратимого формирования рядов димерами ФС II в плоскости мембран тилакоидов и зависимо от активности ферредоксина транспорта электронов в ФС I.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mullineaux, C. W., and Emlyn-Jones, D. (2005) State transitions: an example of acclimation to low-light stress, *J. Exp. Bot.*, **56**, 389-393.
- Calzadilla, P. I., and Kirilovsky, D. (2020) Revisiting cyanobacterial state transitions, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **19**, 585-603.
- Murata, N. (1969) Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll *a* fluorescence in *Porphyridium cruentum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 242-251.
- Bonaventura, C., and Myers, J. (1969) Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*, *Biochim. Biophys. Acta*, **189**, 366-383.
- Minagawa, J. (2011) State transitions – The molecular remodeling of photosynthetic supercomplexes that controls energy flow in the chloroplast, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 897-905.
- Lemeille, S., and Rochaix, J.-D. (2010) State transitions at the crossroad of thylakoid signalling pathways, *Photosynth. Res.*, **106**, 33-46.
- Pesaresi, P., Pribil, M., Wunder, T., and Leister, D. (2011) Dynamics of reversible protein phosphorylation in thylakoids of flowering plants: the roles of STN7, STN8 and TAP38, *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 887-896.
- Kanervo, E., Suorsa, M., and Aro, E.-A. (2005) Functional flexibility and acclimation of the thylakoid membrane, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **4**, 1072-1080.
- Dumas, L., Zito, F., Blangy, S., Auroy, P., Johnson, X., et al. (2017) A stromal region of cytochrome *b₆f* subunit IV is involved in the activation of the Stt7 kinase in *Chlamydomonas*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 12063-12068.
- Ruban, A. V., and Johnson, M. P. (2009) Dynamics of the photosystems cross-section associated with the state transitions in higher plants, *Photosynth. Res.*, **99**, 173-183.
- Golbeck, J. H. (1994) in *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Bryant, D. A., ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 320-354.
- Rakhimberdieva, M. G., Boichenko, V. A., Karapetyan, N. V., and Stadnichuk, I. N. (2001) Interaction of phycobilisomes with photosystem II dimers and photosystem I monomers and trimers in the cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Biochemistry*, **40**, 15780-15788.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R., and Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature*, **473**, 55-60.
- Bald, D., Kruij, J., and Rögner, M. (1996) Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: how is the phycobilisome connected with the photosystems? *Photosynth. Res.*, **49**, 103-118.
- Mullineaux, C. W., and Allen, J. F. (1990) State 1-State 2 transitions in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 are controlled by the redox state of electron carriers between photosystems I and II, *Photosynth. Res.*, **23**, 297-311.
- Ogawa, T., Harada, T., Ozaki, H., and Sonoike, K. (2013) Disruption of the *ndhF1* gene affects chlorophyll fluorescence through state transition in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, resulting in apparent high efficiency of photosynthesis, *Plant Cell Physiol.*, **54**, 1164-1171.
- Federman, S., Malkin, S., and Scherz, A. (2000) Excitation energy transfer in aggregates of photosystem I and photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: can assembly of the pigment-protein complexes control the extent of spillover? *Photosynth. Res.*, **64**, 199-207.
- Mullineaux, C. W. (2008) Phycobilisome-reaction centre interaction in cyanobacteria, *Photosynth. Res.*, **95**, 175-182.
- Li, H., Li, D., Yang, S., Xie, J., and Zhao, J. (2006) The state transition mechanism – simply depending on light- and -off in *Spirulina platensis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1512-1519.
- Dong, C., Tang, A., Zhao, J., Mullineaux, C. W., Shen, G., and Bryant, D. A. (2009) ApcD is necessary for efficient energy transfer from phycobilisomes to photosystem I and helps to prevent photoinhibition in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 1122-1128.
- Zlenko, D. V., Elanskaya, I. V., Lukashev, E. P., Bolychevtseva, Y. V., Suzina, N. E., et al. (2019) Role of the PB-loop in ApcE and phycobilisome core function in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 155-166.
- McConnell, M. D., Koop, R., Vasil'ev, S., and Bruce, D. (2002) Regulation of the distribution of chlorophyll and phycobilin-absorbed excitation energy in cyanobacteria. A structure-based model for the light state transition, *Plant Physiol.*, **130**, 1201-1212.
- Strašková, A., Steinbach, G., Konert, G., Kotabová, E., Komenda, J., et al. (2019) Pigment-protein complexes are organized into stable microdomains in cyanobacterial thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 1-15.
- Wollman, F. A. (1979) Ultrastructural comparison of *Cyanidium caldarium* wild type and III-C mutant lacking phycobilisomes, *Plant Physiol.*, **63**, 375-381.
- Mörschel, E., and Schatz, G. H. (1987) Correlation of photosystem-II complexes with exoplasmatic freeze-fracture particles of thylakoids of the cyanobacterium *Synechococcus*, *Planta*, **1723**, 145-154.
- Calzadilla, P. I., Zhan, J., Sétif, P., Lemaire, C., Solymsi, D., et al. (2019) The cytochrome *b₆f* complex is not involved in cyanobacterial state transitions, *Plant Cell*, **31**, 911-931.
- Liu, H., Zhang, H., Niedzwiedzki, D. M., Prado, M., He, G., et al. (2013) Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria, *Science*, **342**, 1104-1107.
- Mullineaux, C. W. (1992) Excitation energy transfer from phycobilisomes to Photosystem I in a cyanobacterium, *Biochim. Biophys. Acta*, **1100**, 285-292.
- Stadnichuk, I. N., Bulychev, A. A., Lukashev, E. P., Sinetova, M. P., Khristin, M. S., et al. (2011) Far-red light-regulated efficient energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in the red microalga *Galdieria sulphuraria* and photosystems-related heterogeneity of phycobilisome population, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 227-235.
- Chukhutsina, V., Bersanini, L., Aro, E. M., and Van Amerongen, H. (2015) Cyanobacterial light-harvesting phycobilisomes uncouple from photosystem I during dark-to-light transitions, *Sci. Rep.*, **5**, 1-10.
- Schreiber, U., Klughammer, C., and Neubauer, C. (1988) Measuring P700 absorbance changes around 830 nm with a new type of pulse modulation system, *Z. Naturforsch.*, **43**, 686-698.
- Rögner, M., Mühlenhoff, U., Boekema, E. J., and Witt, H. (1990) Mono-, di- and trimeric PSI reaction center complexes isolated from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp.: size, shape and activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1015**, 415-424.
- Stadnichuk, I. N., Rakhimberdieva, M. G., Boichenko, V. A., Bolychevtseva, Y. V., Karapetyan, N. V., and Selyakh, I. O. (2000) Glucose-induced inhibition of the photosynthetic pigment apparatus in heterotrophically grown alga *Galdieria*, *Rus. J. Plant Physiol. Engl. Transl.*, **47**, 585-592.
- Acuña, A. M., Snellenburg, J. J., Gwizdala, M., Kirilovsky, D., van Grondelle, R., and van Stokkum, I. H. M. (2016) Resolving the contribution of the uncoupled phycobilisomes to cyanobacterial pulse-ampli-

- tude modulated (PAM) fluorometry signals, *Photosynth. Res.*, **127**, 91-102.
35. Campbell, D., Hurry, V., Clarke, A. K., Gustafsson, P., and Öquist, G. (1998) Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 667-683.
 36. Remelli, W., and Santabarbara, S. (2018) Excitation and emission wavelength dependence of fluorescence spectra in whole cells of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803: influence on the estimation of Photosystem II maximal quantum efficiency, *Biochim. Biophys. Acta*, **1859**, 1207-1222.
 37. Shubin, V. V., Murthy, S. D. S., Karapetyan, N. V., and Mohanty, P. (1991) Origin of the 77 K variable fluorescence at 758 nm in the cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1060**, 28-36.
 38. Matthijs, H. C. P., Jeanjean, R., Yermenko, N., Huisman, J., Joset, F., and Hellingwerf, K. J. (2002) Hypothesis: versatile function of ferredoxin-NADP⁺ reductase in cyanobacteria provides regulation for transient photosystem I-driven cyclic electron flow, *Funct. Plant Biol.*, **29**, 201-210.
 39. Alcantara-Sanchez, F., Leyva-Castillo, L. E., Lopez, C., de la Vara L. G., and Gómez-Lojero, C. (2017) Distribution of isoforms of ferredoxin-NADP⁺ reductase (FNR) in cyanobacteria in two growth conditions, *Intern. J. Biochem. Cell Biol.*, **85**, 123-134.
 40. Tian, L., Liu, Z., Wang, F., Shen, L., Chen, J., et al. (2017) Isolation and characterization of PSI-LHCI super-complex and their sub-complexes from a red alga *Cyanidioschyzon merolae*, *Photosynth. Res.*, **133**, 201-214.
 41. Glazer, A. N. (1989) The light guide. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna, *J. Biol. Chem.*, **264**, 1-4.
 42. El Bissati, K., Delphin, E., Murata, N., Etienn, A.-L., and Kirilovsky, D. (2000) Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: involvement of two different mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta*, **1457**, 229-242.
 43. Stadnichuk, I. N., Lukashov, E. P., and Elanskaya, I. V. (2009) Fluorescence changes accompanying short-term light adaptations in photosystem I and photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and phycobiliprotein-impaired mutants: state 1/state2 transitions and carotenoid-induced quenching of phycobilisomes, *Photosynth. Res.*, **99**, 227-241.
 44. Zlenko, D. V., Krasilnikov, P. M., and Stadnichuk, I. N. (2016) Structural modeling of the phycobilisome core and its association with the photosystems, *Photosynth. Res.*, **130**, 347-356.
 45. Krasilnikov, P. M., Zlenko, D. V., and Stadnichuk, I. N. (2020) Rates and pathways of energy migration from the phycobilisome to the photosystem II and to the orange carotenoid protein in cyanobacteria, *FEBS Lett.*, **594**, 1145-1154.
 46. Zlenko, D. V., Galochkina, T. V., Krasilnikov, P. M., and Stadnichuk, I. N. (2017) Coupled rows of PBS cores and PSII dimers in cyanobacteria: symmetry and structure, *Photosynth. Res.*, **133**, 245-260.
 47. Voloshina, O. V., Bolychevtseva, Y. V., Kuzminov, F. I., Gorbunov, M. Y., Elanskaya, I. V., and Fadeev, V. V. (2016) Photosystem II activity of wild type *Synechocystis* PCC 6803 and its mutants with different plastoquinone pool redox state, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 858-870.
 48. Karge, O., Bondar, A. N., and Dau, H. (2014) Cationic screening of charged surface groups (carboxylates) affects electron transfer steps in photosystem-II water oxidation and quinone reduction, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1625-1634.
 49. Piven, I., Ajlani, G., and Sokolenko, A. (2005) Phycobilisome linker proteins are phosphorylated in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *J. Biol. Chem.*, **280**, 21667-21672.
 50. Nelson, N., and Junge, W. (2015) Structure and energy transfer in photosystems of oxygenic photosynthesis, *Annu. Rev. Biochem.*, **84**, 659-683.
 51. Morsy, F. M., Nakajima, M., Yoshida, T., Fujiwara, T., Sakamoto, T., and Wada, K. (2008) Subcellular localization of ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase in phycobilisome retaining oxygenic photosynthetic organisms, *Photosynth. Res.*, **95**, 73-85.
 52. Vershubskii, A. V., Mishanin, V. I., and Tikhonov, A. N. (2014) Modeling of the Photosynthetic electron transport regulation in cyanobacteria, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.*, **8**, 262-278.

STATE 1 AND STATE 2 IN THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF RED MICROALGAE AND CYANOBACTERIA

Yu. V. Bolychevtseva^{1*}, I. V. Tropin², and I. N. Stadnichuk³

¹ *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; E-mail: bolychev1@yandex.ru*

² *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

³ *Timiryasev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, 127726 Moscow, Russia*

Light absorption of different intensity and quality by photosystem I (PSI) and photosystem II (PSII) gives rise to changes of intersystem electron transport diminishing the effectiveness of photosynthesis. In plants and green algae, this redox imbalance is loosened by molecular mechanism called State 1/State 2 transitions which trigger the movement of the light-harvesting LHCI antenna and change the fluorescence properties of the pigment apparatus. Contrary, in phycobilisome (PBS)-containing photosynthetics, cyanobacteria and red algae, the cause of State 1/State 2 transitions is not well understood. None of published hypothesis of spillover, of lateral reversible PBS migration from PSI to the PSII, and the PBS detachment from the surface of PSII do not explain completely the sum of fluorescence data. Here, we demonstrate the possibility of State 1/State 2 measurements using stationary fluorescence spectra at the room temperature that remove the existing contradictions. It was estimated that in State II the fluorescence of PSII dimers in thylakoids diminished reversibly while the fluorescence of PBS connected with the PSII stayed unchanged. The increase of PSI fluorescence in State I is due to the detachment of PBS from the surface of PSI monomers. The rate of fluorescence changes is regulated by the redox state of plastoquinone and ferredoxin pools together with the rate of linear and cyclic electron transport.

Keywords: State 1, State 2, fluorescence, photosystem I, photosystem II, phycobilisome(s), chlorophyll

УДК 543.94

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В РЕАКЦИЯХ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

Обзор

© 2021 Н.В. Зырина^{1,2}, В.Н. Антипова^{2*}

¹ Институт белка РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: valery_a@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.02.2021

После доработки 16.04.2021

Принята к публикации 16.04.2021

В обзоре рассматривается проблема образования неспецифических продуктов при использовании различных методов изотермической амплификации как результат действия целого ряда факторов: неспецифических взаимодействий праймеров, синтеза ДНК *ab initio* и проявления дополнительных активностей ДНК-полимераз. Обсуждаются разрабатываемые подходы для устранения неспецифического синтеза в методах LAMP, RPA, NASBA, RCA, SDA, LSDA, NDA и EXPAR.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: изотермическая амплификация, фоновый синтез, ДНК-полимеразы, LAMP, SDA, EXPAR.

DOI: 10.31857/S0320972521070101

ВВЕДЕНИЕ

Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот разрабатываются как альтернатива ПЦР, их применение особенно актуально при проведении диагностики непосредственно в местах оказания медицинской помощи [1–3]. С 2000-х годов некоторые методы поставлены на коммерческую основу, например, созданы наборы NUCLISENS («bioMérieux», Франция), Illustra TempliPhi™ («Cytiva», США), WarmStart® LAMP Kit («NEB», США) и LavaLAMP™ DNA Master Mix («Lucigen», США). В первую очередь изотермическая амплификация нашла практическое применение в обнаружении патогенных микроорганизмов и

вирусов в клинических образцах [4]. Все чаще она применяется при разработке новых стратегий оценки безопасности пищевых продуктов и мониторинга окружающей среды, при генотипировании и обнаружении некодирующих РНК, целевых белков, небольших молекул и ионов металлов, а также для конструирования нуклеиновых кислот с заданными наноструктурами, гидрогелей, наноматериалов и приборов [5, 6]. Все разнообразие методов изотермической амплификации исчерпывающе описано в работах, процитированных выше.

Тем не менее существует проблема, возникающая с «завидной» регулярностью и накладывающая ограничения на использование изотермической амплификации в качестве альтернативы ПЦР. Она заключается в появлении неспецифических продуктов реакции, критически препятствующих идентификации или синтезу специфических последовательностей в препаративных количествах. Наличие таких продуктов приводит к ложноположительным результатам, отрицательно влияет и на чувствительность метода, и на его специфичность, а также накладывает ограничение на максимальную длину синтезируемого фрагмента. Несмотря на актуальность обозначенной проблемы, ей не уделяется должного внимания. Работ, направленных именно на изучение явления неспецифического синтеза при использовании методов изотерми-

Принятые сокращения: EXPAR – экспоненциальная реакция амплификации нуклеиновых кислот (exponential amplification reaction); LAMP – петлевая изотермическая амплификация (loop-mediated isothermal amplification); NASBA – амплификация на основе последовательности нуклеиновой кислоты (nucleic acid sequence-based amplification); PNA – пептидная нуклеиновая кислота (peptide nucleic acid); RCA – амплификация по типу катящегося кольца (rolling circle amplification); SDA – амплификация с замещением цепи (strand displacement amplification); RPA – рекомбиназная полимеразная амплификация (recombinase polymerase amplification); SSB – белок, связывающий одноцепочечную ДНК (single-strand binding protein).

* Адресат для корреспонденции.

ческой амплификации, не так много. Как правило, в статьях, касающихся появления нового метода, о наличии фонового синтеза упоминается лишь поверхностно. В данном обзоре мы постарались обобщить данные исследований, посвященных проблеме появления неспецифических продуктов при использовании различных методов изотермической амплификации или акцентирующих внимание на разрабатываемых подходах для устранения этих продуктов.

Существует несколько основных причин возникновения неспецифических продуктов: образование комплементарными участками праймеров димеров и шпилек, способных к удлинению ДНК-полимеразой; взаимодействие праймеров с матрицей в неспецифических участках; дополнительные активности ДНК-полимераз, а также синтез ДНК *ab initio*.

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРАЙМЕРОВ

При использовании методов изотермической амплификации, перечисленных ниже, основной причиной образования неспецифических продуктов считают нежелательные взаимодействия комплементарных участков праймеров с образованием димеров и шпилек, способных к удлинению с участием ДНК-полимеразы, а также неспецифические взаимодействия праймеров с матрицей.

Метод петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) позволяет нарабатывать целевую последовательность двухцепочечной ДНК за счёт самопраймирования шпилечными структурами, которые образуются в ходе реакции [7]. Для этого конструируется набор праймеров: пара внешних (буферных) и пара внутренних. Внешние праймеры являются вспомогательными и служат для вытеснения цепей, синтезированных с внутренних праймеров, комплементарных целевым последовательностям. Внутренние праймеры конструируются так, чтобы при дальнейшем синтезе ДНК образовывались инвертированные повторы, замыкающиеся в шпилечные структуры (рис. 1). На каждом последующем этапе реакции собираются все более сложные тандемные шпилечные структуры, каждая из которых содержит копию целевой последовательности. В реакции используют ДНК-полимеразу Bst, которая обладает активностью замещения цепи и способна проходить шпилечные структуры без диссоциации от матрицы.

Несмотря на заверения авторов метода о незначительности неспецифической амплифи-

кации за счет стратегии праймирования и довольно высокой температуры реакции (60 °C), эта амплификация не исключается полностью; ее основной причиной считают образование димеров праймеров [8]. Первоначально обратный внутренний праймер формирует гомодимер. Достаивание полимеразой его 3'-конца приводит к образованию двухцепочечного продукта, содержащего фрагмент этого же праймера в обратной ориентации. 5'-Конец такого продукта в процессе спонтанной обратимой денатурации может гибридизоваться с 3'-концом прямого внутреннего праймера, образуя прерванную матрицу. На этой матрице ДНК-полимераза Bst ведет дальнейший синтез комплементарной цепи ДНК, используя, в свою очередь, денатурировавший 3'-конец обратного внутреннего праймера, синтезируя при этом последовательность, комплементарную прямому внутреннему праймеру. Дойдя до конца матрицы, ДНК-полимераза может далее наращивать длину цепи путем вытеснения последовательностей, использовавшихся в качестве матрицы на предыдущем этапе. Эти процессы приводят к образованию внутримолекулярных шпилек, служащих праймерами для дальнейшей амплификации. Независимо от последовательности матрицы полимеразы может добавлять от одного до нескольких нуклеотидов, что приводит к появлению пула шпилек, 3'-концы которых содержат некоторое количество случайных нуклеотидов. Последовательности с комплементарными 3'-концами селективно амплифицируются *in vitro*. Двухцепочечный продукт этой амплификации посредством внутримолекулярной водородной связи может образовывать структуру, подобную гантели, и амплифицироваться по стандартному механизму LAMP. Для улучшения аналитической специфичности анализа в реакции LAMP предложили исключить обнаружение продуктов неспецифической амплификации, детектируя только амплификацию мишени с помощью зондов, маяков, флуоресцентного (Фёрстеровского) резонансного переноса энергии (FRET) или схем «репортер-гаситель» [8]. Другой подход заключается в использовании оригинальной математической модели, позволяющей предсказывать размер, количество и специфичность искомым продуктам в зависимости от целевой ДНК, набора праймеров, а также условий реакции. Эта модель была разработана авторами на основе экспериментальных данных с использованием электрофореза на чипе, позволяющем оценить структуры, которые образуются в ходе реакции LAMP [9]. Еще один способ снижения количества неспецифических продуктов – внесение в реакцию пуллулана и других химических

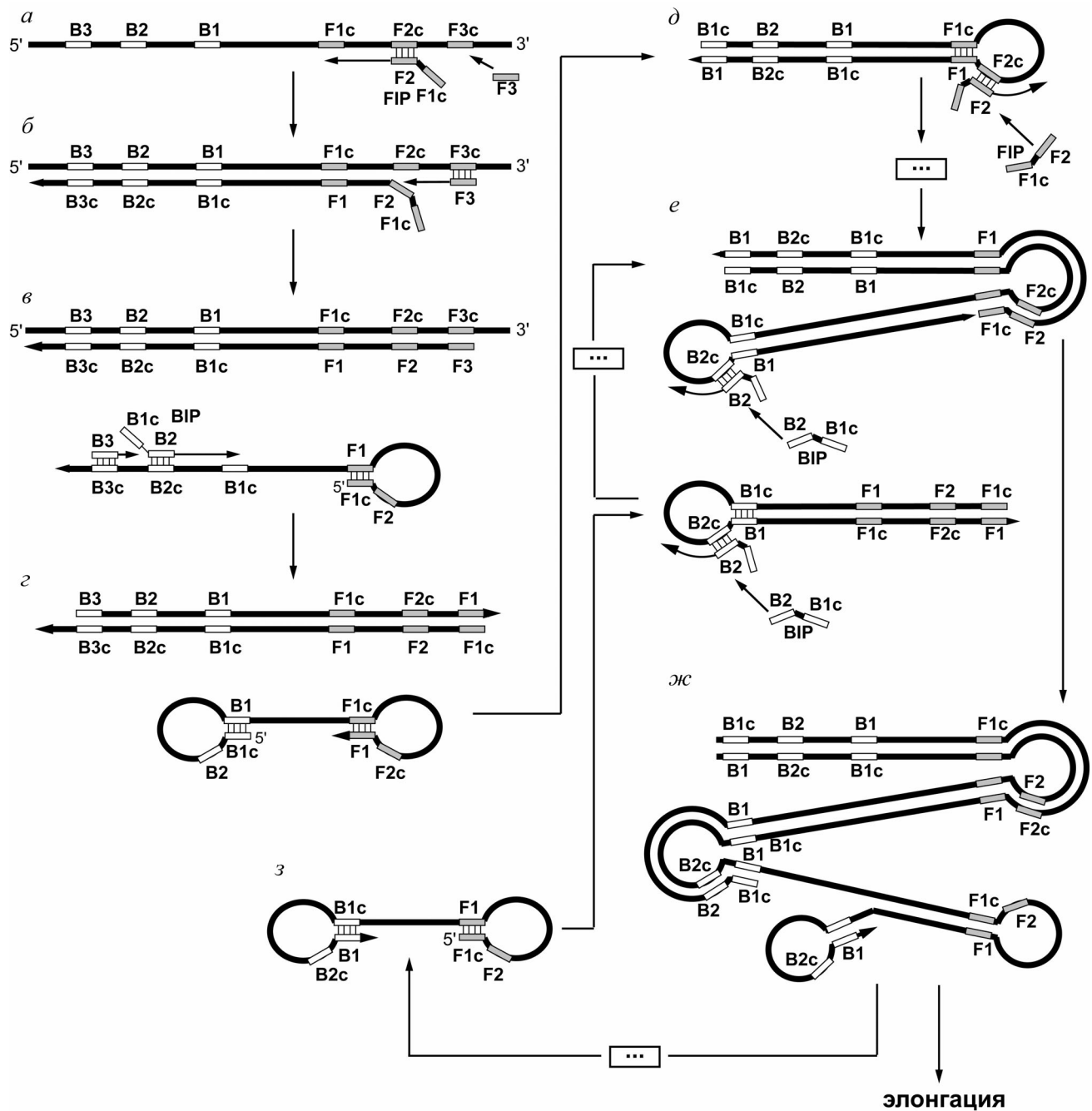


Рис. 1. Основные этапы петлевой изотермической амплификации: *a–г* – образование стартового продукта; *д–з* – циклический синтез и элонгация ДНК со шпильчными структурами. F2c и B2 – фланги, F1c и B1 – внутренние участки целевой (амплифицируемой) последовательности, F3c и B3 – «внешние» последовательности; FIP (forward inner primer) – прямой внутренний праймер с участками F1c и F2, VIP (backward inner primer) – обратный внутренний праймер с участками B1c и B2, F3 – внешний (буферный) прямой праймер, B3 – внешний (буферный) обратный праймер. Прямоугольниками обозначены комплементарные последовательности: серые – F1c и F1, F2c и F2, F3c и F3, белые – B1c и B1, B2c и B2, B3c и B3, где c – обозначение комплементарной цепи. Стрелки – направление синтеза, |||| – гибридизация, ... – промежуточные продукты. Начало процесса показано с праймера FIP; следует помнить, что синтез начинается и с праймера VIP. Предложено согласно работе Notomi et al. [7]

соединений, предположительно, стабилизирующих структуру праймеров и предотвращающих формирование их димеров в отсутствие целевой ДНК [10].

Рекомбиназная полимеразная амплификация (recombinase polymerase amplification, RPA) основана на использовании рекомбиназы, которая катализирует гибридизацию пары праймеров с

гомологичными последовательностями амплифицируемого участка матрицы с последующей элонгацией с помощью ДНК-полимеразы *Bsu*, обладающей свойством замещения цепи. Стабилизацию получаемых в процессе реакции промежуточных продуктов обеспечивает белок, связывающий одноцепочечную ДНК (single-stranded DNA binding protein, SSB) [11]. Появление неспецифических продуктов в данной реакции объясняют нежелательными взаимодействиями между праймерами при невысокой температуре процесса (37 °С). Для уменьшения этих взаимодействий предлагается использовать олигонуклеотид, содержащий тетрагидрофурановый миметик апурин-апиримидинового сайта (AP-сайта), фланкированный флуорофором и гасителем, а также 3'-конец, заблокированный дидеоксицитозином (ddC). Флуоресценция интактной конструкции находится на низком уровне, а блок на 3'-конец не позволяет олигонуклеотиду выступать в качестве праймера в реакции амплификации. После гибридизации олигонуклеотида с матричной ДНК эндонуклеаза IV *E. coli* узнает и расщепляет миметик AP-сайта, флуоресценция усиливается, образуется свободный 3'-конец на разрезанной цепи праймера, который удлиняется полимеразой. Значительно снизить образование димеров праймеров позволяет принцип самоисключающего молекулярного распознавания (self-avoiding molecular recognition systems, SAMRS) [12]. Праймеры не взаимодействуют друг с другом, а связываются исключительно с флангами целевой последовательности за счет замены естественных нуклеотидов в некоторых положениях на нуклеотидные аналоги. Для увеличения специфичности взаимодействия олигонуклеотидов и ДНК, было предложено использовать пептидные нуклеиновые кислоты (PNAs) [13], однако гибридизация PNA с целевой последовательностью требует отдельного этапа реакции. Для снижения вероятности неспецифической гибридизации праймеров особое внимание рекомендуется уделять их дизайну [14, 15]. Пакет PrimedRPA позволяет автоматизировать создание праймеров и наборов зондов [16]. Причиной неспецифической амплификации также может быть гибридизация праймеров с «фоновой» (тотальной) ДНК, присутствующей в реакции вместе с целевыми последовательностями, например, в образцах крови или окружающей среде [17]. С проблемой позволяет справиться метод «обогащения» реакции, основанный на связывании целевой ДНК с иммобилизованным олигонуклеотидом с последующим ее элюированием в реакционную смесь после удаления примесей.

Амплификация на основе последовательности нуклеиновой кислоты (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) разработана для амплификации РНК. ДНК можно амплифицировать этим способом в том случае, если она вступает в реакцию в одноцепочечной форме [18]. Экспоненциальная амплификация целевых последовательностей РНК происходит за счет сопряженных реакций обратной транскрипции, транскрипции интермедиатов кДНК и удаления РНКазой Н цепи РНК с кДНК. Несмотря на высокую специфичность реакции NASBA, проблема появления продуктов, приводящих к ложноположительным результатам, все же существует [19]. В качестве основной причины традиционно рассматривается неспецифическая гибридизация и димеризация праймеров [20]. Для ее устранения рекомендуется проводить оптимизацию условий реакции и тщательный расчет изменения свободной энергии Гиббса (ΔG) и температуры плавления (T_m) при конструировании праймеров, например, с помощью сетевого ресурса DINAMelt [21]. NASBA позволяет с высокой точностью выявлять целевую РНК в присутствии фоновой двухцепочечной ДНК [22]. Наличие большого количества фоновой РНК может мешать амплификации целевых последовательностей, но эта проблема устранима разведением исследуемого образца [23]. Проблема неспецифического синтеза в NASBA стоит наименее остро, что позволяет использовать эту реакцию для развития диагностических методов [24].

Амплификация по типу катящегося кольца (rolling circle amplification, RCA) осуществляется на ковалентно замкнутом олигонуклеотиде (зонде), гибридизованном с целевой последовательностью ДНК [25]. С участком зонда также гибридизуется другой олигонуклеотид, после чего ДНК-полимераза удлиняет его, проходя множество раз «по кольцу» зонда, синтезируя его тандемные копии, включающие в себя последовательность целевой ДНК.

В мультипраймерной RCA, или амплификации с множественным замещением цепи (multiple displacement amplification, MDA), с кольцевым олигонуклеотидом или с продуктами реакции гибридизуется несколько праймеров [25–27]. В реакциях используют ДНК-полимеразы phi29 или *Bst*, а также белок SSB gp32 фага T4 (T4 gp32). В одной из первых работ по данному методу было показано, что стандартная денатурация двухцепочечной матрицы ДНК приводила к ее деградации, после чего специфичность реакции снижалась, а большая часть продуктов представляла собой артефакт амплификации, не содержащий целевой последовательности [27]. Неспецифи-

ческие высокомолекулярные (более 10 тыс. п.н.) продукты амплификации геномной ДНК были обнаружены в контрольных образцах, куда добавляли олигонуклеотиды и дезоксинуклеотиды (dNTPs), но не добавляли матрицу [28]. Их образование объяснили самопраймированием с последующей амплификацией. Устранить нежелательную реакцию удалось с помощью введения в последовательности праймеров спейсера С3 (фосфорамидитного) или спейсера С18 (гексаэтиленгликоля) на некотором расстоянии от 5'-концов. Олигонуклеотиды с такими модификациями имели возможность гибридизоваться с целевыми последовательностями, но не могли служить матрицами в том случае, если произошло самопраймирование. С проблемой появления неспецифических высокомолекулярных продуктов в контрольных образцах, не содержащих матрицу, столкнулись и при проведении RCA с добавлением никующей эндонуклеазы (PG-RCA), но связали это с неспецифической полимеризацией субстратов ДНК-полимеразой [29]. Снижения уровня неспецифической амплификации удалось достичь оптимизацией условий реакции: уменьшением концентраций dNTPs и ДНК-полимеразы, подбором оптимальной концентрации хлорида магния. Изменение температуры реакции, добавление веществ, увеличивающих эффективность реакции, или наоборот, ингибиторов ДНК-полимеразы, на уровень неспецифического синтеза не влияли.

Продукты неспецифической амплификации в виде набора мультимеров (тандемно расположенных повторов последовательности исходной ДНК-матрицы), синтезируемые полимеразой Bst, оказалось невозможным отличить от продуктов реакции RCA, результатом которой также является набор ДНК кратной длины (конкатемеров), поскольку на электрофореграмме и те и другие проявляются в виде лестницы фрагментов [30]. Существенным условием для мультимеризации является наличие коротких (50–60 п.н.) ДНК-дуплексов, образующихся за счет удлинения праймера в гомо- и гетеродимерах или после отжига на матрице. Эффективность мультимеризации зависит от условий реакции: наибольшая наблюдается в буферах с высокой концентрацией соли в присутствии восстановителей (β -меркаптоэтанол) и при субоптимальной для ДНК-полимеразы температуре реакции. Формирования нежелательных мультимеров в реакциях с ДНК-полимеразой Bst можно избежать, используя краситель SYBR Green I. Образование мультимеров на линейной одноцепочечной матрице ДНК с одним праймером в изотермических условиях описали

Wang et al. [31]. Предложенный механизм включает следующие основные этапы: гибридизацию и удлинение праймера на олигонуклеотидной матрице, гибридизацию выступающего 3'-конца матрицы с участком продукта удлинения праймера «своего» же дуплекса за счет ошибочного спаривания, последующее связывание полимеразой этого комплекса и удлинение 3'-конца матрицы (рис. 2). Многократная инициация синтеза как праймерами, так и одноцепочечными продуктами реакции вызывает экспоненциальное накопление длинных мультимерных продуктов. Такая амплификация иницируется только способными к замещению цепи и обратной транскрипции ДНК-полимеразами Bst, Bsm и VcaBEST.

Для предотвращения мультимеризации ДНК было предложено использовать праймеры с модифицированными межнуклеотидными фосфатными группами [32]. Введение трех и более фосфорилгуанидиновых групп в центр праймеров предотвращало мультимеризацию и при этом не ингибировало специфическую амплификацию. Для общего подавления синтеза побочных продуктов использовали белок SSB *Thermus thermophilus* [33, 34].

Амплификации с замещением цепи (strand displacement amplification, SDA) основана на внесении эндонуклеазой рестрикции одноцепочечного разрыва (ника) в немодифицированную цепь целевой последовательности двухцепочечной ДНК и удлинении ДНК-полимеразой 3'-конца этого ника с вытеснением цепи исходного дуплекса в ходе синтеза новой цепи. Вытесненная цепь, в свою очередь, служит матрицей для синтеза комплементарной цепи [35].

Дальнейшее развитие методов SDA получил с открытием никующих эндонуклеаз (никаз). Эти ферменты узнают определенную последовательность, подобно эндонуклеазам рестрикции, но гидролизуют только одну из цепей. На основе никаз предложен целый ряд методов изотермической амплификации ДНК [36–40] (подробно в обзорной статье [41]). Наиболее распространен метод **экспоненциальной реакции амплификации нуклеиновых кислот (exponential amplification reaction, EXPAR)**, в котором амплифицируют олигонуклеотидные последовательности ДНК, используя термофильные ферменты – никазу Nt.BstNBI и ДНК-полимеразу Bst (рис. 3, а–г) [37].

Проблема синтеза побочных продуктов, интерферирующих с целевыми, стала ключевой уже с появления первых работ по данному методу [35, 42]. Их наличие объясняли неспецифическим связыванием праймеров с тотальной ДНК, присутствующей в образцах, или образо-

ванием димеров праймеров с последующей амплификацией в случае проведения реакции при невысокой температуре [42, 43]. Однако повышение температуры реакции и замена мезофильных ферментов *exo*-фрагмента Кленова и эндонуклеазы *HincII* термофильными эндонуклеазами рестрикции и ДНК-полимеразами с лучшей активностью вытеснения цепи и процессивностью не позволило полностью решить проблему [43, 44]. Изучены возможности устранения неспецифических взаимодействий путем оптимизации праймеров для реакций SDA [45]. Продукты, образующиеся в результате таких взаимодействий, выявляли на электрофореграмме в виде лестницы фрагментов. Секвенирование этих продуктов показало, что они образованы путем конкатемеризации праймера. Для решения этой проблемы с целью повышения точности гибридизации праймеров с целевой последовательностью был разработан компьютерный алгоритм.

В EXPAR неспецифический фоновый синтез отмечали на начальных этапах реакции (ранняя фаза) [46]. Было выдвинуто предположение, что полимераза связывается с одноцепочечной матрицей и полимеризует на ней dNTPs, не требуя праймера. Неспецифический синтез удавалось значительно снизить, прогревая реакционную

смесь перед внесением dNTPs и ДНК-полимеразы. Проблеме устранения фоновой амплификации на начальных этапах EXPAR посвящена также работа Raid et al. [47]. В качестве причины неспецифического синтеза в ней рассматривали возможность достраивания полимеразой 3'-концов матрицы, формирующихся в результате временных взаимодействий: внутримолекулярной гибридизации одной матрицы (формирование шпильки), межмолекулярной гибридизации 3'-конца одной матрицы с каким-либо участком другой матрицы EXPAR, взаимодействия нескольких участков одной матрицы с участками другой. Для решения этих проблем было предложено две стратегии: блокирование 3'-конца матрицы, например, с помощью пептидной нуклеиновой кислоты, и независимое от последовательности ослабление взаимодействий матрица–матрица. Добавление белка SSB *E. coli* для снижения взаимодействий матриц EXPAR приводило к снижению неспецифической амплификации на три порядка.

Еще одной причиной синтеза неспецифических продуктов в реакциях изотермической амплификации ДНК может быть неконтролируемая активность используемых нуклеаз [41]. Для регулирования активности предложили добавлять в реакционную смесь модуляторы актив-

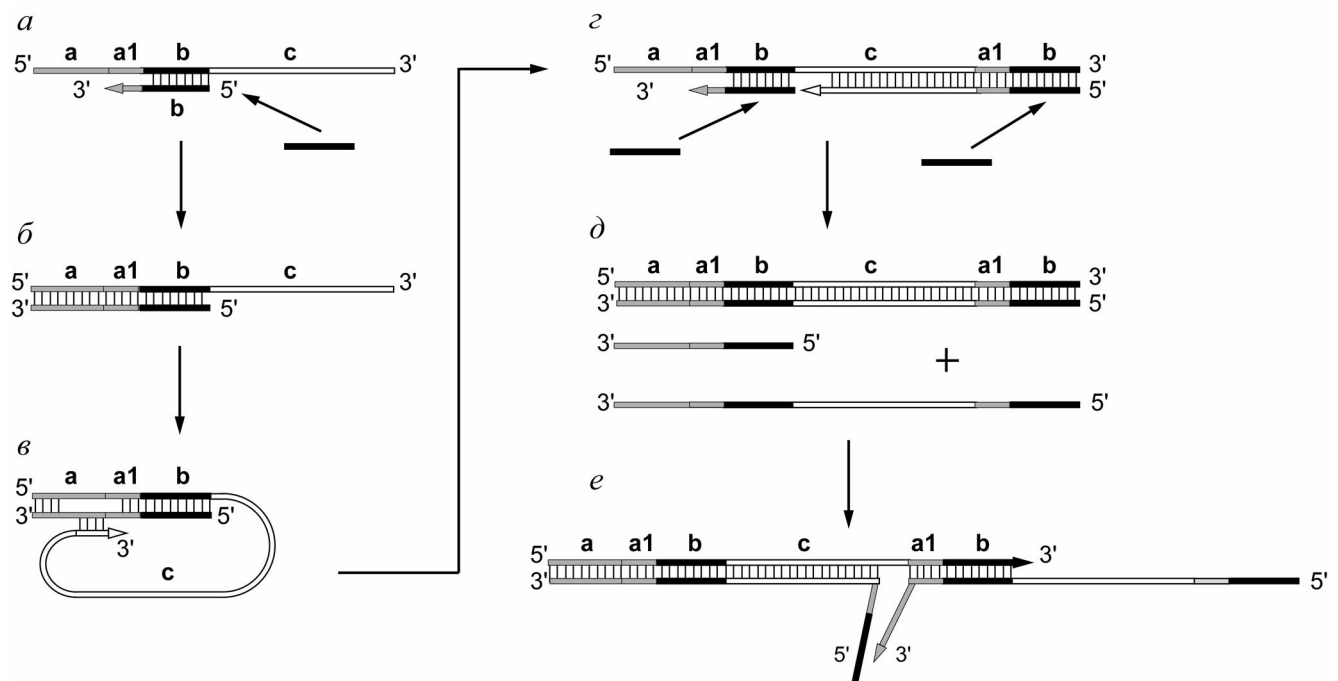


Рис. 2. Основные этапы образования мультимеров на линейной одноцепочечной матрице: *a, б* – гибридизация и удлинение праймера; *в* – ошибочное спаривание выступающего 3'-конца матрицы с удлиненным праймером в дуплексе и начало копирования цепи удлиненного праймера; *г, е* – образование мультимерных продуктов. *a, a1, b, c* – последовательности на матрице; одинаковые цвета обозначают комплементарные участки матрицы и праймера или продукта синтеза, стрелки – направление синтеза. Предложено согласно работе Wang et al. [31]

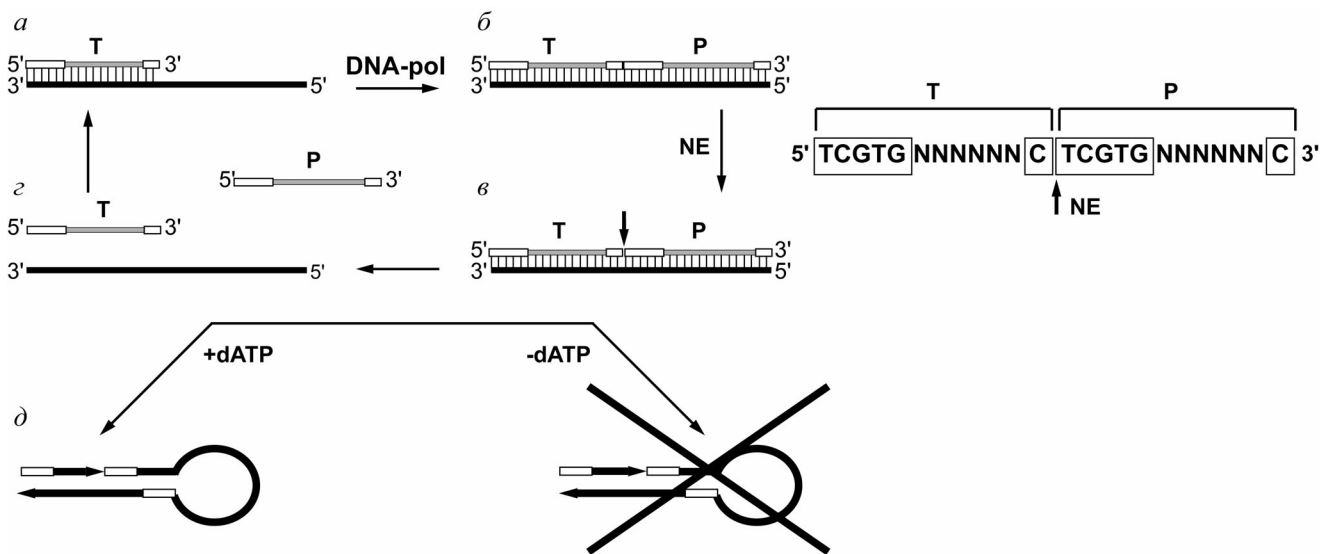


Рис. 3. Метод EXPAR, синтез целевого и неспецифических продуктов: *а* – гибридизация олигонуклеотида-триггера, содержащего часть последовательности сайта узнавания нуклеазы на матрице; *б* – удлинение триггера ДНК-полимеразой и образование полного сайта узнавания нуклеазы (в рамке) и олигонуклеотидного продукта; *в* – гидролиз сайта нуклеазы; *г* – диссоциация комплекса между триггером, продуктом и матрицей; *д* – побочная реакция образования неспецифических продуктов. Последовательность, синтезируемая на матрице, вынесена отдельно: Т – олигонуклеотид-триггер, Р – олигонуклеотид-продукт, в рамке – сайт узнавания нуклеазы, DNA-pol – ДНК-полимераза, NE – нуклеаза, N – любой нуклеотид. Предложено согласно работам Van Ness et al., Urtel et al. [37, 52]

ности нуклеазы – короткие (до 30 п.н.) синтетические дуплексы ДНК. При температуре 20 °С эти дуплексы образуют непродуктивный комплекс с ферментом и блокируют его активность. Повышение температуры до 40–50 °С вызывает диссоциацию комплекса нуклеазы и дуплекса-ингибитора, приводя к инициации гидролиза целевой ДНК. Однако авторы подхода не показали результат его практического применения в SDA, а именно устранение неспецифических продуктов реакции.

И, наконец, в качестве общей стратегии улучшения аналитической специфичности метода SDA было предложено использовать схемы, определяющие только специфическую амплификацию целевой последовательности [44, 48]. Среди множества методов, использующих эту стратегию, интересной представляется изотермическая амплификация, основанная на зависимой от матрицы элонгации (template-dependent extension based isothermal amplification, TEIA), поскольку при ее разработке максимально учитывали причины появления неспецифических продуктов [39].

СИНТЕЗ ДНК *ab initio*

Причиной появления побочных продуктов в реакциях изотермической амплификации мо-

жет выступать синтез ДНК *ab initio*, или безматричный синтез [29, 38, 46, 49–52]. Этот феномен представляет собой способность ДНК-полимераз синтезировать ДНК без добавления какой-либо ДНК или РНК в реакционную смесь [53]. Результатом синтеза является спектр продуктов от нескольких десятков до десятков тысяч п.н. Скорость синтеза ДНК *ab initio* значительно увеличивается при добавлении в реакционную смесь эндонуклеаз рестрикции и нуклеазы [54–56], а также праймазы или хеликазы [57, 58]. Синтез ДНК в отсутствие матрицы и праймера впервые был обнаружен Корнбергом и его коллегами [59]. Однако научная общественность скептически отнеслась к этим данным, считая, что синтез мог проходить за счет примесей ДНК или присутствующих в препаратах ДНК-полимераз других ферментов, способных иницировать непраймируемый синтез. Спустя 30 лет японские исследователи, работая с термофильными ДНК-полимеразами Tli и Tth, вновь открыли это явление [60, 61]. Для освобождения от возможных примесей они использовали высокоочищенные реактивы и полимеразы, обрабатывали ДНКазой I и РНКазой A белки, участвующие в реакции, денатурировали с последующей ренатурацией ДНК-полимеразы, дополнительно очищали dNTPs и др. Все эти обработки не снижали способности ДНК-полимеразы вести синтез *ab initio*. Интересно, что механизм иници-

циации синтеза *ab initio* до сих пор не известен. Предполагают, что первые олигонуклеотиды синтезируются самой ДНК-полимеразой непосредственно из dNTPs [53]. Из олигонуклеотидов с различными последовательностями дальнейшей амплификации подвергаются палиндромные последовательности, т.к. они могут образовывать шпильки на 3'-концах молекулы при частичном «плавлении» концов и выступать в качестве праймеров в синтезе ДНК. Этот процесс может происходить непрерывно, причем шпильчатая структура может возникнуть и инициировать элонгацию цепи даже за счет ошибочного спаривания нуклеотидов на 3'-конце олигонуклеотида.

Изучена возможность ингибирования синтеза *ab initio* ДНК-полимеразой Bst в присутствии никазы Nt.BspD6I при добавлении в реакционную смесь белков T4 gp32 и SSB *E. coli* [49]. Оказалось, что эти два функционально сходных белка имеют различное влияние на синтез *ab initio*: T4 gp32 полностью его ингибирует, а SSB *E. coli* – нет. Эффект объяснили различной пространственной организацией формируемых комплексов этих белков с одноцепочечной ДНК. С другой стороны, T4 gp32 и SSB *E. coli* успешно применяли в реакциях NDA (никаза-зависимая изотермическая ДНК-амплификация, nickase-dependent isothermal DNA amplification) и LSDA (амплификация с замещением цепи в «линейном» режиме, linear strand displacement amplification) для подавления неспецифического синтеза, в том числе и вызванного синтезом *ab initio* [38, 50]. Вероятнее всего, в реакции LSDA белок SSB *E. coli* функционировал в комбинации с очень точной и процессивной секвеназой 2.0 (модифицированная T7 ДНК-полимераза) и никазой Nt.BspQI, узнающей 7-звенную последовательность в ДНК. Применение такой комбинации позволило решить проблему ограничения длины и получить целевые дискретные продукты реакции размером до нескольких тысяч п.н. [38]. Появление неспецифических продуктов синтеза ДНК *ab initio* в поздней фазе амплификации EXPAR предложили попросту игнорировать, поскольку синтез целевых олигонуклеотидных продуктов происходит в течение 10 мин, тогда как максимальное количество продуктов безматричного синтеза образуется в течение 0,5–1 ч [46]. Urtel et al. увидели решение проблемы в проведении реакции без dATP в смеси при использовании никаз Nb.BssSI, Nt.BsmAI и Nt.BspQI, имеющих сайты узнавания, содержащие последовательности из только трех нуклеотидов (dC, dG, dT) в «верхней» цепи (рис. 3) [52]. Для реакции конструировали олигонуклеотид-триггер только из dC, dG и dT и

матрицу, содержащую лишь dC, dG и dA в своей последовательности. В отсутствие dATP изотермическая амплификация с матрицы протекала эффективно, тогда как синтез *ab initio* был ингибирован. Ингибирование происходило за счет затруднения синтеза неспецифических продуктов со шпильчатыми структурами, а также за счет невозможности расщепления неспецифических продуктов никазой (отсутствие сайта никазы в их последовательности).

ОСОБЕННОСТИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ

При обсуждении образования неспецифических продуктов амплификации отмечается важная роль используемых ДНК-полимераз, поскольку каждая обладает своим собственным набором каталитических и других функциональных активностей. Синтез неспецифических продуктов объясняют проявлением дополнительных активностей определенной ДНК-полимеразы, используемой в методе. ДНК-полимеразы, помимо основных свойств (полимеразной и экзонуклеазной активностей), могут дополнительно обладать активностями обратной транскриптазы (RT) и терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TdT) [62]. Примерами полимераз, обладающих этими двумя активностями, могут служить фрагмент Кленова полимеразы I *E. coli* и ДНК-полимераза Bst [63]. Недавно было продемонстрировано, что и ДНК-полимераза phi29 обладает ограниченной активностью обратной транскриптазы [64]. Эта полимеразы амплифицировала кольцевые ДНК-матрицы с небольшим количеством «рассеянных» по последовательности рибонуклеозидтрифосфатов (rNTPs) в реакциях RCA с такой же эффективностью, как и обычные. Однако в случае увеличения количества rNTPs в последовательности ДНК-матрицы выход продукта реакции заметно снижался. Добавление полимеразой одного или более нуклеотидов (как правило, dATP) на «тупые» 3'-концы ДНК-дуплекса за счет активности TdT независимо от матрицы вызывает нежелательное образование выступающих концов и может инициировать появление неспецифических продуктов. Возможность перехода с одной матрицы на другую и образования нового более длинного продукта за счет активности TdT показана в экспериментах с фрагментом Кленова [65]. В недавнем исследовании Que et al. использовали TdT для синтеза длинной последовательности поли-А на 3'-конце детектируемой ДНК. В свою оче-

редь, эта последовательность поли-А выполняла роль праймера в реакции RCA [66]. Активностью RT, т.е. способностью использовать РНК в качестве матрицы для синтеза ДНК, и условиями, в которых она проявляется, часто пренебрегают. Эта активность может служить причиной неспецифического синтеза ДНК с примесной экзогенной РНК и снижения точности полимеразы. В итоге одновременное наличие активности TdT, RT, способности выполнять синтез *ab initio*, а также отсутствие 5'→3' и 3'→5' экзонуклеазной активности позволяет некоторым ДНК-полимеразам, в частности Bst, инициировать реакции образования неспецифических продуктов [31, 53].

Необходимыми, в первую очередь для изотермической амплификации, функциональными свойствами ДНК-полимераз являются процессивность и способность к вытеснению цепи, однако именно эти активности позволяют полимеразам успешно амплифицировать и нежелательные конструкции. Источником проблем амплификации может выступать конфликт функциональных свойств ДНК-полимеразы [62]. Например, 3'→5' экзонуклеазная активность повышает точность амплификации, однако может приводить к снижению выходу продукта и деградации праймеров. Полимеразы, которые позволяют получать высокий выход продукта, имеют меньшую точность, что приводит к появлению большего числа неканонических пар нуклеотидов в целевом продукте. Разрабатывая или адаптируя метод изотермической амплификации для конкретной задачи и выбирая при этом ДНК-полимеразу, необходимо учитывать подобные факты.

Заслуживает внимания и давно известная проблема образования неспецифических продуктов на ДНК-матрицах, содержащих тракты (A)_n, прямые или инвертированные повторы, в т.ч. палиндромные или квазипалиндромные последовательности, формирующие альтернативные структуры ДНК [67]. Показано, как ДНК-полимеразы с лучшей процессивностью успешно преодолевают такие структуры, а другие, менее процессивные, диссоциируют от матрицы и образуют укороченные продукты реакции [68, 69]. Тем не менее проблема «сложных» матриц остается актуальной и для высокопроцессивных ДНК-полимераз. Очевидно, что помимо выбора ДНК-полимераз с лучшей процессивностью и более высокой способностью к замещению цепи, избавиться от нежелательных продуктов реакции в значительной степени позволяет оптимизация условий реакции, в т.ч. повышение температуры и применение белков SSB. Так или иначе, необходимо из-

бегать ситуаций, в которых функционирование ДНК-полимеразы может быть некорректным и выражаться в проявлении дополнительных активностей в большей степени, в ущерб основным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изотермические методы амплификации имеют большой потенциал для проведения анализов в местах оказания медицинской помощи или в «полевых» условиях, поскольку не требуют сложного оборудования и высокой квалификации персонала. Для успешного внедрения изотермической амплификации в широкую практику проблема синтеза неспецифических продуктов требует особого осмысления и отдельного изучения для каждого метода. Суммируя рассмотренные данные, можно предположить, что сам механизм того или иного метода изотермической амплификации нуклеиновых кислот наряду с условиями реакции может диктовать основную причину неспецифической амплификации. Возникновение неспецифических продуктов обуславливается совокупностью целого ряда причин. В их числе можно рассматривать все комбинации нежелательных взаимодействий праймеров, способствующих дальнейшей амплификации (образование димеров праймеров и шпилечных структур), а также неспецифическую гибридизацию праймера с матрицей или тотальной ДНК, присутствующей в образце. Появление сильного фона, мешающего различить целевую последовательность, можно объяснить неканоническим синтезом ДНК *ab initio*, а также способностью ДНК-полимеразы за счет своих дополнительных активностей инициировать «артефактный» синтез на матрице.

На пути к улучшению изотермических систем амплификации, в частности, устранению неспецифических продуктов реакции, исследователи двигаются в разных направлениях, но одним из самых перспективных является работа с ДНК-полимеразой. Корректировать работу ДНК-полимераз можно путем оптимизации условий их функционирования в ходе реакции (варьирование количества и набора dNTPs, ионной силы раствора, рН), а также изучения их функционирования в условиях макромолекулярного краудинга (т.е. в условиях повышенной концентрации молекул и уменьшения степеней свободы диффузии молекул белков от ДНК) [62, 70–72]. Поиск новых природных ДНК-полимераз и улучшение их активностей генно-инженерными методами даст возможность более

гибко подбирать условия проведения реакции [73]. Получение ДНК-полимераз с повышенной термостабильностью позволяет повышать температуру реакции для более точной гибридизации праймеров [74]. Использование полимераз с повышенным сродством к ДНК, возможно, будет способствовать снижению количества неспецифических продуктов [75]. Также в решении проблемы неспецифического синтеза в реакциях изотермической амплификации может помочь устранение способности ферментов к обратной транскрипции и повышение точности

ДНК-полимераз с функцией замещения цепи [31].

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00845-20-01.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Craw, P., and Balachandran, W. (2012) Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review, *Lab Chip*, **12**, 2469-2486, doi: 10.1039/c2lc40100b.
- Gill, P., and Ghaemi, A. (2008) Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **27**, 224-243, doi: 10.1080/15257770701845204.
- Niemz, A., Ferguson, T. M., and Boyle, D. S. (2011) Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases, *Trends Biotechnol.*, **29**, 240-250, doi: 10.1016/j.tibtech.2011.01.007.
- Obande, G. A., and Banga Singh, K. K. (2020) Current and future perspectives on isothermal nucleic acid amplification technologies for diagnosing infections, *Infect. Drug Resist.*, **13**, 455-483, doi: 10.2147/IDR.S217571.
- 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.
- Bodulev, O. L., and Sakharov, I. Y. (2020) Isothermal nucleic acid amplification techniques and their use in bioanalysis, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 147-166, doi: 10.1134/S0006297920020030.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., et al. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Res.*, **28**, E63, doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
- Rolando, J. C., Jue, E., Barlow, J. T., and Ismagilov, R. F. (2020) Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification, *Nucleic Acids Res.*, **48**, e42-e42, doi: 10.1093/nar/gkaa099.
- Schneider, L., Blakely, H., and Tripathi, A. (2019) Mathematical model to reduce loop mediated isothermal amplification (LAMP) false-positive diagnosis, *Electrophoresis*, **40**, 2706-2717, doi: 10.1002/elps.201900167.
- 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.
- Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L., and Armes, N. A. (2006) DNA detection using recombination proteins, *PLoS Biol.*, **4**, e204, doi: 10.1371/journal.pbio.0040204.
- Sharma, N., Hoshika, S., Hutter, D., Bradley, K. M., and Benner, S. A. (2014) Recombinase-based isothermal amplification of nucleic acids with self-avoiding molecular recognition systems (SAMRS), *ChemBioChem*, **15**, 2268-2274, doi: 10.1002/cbic.201402250.
- 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.
- 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.
- James, A., and Macdonald, J. (2015) Recombinase polymerase amplification: Emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **15**, 1475-1489, doi: 10.1586/14737159.2015.1090877.
- Higgins, M., Ravenhall, M., Ward, D., Phelan, J., Ibrahim, A., et al. (2018) PrimedRPA: primer design for recombinase polymerase amplification assays, *Bioinformatics*, **35**, 682-684, doi: 10.1093/bioinformatics/bty701.
- Rohrman, B., and Richards-Kortum, R. (2015) Inhibition of recombinase polymerase amplification by background DNA: a lateral flow-based method for enriching target DNA, *Anal. Chem.*, **87**, 1963-1967, doi: 10.1021/ac504365v.
- 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., et al. (1991) NASBA™ isothermal enzymatic *in vitro* nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection, *J. Virol. Methods*, **35**, 273-286, doi: 10.1016/0166-0934(91)90069-C.
- Morabito, K., Wiske, C., and Tripathi, C. W. A. (2013) Engineering insights for multiplexed real-time nucleic acid sequence-based amplification (NASBA): implications for design of point-of-care diagnostics, *Mol. Diagn. Ther.*, **17**, 185-192, doi: 10.1007/s40291-013-0029-4.
- Markham, N. R., and Zuker, M. (2005) DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction, *Nucleic Acids Res.*, **33**, W577-W581, doi: 10.1093/nar/gki591.
- Heim, A., Grumbach, I. M., Zeuke, S., and Top, B. (1998) Highly sensitive detection of gene expression of an intronless gene: amplification of mRNA, but not genomic DNA by nucleic acid sequence based amplification (NASBA), *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2250-2251, doi: 10.1093/nar/26.9.2250.
- Polstra, A. M., Goudsmit, J., and Cornelissen, M. (2002) Development of real-time NASBA assays with molecular beacon detection to quantify mRNA coding for HHV-8 lytic and latent genes, *BMC Infect. Dis.*, **2**, 18, doi: 10.1186/1471-2334-2-18.
- 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.
- Lizardi, P. M., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D. C., and Ward, D. C. (1998) Mutation detec-

- tion and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification, *Nat. Genet.*, **19**, 225-232, doi: 10.1038/898.
26. Dean, F. B., Nelson, J. R., Giesler, T. L., and Lasken, R. S. (2001) Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification, *Genome Res.*, **11**, 1095-1099, doi: 10.1101/gr.180501.
 27. Dean, F. B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Faruqi, A. F., et al. (2002) Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5261, doi: 10.1073/pnas.082089499.
 28. Brukner, I., Paquin, B., Belouchi, M., Labuda, D., and Krajcinovic, M. (2005) Self-priming arrest by modified random oligonucleotides facilitates the quality control of whole genome amplification, *Anal. Biochem.*, **339**, 345-347, doi: 10.1016/j.ab.2005.01.005.
 29. Murakami, T., Sumaoka, J., and Komiyama, M. (2008) Sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by primer generation – rolling circle amplification, *Nucleic Acids Res.*, **37**, e19-e19, doi: 10.1093/nar/gkn1014.
 30. Garafutdinov, R. R., Gilvanov, A. R., and Sakhabutdinova, A. R. (2020) The influence of reaction conditions on DNA multimerization during isothermal amplification with Bst exo- DNA polymerase, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **190**, 758-771, doi: 10.1007/s12010-019-03127-6.
 31. Wang, G., Ding, X., Hu, J., Wu, W., Sun, J., and Mu, Y. (2017) Unusual isothermal multimerization and amplification by the strand-displacing DNA polymerases with reverse transcription activities, *Sci. Rep.*, **7**, 017-13324, doi: 10.1038/s41598-017-13324-0.
 32. Garafutdinov, R. R., Sakhabutdinova, A. R., Kupryushkin, M. S., and Pyshnyi, D. V. (2020) Prevention of DNA multimerization using phosphoryl guanidine primers during isothermal amplification with Bst exo-DNA polymerase, *Biochimie*, **168**, 259-267, doi: 10.1016/j.biochi.2019.11.013.
 33. Inoue, J., Shigemori, Y., and Mikawa, T. (2006) Improvements of rolling circle amplification (RCA) efficiency and accuracy using *Thermus thermophilus* SSB mutant protein, *Nucleic Acids Res.*, **34**, e69-e69, doi: 10.1093/nar/gkl350.
 34. Mikawa, T., Inoue, J., and Shigemori, Y. (2009) Single-stranded DNA binding protein facilitates specific enrichment of circular DNA molecules using rolling circle amplification, *Anal. Biochem.*, **391**, 81-84, doi: 10.1016/j.ab.2009.05.013.
 35. Walker, G. T., Little, M. C., Nadeau, J. G., and Shank, D. D. (1992) Isothermal *in vitro* amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 392-396, doi: 10.1073/pnas.89.1.392.
 36. Chan, S.-H., Zhu, Z., Van Etten, J. L., and Xu, S.-Y. (2004) Cloning of CviPII nicking and modification system from *Chlorella virus NY5-1* and application of Nt. CviPII in random DNA amplification, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 6187-6199, doi: 10.1093/nar/gkh958.
 37. 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, doi: 10.1073/pnas.0730811100.
 38. Joneja, A., and Huang, X. (2011) Linear nicking endonuclease-mediated strand-displacement DNA amplification, *Anal. Biochem.*, **414**, 58-69, doi: 10.1016/j.ab.2011.02.025.
 39. Zhou, H., Xie, S.-J., Zhang, S.-B., Shen, G.-L., Yu, R.-Q., and Wu, Z.-S. (2013) Isothermal amplification system based on template-dependent extension, *Chem. Commun.*, **49**, 2448-2450, doi: 10.1039/c3cc38358j.
 40. Shi, C., Liu, Q., Zhou, M., Zhao, H., Yang, T., and Ma, C. (2016) Nicking endonuclease-mediated isothermal exponential amplification for double-stranded DNA detection, *Sens. Actuat. B. Chem.*, **222**, 221-225, doi: 10.1016/j.snb.2015.08.060.
 41. Абросимова Л. А., Кисиль О. В., Романова Е. А., Орецкая Т. С., Кубарева Е. А. (2019) Никующие эндонуклеазы как уникальные инструменты в биотехнологии и генетической инженерии, *Биоорганическая химия*, **445**, 451-471, doi: 10.1134/S0132342319050014.
 42. 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.
 43. Spargo, C. A., Fraiser, M. S., Van Cleve, M., Wright, D. J., Nycz, C. M., et al. (1996) Detection of *M. tuberculosis* DNA using thermophilic strand displacement amplification, *Mol. Cell. Probes*, **10**, 247-256, doi: 10.1006/mcpr.1996.0034.
 44. Nadeau, J. G., Pitner, J. B., Linn, C. P., Schram, J. L., Dean, C. H., and Nycz, C. M. (1999) Real-time, sequence-specific detection of nucleic acids during strand displacement amplification, *Anal. Biochem.*, **276**, 177-187, doi: 10.1006/abio.1999.4350.
 45. Ehses, S., Ackermann, J., and McCaskill, J. S. (2005) Optimization and design of oligonucleotide setup for strand displacement amplification, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **63**, 170-186, doi: 10.1016/j.jbbm.2005.04.005.
 46. Tan, E., Erwin, B., Dames, S., Ferguson, T., Buechel, M., et al. (2008) Specific versus nonspecific isothermal DNA amplification through thermophilic polymerase and nicking enzyme activities, *Biochemistry*, **47**, 9987-9999, doi: 10.1021/bi800746p.
 47. Reid, M. S., Paliwoda, R. E., Zhang, H., and Le, X. C. (2018) Reduction of background generated from template-template hybridizations in the exponential amplification reaction, *Anal. Chem.*, **90**, 11033-11039, doi: 10.1021/acs.analchem.8b02788.
 48. Little, M. C., Andrews, J., Moore, R., Bustos, S., Jones, L., et al. (1999) Strand displacement amplification and homogeneous real-time detection incorporated in a second-generation DNA probe system, BDPProbeTecET, *Clin. Chem.*, **45**, 777-784, doi: 10.1093/clinchem/45.6.777.
 49. Зырина Н. В., Артюх Р. И., Свальбина И. В., Железная Л. А., Матвиенко Н. И. (2012) Влияние белков, связывающихся с одноцепочечной ДНК, на безматричный/беспраймерный синтез ДНК в присутствии никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I, *Биоорганическая химия*, **38**, 199-205, doi: 10.1134/S1068162012020161.
 50. He, Y., and Jiang, T. (2013) Nickase-dependent isothermal DNA amplification, *Adv. Biosci. Biotechnol.*, **4**, 539-542, doi: 10.4236/abb.2013.44070.
 51. Menova, P., Raindlova, V., and Hocek, M. (2013) Scope and limitations of the nicking enzyme amplification reaction for the synthesis of base-modified oligonucleotides and primers for PCR, *Bioconj. Chem.*, **24**, 1081-1093, doi: 10.1021/bc400149q.
 52. Urtel, G., Van Der Hofstadt, M., Galas, J.-C., and Estevez-Torres, A. (2019) rEXPAR: an isothermal amplification scheme that is robust to autocatalytic parasites, *Biochemistry*, **58**, 2675-2681, doi: 10.1021/acs.biochem.9b00063.
 53. Zyrina, N. V., Antipova, V. N., and Zheleznyaya, L. A. (2014) *Ab initio* synthesis by DNA polymerases, *FEMS Microbiol. Lett.*, **351**, 1-6, doi: 10.1111/1574-6968.12326.
 54. Liang, X., Jensen, K., and Frank-Kamenetskii, M. D. (2004) Very efficient template/primer-independent DNA synthesis by thermophilic DNA polymerase in the presence of a thermophilic restriction endonuclease, *Biochemistry*, **43**, 13459-13466, doi: 10.1021/bi0489614.

55. Zyrina, N. V., Zheleznyaya, L. A., Dvoretzky, E. V., Vasiliev, V. D., Chernov, A., and Matvienko, N. I. (2007) N.BspD6I DNA nickase strongly stimulates template-independent synthesis of non-palindromic repetitive DNA by Bst DNA polymerase, *Biol. Chem.*, **388**, 367-372, doi: 10.1515/BC.2007.043.
56. Antipova, V. N., Zheleznyaya, L. A., and Zyrina, N. V. (2014) *Ab initio* DNA synthesis by Bst polymerase in the presence of nicking endonucleases Nt.AlwI, Nb.BbvCI, and Nb.BsmI, *FEMS Microbiol. Lett.*, **357**, 144-150, doi: 10.1111/1574-6968.12511.
57. Kaboev, O. K., and Luchkina, L. A. (2004) Template-free primer-independent DNA synthesis by bacterial DNA polymerases I using the DnaB protein from *Escherichia coli*, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **398**, 265-267, doi: 10.1023/b:dobi.0000046633.66624.58.
58. Beguin, P., Gill, S., Charpin, N., and Forterre, P. (2015) Synergistic template-free synthesis of dsDNA by *Thermococcus nautili* primase PolpTN2, DNA polymerase PolB, and pTN2 helicase, *Extremophiles*, **19**, 69-76, doi: 10.1007/s00792-014-0706-1.
59. Schachman, H. K., Adler, J., Radding, C. M., Lehman, I. R., and Kornberg, A. (1960) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. VII. Synthesis of a polymer of deoxyadenylate and deoxythymidylate, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3242-3249.
60. Ogata, N., and Miura, T. (1997) Genetic information "created" by archaeobacterial DNA polymerase, *Biochem. J.*, **324 (Pt 2)**, 667-671, doi: 10.1042/bj3240667.
61. Ogata, N., and Miura, T. (1998) Creation of genetic information by DNA polymerase of the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*, *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4657-4661, doi: 10.1093/nar/26.20.4657.
62. Pavlov, A. R., Pavlova, N. V., Kozyavkin, S. A., and Slesarev, A. I. (2004) Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications, *Trends Biotechnol.*, **22**, 253-260, doi: 10.1016/j.tibtech.2004.02.011.
63. Shi, C., Shen, X., Niu, S., and Ma, C. (2015) Innate reverse transcriptase activity of DNA polymerase for isothermal RNA direct detection, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 13804-13806, doi: 10.1021/jacs.5b08144.
64. Krzywkowski, T., Kühnemund, M., Wu, D., and Nilsson, M. (2018) Limited reverse transcriptase activity of phi29 DNA polymerase, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 3625-3632, doi: 10.1093/nar/gky190.
65. Garcia, P. B., Robledo, N. L., and Islas, A. L. (2004) Analysis of non-template-directed nucleotide addition and template switching by DNA polymerase, *Biochemistry*, **43**, 16515-16524, doi: 10.1021/bi0491853.
66. Que, H., Yan, X., Guo, B., Ma, H., Wang, T., et al. (2019) Terminal deoxynucleotidyl transferase and rolling circle amplification induced G-triplex formation: a label-free fluorescent strategy for DNA methyltransferase activity assay, *Sens. Actuat. B Chem.*, **291**, 394-400, doi: 10.1016/j.snb.2019.04.091.
67. Sinden, R. R., Potaman, V. N., Oussatcheva, E. A., Pearson, C. E., Lyubchenko, Y. L., and Shlyakhtenko, L. S. (2002) Triplet repeat DNA structures and human genetic disease: dynamic mutations from dynamic DNA, *J. Biosci.*, **27**, 53-65, doi: 10.1007/BF02703683.
68. Canceill, D., Viguera, E., and Ehrlich, S. D. (1999) Replication slippage of different DNA polymerases is inversely related to their strand displacement efficiency, *J. Biol. Chem.*, **274**, 27481-27490, doi: 10.1074/jbc.274.39.27481.
69. Viguera, E., Canceill, D., and Ehrlich, S. D. (2001) Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation, *EMBO J.*, **20**, 2587-2595, doi: 10.1093/emboj/20.10.2587.
70. Akabayov, B., Akabayov, S. R., Lee, S. J., Wagner, G., and Richardson, C. C. (2013) Impact of macromolecular crowding on DNA replication, *Nat. Commun.*, **4**, 1615, doi: 10.1038/ncomms2620.
71. Tong, Y., Lemieux, B., and Kong, H. (2011) Multiple strategies to improve sensitivity, speed and robustness of isothermal nucleic acid amplification for rapid pathogen detection, *BMC Biotechnol.*, **11**, 1472-6750, doi: 10.1186/1472-6750-11-50.
72. Garafutdinov, R. R., Gilvanov, A. R., Kupova, O. Y., and Sakhabutdinova, A. R. (2020) Effect of metal ions on isothermal amplification with Bst exo-DNA polymerase, *Int. J. Biol. Macromol.*, **161**, 1447-1455, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.028.
73. Piotrowski, Y., Gurung, M. K., and Larsen, A. N. (2019) Characterization and engineering of a DNA polymerase reveals a single amino-acid substitution in the fingers subdomain to increase strand-displacement activity of A-family prokaryotic DNA polymerases, *BMC Mol. Cell. Biol.*, **20**, 31, doi: 10.1186/s12860-019-0216-1.
74. Milligan, J. N., Shroff, R., Garry, D. J., and Ellington, A. D. (2018) Evolution of a thermophilic strand-displacing polymerase using high-temperature isothermal compartmentalized self-replication, *Biochemistry*, **57**, 4607-4619, doi: 10.1021/acs.biochem.8b00200.
75. Oscorbin, I. P., Belousova, E. A., Boyarskikh, U. A., Zakabunin, A. I., Khrapov, E. A., and Filipenko, M. L. (2017) Derivatives of Bst-like Gss-polymerase with improved processivity and inhibitor tolerance, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 9595-9610, doi: 10.1093/nar/gkx645.

NONSPECIFIC SYNTHESIS IN THE REACTIONS OF ISOTHERMAL NUCLEIC ACID AMPLIFICATION

Review

N. V. Zyrina^{1,2} and V. N. Antipova^{2*}

¹ *Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia*

² *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: valery_a@rambler.ru*

The review focuses on the main causes of nonspecific products synthesis in the course of isothermal nucleic acid amplification as a result of wide range of factors: mispriming with a subsequent amplification, *ab initio* DNA synthesis and additional activities of DNA polymerases. The approaches being developed to eliminate nonspecific products are discussed in LAMP, RPA, NASBA, RCA, SDA, LSDA, NDA and EXPAR reactions.

Keywords: isothermal amplification, background synthesis, DNA polymerases, LAMP, SDA, EXPAR

УДК 577.217.5

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА БЕЛКА muRif1 МЕЧЕННОГО МВР С G-КВАДРУПЛЕКСАМИ ДНК С ПОМОЩЬЮ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

© 2021 Н. Ghadiri¹, S. Alavi², B. Dabirmanesh¹, and K. Khajeh^{1,2*}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; E-mail: Khajeh@modares.ac.ir

² Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Поступила в редакцию 11.11.2020

После доработки 06.06.2021

Принята к печати 07.06.2021

Rap1-взаимодействующий фактор 1 (Rif1) является одним из ключевых участников временной регуляции репликации, специфичной для каждого типа клеток. Белок Rif1 состоит из N-концевого и C-концевого доменов, разделённых внутренне неупорядоченной областью. Было высказано предположение, что обе N- и C-концевые области Rif1 могут связываться с ДНК, обнаруживая наибольшее сродство к крестообразным структурам ДНК. В настоящей работе C-концевой домен мышинового Rif1, связанный с мальтозо-связывающим белком (МВР-muRif1-CTD), был экспрессирован в растворимом виде и очищен. Биологическая активность очищенного белка была исследована методами анализа сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) и поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Результаты, полученные в работе, показывают, что МВР-muRif1-CTD связывает G-квадруплекс (G4) с высокой аффинностью (K_D 19,0 ± 0,8 нМ), как и предполагалось ранее. Это исследование является первым шагом в изучении взаимодействия МВР-Profinity eXact-muRif1-CTD и G4 с помощью SPR.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мышинный Rap1-взаимодействующий фактор 1 (muRif1), поверхностный плазмонный резонанс, мальтозо-связывающий белок (МВР), G-квадруплекс (G4), анализ сдвига электрофоретической подвижности.

DOI: 10.31857/S0320972521070113

ВВЕДЕНИЕ

Репликация генома эукариотов происходит согласно особому временному порядку, специфичному для каждого типа клеток [1]. Эволюционно-консервативный белок, Rap1-взаимодействующий фактор 1 (Rif1), был изначально обнаружен в почкующихся дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* как компонент теломерного комплекса, участвующего в регуляции длины теломер [2, 3]. Так как Rif1 вовлечён во многие метаболические пути поддержания целостности генома, его рассматривают как ключевой регулятор инициации репликации, функции которого сохранились на пути эволюции от дрожжей до человека [4–6]. Анализ структуры белка Rif1 по-

казывает, что она включает три области: N-концевой домен (NTD), C-концевой домен (CTD) и внутренне неупорядоченную область (IDP) между ними. Считается, что NTD и CTD могут участвовать во взаимодействиях ДНК–белок и белок–белок. NTD содержит α -спиральный мотив HEAT-повторов, который необходим для привлечения мышинового Rif1 (muRif1) к месту двухцепочечного разрыва в ДНК [7]. Неструктурированный CTD включает три субдомена, из которых только третий является неконсервативным [8–10], а второй субдомен предположительно имеет участок связывания крестообразной ДНК [9–11]. Согласно предыдущим работам, Rif1 из делящихся дрожжей и клеток млекопитающих связываются с G-квадруплексами (G4) [12, 13]. Более того, предполагается, что этот белок мультимеризуется посредством взаимодействий между CTD; однако окончательная организация субдоменов Rif1 млекопитающих ещё не установлена [9, 14].

Связывание muRif1-CTD с G4-структурами и со структурами, не образующими G4, было детально изучено в работах Moriyama et al. [13] и Masai et al. [15], где авторы исследовали связы-

Принятые сокращения: МВР – мальтозо-связывающий белок (maltose binding protein); КД – круговой дихроизм; CTD – C-концевой домен; NTD – N-концевой домен; EMSA – анализ сдвига электрофоретической подвижности (electrophoretic mobility shift assay); G4 – G-квадруплекс; Rif1 – Rap1-взаимодействующий фактор 1 (Rap1-interacting factor 1); SPR – поверхностный плазмонный резонанс (surface plasmon resonance).

* Адресат для корреспонденции.

вание различных последовательностей, способных образовывать G4-структуры с Rif1, используя метод анализа сдвига электрофоретической подвижности (EMSA или gel shift assay). Авторы установили, что последовательность T₆G₂₄ (G4) связывалась лучше всего с Rif1 из дрожжей и клеток млекопитающих, экспрессируемых в эукариотических системах [13, 15]. Более того, они проанализировали влияние различных конкурентов связывания Rif1 с T₆G₂₄. Оказалось, что структурированная G4-последовательность (T₆G₂₄) связывалась лучше, чем все другие исследованные структуры ДНК [13].

В недавних работах было установлено, что существует ассоциация между Rif1 и такими заболеваниями человека, как рак и некоторые наследственные болезни; соответственно, этот белок может рассматриваться как потенциальный биомаркер [16–18]. Для того, чтобы выяснить биологическую активность целевого белка, необходимо идентифицировать партнёров, с которыми этот белок взаимодействует и определить аффинность этого взаимодействия, что поможет в поисках подходящего партнёра или потенциального лекарственного препарата, способного предотвратить функционирование целевого белка или помешать ему исполнять свои нормальные функции [19].

Взаимодействие между различными типами биологических молекул, представляющих клинический интерес, может быть исследовано с помощью различных методов, основанных на плазмонном резонансе [19]. Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) — это одна из наиболее универсальных технологий, применяемых для создания биосенсоров в различных областях науки. Биосенсоры, основанные на SPR, демонстрируют превосходные аналитические характеристики, не требуют введения меток и позволяют отслеживать взаимодействия в реальном времени [20].

В данной работе muRif1-CTD, меченый MBP и Profinity eXact™, был экспрессирован в растворимой форме, и его биологическая активность оценивалась с помощью EMSA и более точных методов SPR. В будущем мы планируем сосредоточиться на более детальном исследовании этого взаимодействия, используя другие возможности SPR.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн muRif1-CTD конструкций и клонирование. Ген *muRif1-CTD* был клонирован с помощью ПЦР, используя двойную рестрикцию, и вставлен в вектор pPAL («Bio-Rad», США) с

меткой Profinity eXact™ на N-конце. Эта конструкция была использована для химической трансформации компетентных клеток *Escherichia coli* DH5α. Рекомбинантные клоны были отобраны на чашках с агаром Luria Bertani (LB), содержащим ампициллин (30 мкг/мл), и проанализированы с помощью двойной рестрикции и секвенирования конструкции после выделения плазмиды. Такая же процедура была использована для химической трансформации компетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3).

Для конструирования нового вектора экспрессии MBP-Profinity eXact tag-muRif1-CTD ген *muRif1-CTD* был амплифицирован, подвергнут двойной рестрикции и лигирован в вектор pMXB10 («New England Biolabs», США). Затем этот вектор был подвергнут двойной рестрикции теми же ферментами, и 5 мкл полученного раствора были использованы для химической трансформации компетентных клеток *E. coli* DH5α. Позитивные клоны были отобраны на чашках с LB-агаром, содержащих 30 мкг/мл ампициллина. Наличие рекомбинантных клонов было подтверждено с помощью ПЦР, двойной рестрикции и секвенирования.

Очистка белка MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD. Анализ экспрессии белка и степени его очистки проводили с помощью денатурирующего электрофореза (SDS-PAGE) по Лэммли [21]. Подробный протокол экспериментов и результаты очистки приведены на рис. S1 и S2 в Приложении). Экспрессию белка инициировали 1 mM IPTG при 18 °C в течение 20 ч, и полученные клетки были использованы для очистки белка.

Конструкция MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD содержит в своём составе две метки на N-конце, Profinity eXact и мальтозо-связывающий белок (MBP). Соответственно, экспрессированный белок может быть очищен либо с использованием колонки Profinity eXact, либо на амилозной смоле. Описание первого метода приведено ниже, второй метод был заменён на колонку, заполненную рисовой мукой или цельным рисовым зерном.

Очистку белка, основанную на Profinity eXact-метке, проводили путём уравнивания колонки (считая агароза Superflow™ («Bio-Rad Laboratories», США), несущая конъюгированный мутантный субтилизин) буфером, использованным для лизиса клеток (100 mM фосфат натрия, pH 7,4) со скоростью потока 1 мл/мин. В буфере, используемом для связывания, не должно быть хлорид-иона, чтобы предотвратить расщепление целевой белковой метки на этапе загрузки лизата, поэтому хлорид натрия был за-

менён на ацетат натрия. После загрузки колонку промывали десятью свободными объёмами вышеупомянутого буфера, чтобы удалить неспецифически-связанные примесные белки. После промывки целевой белок был элюирован посредством инкубации колонки с раствором 100 мМ фторида натрия и 100 мМ фосфата натрия, рН 7,4, в течение 30 мин при комнатной температуре. При этих условиях протеаза проводила контролируемое расщепление и удаление метки из слитого белка, что позволило элюировать очищенный белок без метки. Profinity eXact-колонка была регенерирована с помощью 0,1 М фосфорной кислотой (H_3PO_4) путём удаления расщеплённой метки Profinity eXact с фермента. Все фракции были собраны и проанализированы с помощью денатурирующего электрофореза. Наличие полосы белка с молекулярной массой ~38 кДа (29,7 кДа – 270 а.о. в muRif1-CTD и 8 кДа – ~70 а.о. в Profinity eXact-метке) указывает на экспрессию белка Profinity eXact-muRif1-CTD.

Аффинная очистка, основанная на связывании белка с MBP, была проведена путём уравнивания 10-мл колонки, заполненной либо рисом (предварительно замоченным в воде на 2 ч), либо рисовой мукой, буфером, использованным для лизиса (50 мМ фосфат калия, 500 мМ NaCl, рН 7,4), и пропускания раствора под действием силы тяжести. Такая аффинная очистка может выполняться либо в периодическом, либо в колоночном формате, но без использования перистальтического насоса, так как создаваемое насосом давление может слишком уплотнить носитель и заблокировать колонку из-за присутствия очень мелких частиц в рисовой муке. Целевой белок элюировали с колонки 10 мМ раствором мальтозы. Все фракции были проанализированы с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ. Элюирующий буфер был заменён на связывающий буфер для анализа сдвига электрофоретической подвижности с помощью центрифужных фильтров Amicon-10 или Microcon (предел отсека по массе – 10 кДа) («Millipore», США).

Изучение образования G4. Синтезированную и очищенную с помощью ВЭЖХ последовательность (T_6G_{24}) («Bio Basic Inc.», Канада), которая способна образовывать G4-структуру, растворяли в воде для инъекций до конечной концентрации 100 мкМ и хранили при $-20^\circ C$. G4-структуру формировали, используя циклы тепловой денатурации-ренатурации. Предполагаемую последовательность структуры G4 (при концентрации 4 мкМ) денатурировали нагреванием при $90^\circ C$ в течение 5 мин, затем разбавляли до концентрации 1 мкМ буфером, содержа-

щим 20 мМ Tris-HCl (рН 7,4) и 100 мМ KCl, и постепенно охлаждали до комнатной температуры в течение 2 ч [22, 23]. Образование G4-структуры отслеживалось по флуоресценции катиона 3,6-диметил-2-(4-диметиламинофенил) бензотиазолия (ThT) [22, 23]. Спектроскопия кругового дихроизма (КД) [24] была использована для подтверждения типа G4-структуры, образованной в этом процессе.

Концентрацию ThT определяли по поглощению водного раствора при 412 нм (принимая коэффициент экстинкции равным $36\,000\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$), измеренного с помощью UV-Vis спектрофотометра Lambda 5 («Perkin Elmer», США). Готовили 5 мМ исходный раствор ThT с концентрацией 5 мМ. Затем при комнатной температуре готовили смесь ThT и олигонуклеотида с концентрациями 1 и 0,5 мкМ соответственно. Спектры флуоресценции были получены с помощью флуоресцентного спектрометра LS 55 («Perkin Elmer») в диапазоне 450–700 нм с шагом 2 нм и возбуждении при 425 нм. Наблюдалось образование сильно флуоресцирующего 1 : 1 комплекса с максимум эмиссии при 490 нм [22].

КД-спектры были получены с помощью Jasco J-715 спектрополяриметра («Jasco», Япония) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см при $20^\circ C$. Сканирование проводилось в диапазоне 220–320 нм со скоростью 200 нм/мин, шагом 1 нм и шириной полосы пропускания 1 нм. Концентрация ДНК была 4 мкМ. Для каждого эксперимента в среднем регистрировали два сканирования, спектр буфера (20 мМ Tris-HCl, рН 7,4, 100 мМ KCl) вычитали из спектра образца, и данные корректировали на ноль при 320 нм. Этот эксперимент повторяли с HEPES-буфером (рН 7,4) вместо Tris-HCl, так как этот буфер использовался как связывающий буфер.

Исследование взаимодействия белка с нуклеиновой кислотой с помощью анализа сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) и поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Образцы белка в 25 мМ буферном растворе карбоната аммония, рН 8,8, содержащем 1 М KCl, были лиофилизированы, и анализ EMSA был проведён, используя радиоактивно меченный G4 (предоставлен Moriyama et al.) и очищенный белок, реконструированный в HEPES-КОН, согласно протоколу, описанному Moriyama et al. [13].

Взаимодействие MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD с иммобилизованным биотинилированным олигонуклеотидом G4 (T_6G_{24}) исследовали с помощью двухканального прибора Xantec SR7500DC («XanTec Bioanalytics», Германия), оборудованного автоматической проточно-инъекционной системой. Изменения показателя

преломления представлены в микроединицах индекса преломления (мкRIU). В работе был использован SAD 200-сенсор («XanTec Bioanalytics») с поверхностью, модифицированной стрептавидином, позволяющий иммобилизовать биотинилированный G4.

Поверхность сенсора предварительно обрабатывали стрептавидином, а затем промывали 50 mM NaOH в течение 60 с, чтобы удалить слабосвязанный стрептавидин. Ранее сформированные структуры G4, биотинилированные по 5'-концу (см. Исследование образования G4) и подтвержденные КД-спектрами, иммобилизовали на поверхности сенсора и использовали как наживку в SPR-анализе. Для этой цели 25 нМ раствор биотинилированного G4 пропускали через проточную ячейку со скоростью 20 мкл/мин. Сигнал, показывающий полное связывание, был установлен на уровне 400 мкRIU. Несвязанный лиганд отмывали буфером (20 mM HEPES, pH 7,4, содержащий 1 mM EDTA и 1 M KCl).

Взаимодействие между G4-DNA (в качестве лиганда) и очищенным белком MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD исследовали для четырех различных концентраций при 25 °C (скорость потока 100 мкл/мин, 20 mM HEPES (pH 7,4), 1 mM EDTA и 0,5 M KCl с добавлением 0,005% (w/v) Tween-20). Температуру поверхности сенсора поддерживали 25 °C.

Стадию связывания (k_a) наблюдали в течение 60 с, а стадию диссоциации (k_d) наблюдали в течение не менее 120 с. Полная диссоциация комплекса достигалась пропуском буфера над поверхностью сенсора. Когда экспериментальные данные соответствовали ожидаемым квалификационным требованиям (где форма и диапазон интенсивности сигналов при различных концентрациях близки к теоретическому расчету), результирующие сенсограммы, полученные из безлигандного эталонного канала, вычитались из сигналов, записанных в тестовом канале, чтобы учесть эффекты буфера и неспецифического фонового связывания. Полученная нормализованная сенсограмма была проанализирована с помощью программы Scrubber

(«BioLogic Software Pty. Ltd.», Австралия) в соответствии с моделью 1 : 1 связывания лиганда Ленгмюра, и кинетические параметры связывания были рассчитаны с помощью этой программы на основании всех введенных экспериментальных данных. Специфичность биосенсора была оценена, используя в качестве контроля другой белок – меченый MBP (MBP-уриказа). Дополнительно в процессе каждого анализа проводили инъекции буфера без аналита, чтобы определить уровень фонового сигнала. Каждый анализ был проведен в трех повторах, и все данные были введены в программу Scrubber для расчетов. Три повторные инъекции были сделаны в произвольном порядке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование, экспрессия и очистка белка muRif1-CTD. Результаты ПЦР, двойной рестрикции и секвенирования подтвердили успешное включение гена *muRif1-CTD* в векторы pPAL и pMXB10 без изменений или замен нуклеотидных оснований в последовательностях продуктов клонирования. На рис. 1 показано положение каждого элемента в векторе, содержащем целевой ген.

Экспрессию белка muRif1-CTD, меченного Profinity eXact, проводили при 37 °C в течение 3 ч в среде LB при постоянном перемешивании (220 об./мин). При этих условиях белки были экспрессированы в нерастворимой форме (рис. S1 в Приложении). Чтобы разрешить эту проблему, температуру инкубации при экспрессии понизили до 18 °C, а продолжительность экспрессии увеличили до 20 ч (рис. S1 в Приложении).

Введение MBP-метки перед Profinity eXact в pMXB10-векторе, понижение температуры до 18 °C и увеличение времени экспрессии до 20 ч привело к получению хорошего выхода растворимой формы белка (рис. S2 в Приложении). Ранее в работе Xu et al. [9] было показано, что введение MBP-метки способствовало солюби-

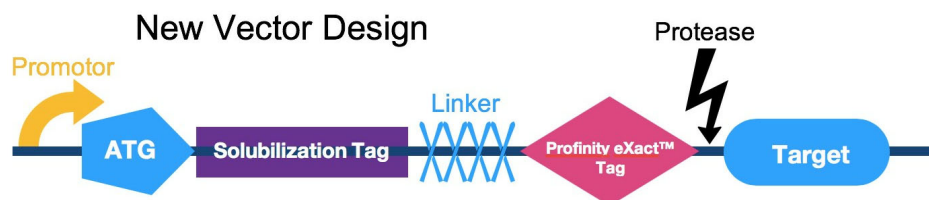


Рис. 1. Схематическое изображение недавно сконструированного прокариотического вектора, содержащего метки солюбилизации MBP и Profinity eXact™ на N-конце гена *muRif1-CTD*. Линкер введен между метками, чтобы облегчить расщепление Profinity eXact™-метки. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

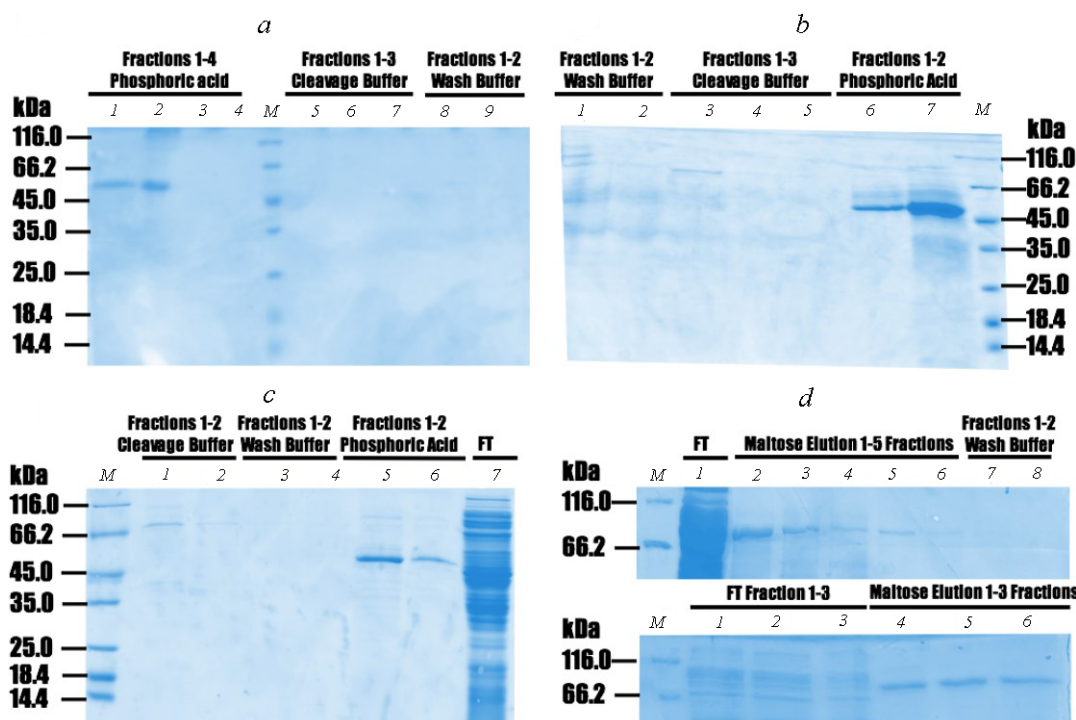


Рис. 2. Результаты очистки MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD на колонке Profinity eXact и колонке, заполненной рисом. *a* – Очистка MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD на колонке Profinity eXact с использованием фосфорной кислоты для смыва метки с колонки. М – Маркеры молекулярной массы. Дорожки: 1–4 – фракции 1–4 при элюировании фосфорной кислотой; 5–7 – фракции 1–3 при элюировании буфером для расщепления; 8 и 9 – последние фракции перед расщеплением. *b* – Введение 10% глицерина в расщепляющий буфер при очистке белка на колонке Profinity eXact. Дорожки: 1 и 2 – проточные фракции 1–2; 3–5 – фракции 1–3 при элюировании расщепляющим буфером, содержащим 10% глицерина; 6 и 7 – фракции 1–2 при элюировании фосфорной кислотой. Проточные фракции (FT). *c* – Введение 1 М NaCl в расщепляющий буфер при очистке на колонке Profinity eXact. Дорожки: 1 и 2 – фракции 1–2 при элюировании расщепляющим буфером, содержащим 1 М NaCl; 3 и 4 – фракции 1–2 при элюировании промывочным буфером непосредственно перед расщепляющим буфером; 5 и 6 – фракции 1–2 при элюировании фосфорной кислотой; 7 – проточная фракция. *d* – Очистка на колонке, заполненной рисом. Очистка на колонке, заполненной цельным рисовым зерном (верхняя панель); дорожки (слева направо): 1 – проточная фракция; 2–6 – фракции 1–5 при элюировании 10 мМ раствором мальтозы с колонки, заполненной цельным рисовым зерном; 7 и 8 – последние промывочные фракции с колонки, заполненной цельным рисовым зерном перед элюированием мальтозой. Очистка на колонке, заполненной рисовой мукой (нижняя панель); дорожки слева направо: 1–3 – проточные фракции 1–3; 4–6 – фракции при элюировании 10 мМ мальтозой с колонки, заполненной рисовой мукой

лизации С-концевого домена человеческого Rif1. Однако в работе было почеркнато, что белок был не очень стабилен и склонен к агрегации. Это затрудняло его применение в аналитических и структурных методах, требующих значительных количеств монодисперсного очищенного белка [11]. В этом исследовании нам впервые удалось получить достаточное количество растворимого белка MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD. По проведённым оценкам, выход целевого белка в предлагаемом методе был 1 мг солиubilизированного белка на 100 мл культуральной среды. Далее в работе белок MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD будет обозначаться как MBP-muRif1-CTD.

Хроматография на колонке Profinity eXact привела к получению очищенного белка. Однако после расщепления детектировалась только

MBP-Profinity eXact-метка (50 кДа, рис. 2, *a*), что указывало на нестабильность белка без MBP (42 кДа), приводящую к его агрегации на колонке. Более того, введение 10% глицерина (рис. 2, *b*) и 1 М NaCl (рис. 2, *c*) в буфер для расщепления для стабилизации muRif1-CTD не привело к появлению в геле полосы, соответствующей muRif1-CTD.

Использование колонок, заполненных рисом и рисовой мукой, оказалось очень эффективными для очистки белка, меченного MBP, была получена чёткая полоса, соответствующая чистому белку MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD (рис. 2, *d*).

Биологическая активность рекомбинантного MBP-меченного С-концевого домена Rif1 в реакции взаимодействия с G4. После того, как достаточное количество растворимого белка было по-

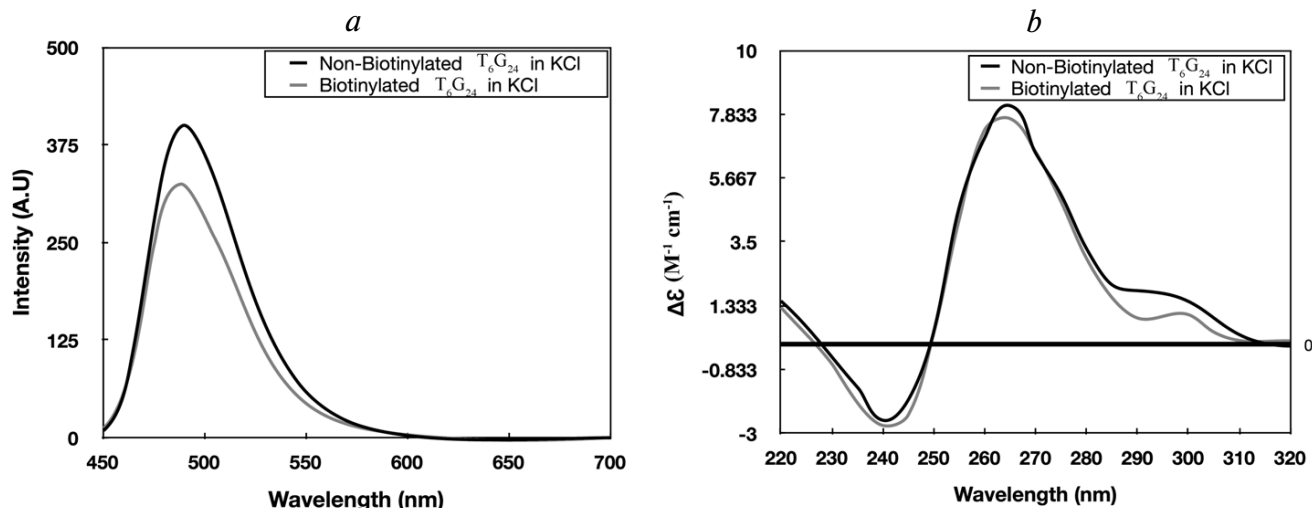


Рис. 3. Исследование образования G4-структуры биотинилированной (серая линия) и небитинилированной (черная линия) последовательности G4 (T_6G_{24}) в присутствии 100 мМ KCl. *a* – Спектры флуоресценции. *b* – Спектры кругового дихроизма

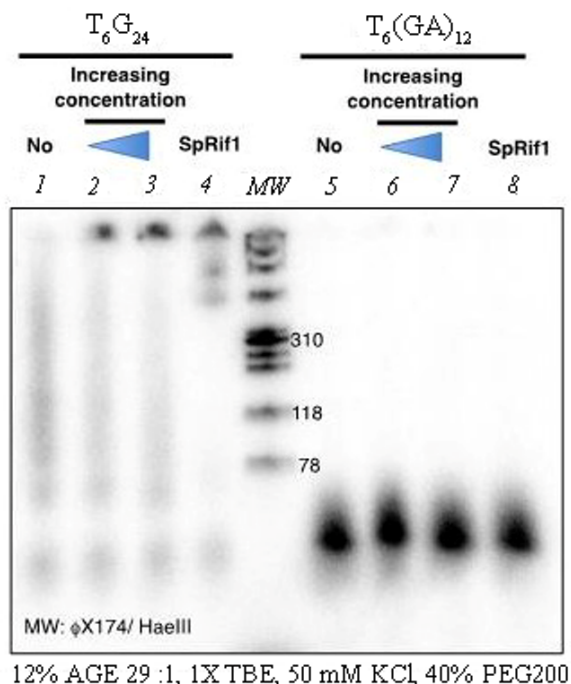


Рис. 4. EMSA-анализ взаимодействий олигонуклеотида T_6G_{24} с параллельной G4-структурой и не способного образовывать G4-структуру с белком MBP-muRif1-CTD. Дорожки: 1 – G4 (T_6G_{24}) в присутствии связывающего буфера без белка; 2 – G4 с 5 мкг/мл белка; 3 – G4 с 10 мкг/мл белка; 4 – G4 с SpRif1 [*Schizosaccharomyces pombe* Rif1, который, как было показано ранее, связывается с T_6G_{24} (G4)], MW – Маркеры; 5 – олигонуклеотид $T_6(GA)_{12}$, не способный образовывать G4-структуры в связывающем буфере без белка; 6 – $T_6(GA)_{12}$, не способный образовывать G4-структуру с 5 мкг/мл белка; 7 – $T_6(GA)_{12}$, не способный образовывать G4-структуру с 10 мкг/мл белка; 8 – $T_6(GA)_{12}$, не способный образовывать G4-структуру с SpRif1. Размазывание полосы наблюдаемое для G4, вероятно, связано с олигомеризацией последовательности G4 [13]

лучено, мы изучили процесс сворачивания последовательности G4. Ранее было установлено, что ThT связывается преимущественно с параллельными G4-структурами [22], служащими в качестве флуоресцентного светового зонда, который можно использовать для распознавания структуры сформированного G4. Мы обнаружили увеличение флуоресценции при 490 нм в растворе, содержащем ThT и последовательность T_6G_{24} , свернутую в присутствии KCl, что указывало на образование G4-структуры (рис. 3, *a*). В качестве контроля спектры флуоресценции ThT в присутствии и отсутствии KCl также были получены (рис. S3 в Приложении). Для этой цели был использован раствор образца G4 (4 мкМ). Мы также включили контроли (только ThT) и оценили влияние KCl на интенсивность флуоресценции ThT (рис. S3 в Приложении). Чтобы подтвердить тип G4-структуры, образовавшейся в присутствии KCl, были получены КД-спектры. Полученные спектры КД последовательности G4 (T_6G_{24}) имели положительную полосу ~260 нм и отрицательную полосу ~240 нм, что указывало на образование параллельной структуры G4 в присутствии KCl.

EMSA был проведён, чтобы определить функциональность и специфичность связывания очищенного белка со сформированной структурой G4 перед тем, как проводить SPR-исследование. Результаты EMSA показали, что MBP-muRif1-CTD, экспрессированный в *E. coli*, может эффективно связываться с радиоактивно меченным G4. Интенсивные полосы меченных G4 наблюдались на старте геля, показывая, что G4 связываются с MBP-muRif1-

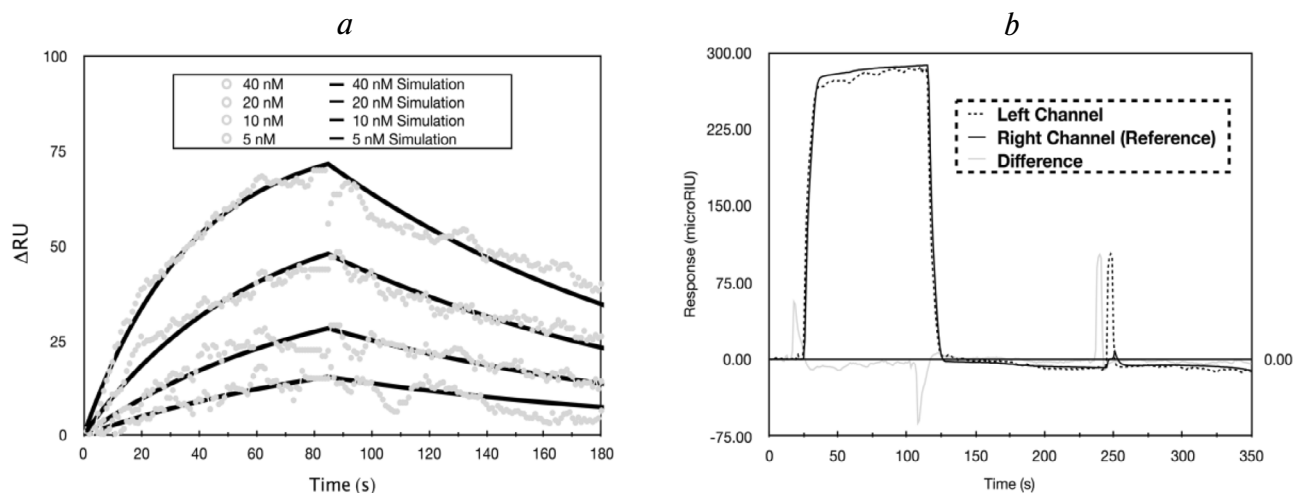


Рис. 5. Анализ взаимодействий с помощью поверхностного плазмонного резонанса. *a* – Сенсограмма взаимодействия между иммобилизованной биотинилированной G4-структурой (T_6G_{24}) и очищенной конструкцией C-концевого домена MBP-Profinity eXact-muRif1, используемой в качестве аналита. Экспериментальные данные для различных концентраций аналита (40, 20, 10, 5 нМ) представлены серыми точками, а расчётные кривые для модели связывание лиганда Ленгмюра 1 : 1 – черными линиями. *b* – Сенсограмма взаимодействия контрольного белка (уриказы, меченая MBP) с иммобилизованной биотинилированной G4-структурой (T_6G_{24}), показывающая сигналы от правого и левого канала и их разницу

CTD (рис. 4). С другой стороны, полоса, соответствующая последовательности $T_6(GA)_{12}$, которая не способна образовывать G4-структуру и связываться с MBP-muRif1-CTD не сдвигалась (рис. 4).

Мы также исследовали сохраняется ли G4-структура после связывания с MBP-muRif1-CTD при тех же условиях связывания, которые использовались для анализа сдвига геля. Спектры КД и флуоресценции подтвердили, что G4-структура сохраняется после связывания с MBP-muRif1-CTD (рис. S3 и S4 в Приложении). Следовательно, экспрессированный MBP-muRif1-CTD был способен специфически связываться со структурой T_6G_{24} , и взаимодействие этих двух молекул может быть далее исследовано с помощью SPR.

Кинетические параметры взаимодействия Rif1 CTD с G4. На следующем этапе функциональность очищенного MBP-muRif1-CTD была проанализирована с помощью SPR, используя четыре различные концентрации белка в проточном буфере (40, 20, 10, и 5 нМ). Кривые ассоциации и диссоциации из трёх независимых

экспериментов были смоделированы с использованием классической модели связывания лиганда Ленгмюра в соотношении 1 : 1 (рис. 5). Рассчитанные кинетические константы приведены в таблице.

Величина SPR-сигнала при наименьшей концентрации белка (2,5 нМ) была на уровне предела количественного определения для используемого прибора (10 мкRIU); поэтому эта концентрация не была включена в расчёты и не использовалась в нашем анализе. Как указано в таблице, величина K_D была $19,0 \pm 0,8$ нМ, а наблюдаемая величина R_{max} была 111 ± 2 . Остаточное стандартное отклонение рассчитывали путём вычитания значений аппроксимирующей кривой из экспериментальных значений, введённых в программу (данные представлены в таблице). Контрольный белок, меченный MBP, не показал никакого связывания, так как не было разницы между сигналами от канала сравнения и канала с иммобилизованным лигандом. Чтобы исключить объёмный эффект, измерение R_{maxOBS} проводилось через 15 с после окончания инъекции аналита.

Кинетические параметры взаимодействия MBP-muRif1-CTD с G4

Кинетические параметры	k_a ($M \cdot c^{-1}$)	k_d (c^{-1})	R_{max}	K_D (нМ)	Стандартное отклонение, SD**
MBP-muRif1-CTD	$6,1(2) \times 10^5*$	$0,0116(5)*$	$111(2)*$	$19,0(8)*$	2,644

* Ошибки в последней указанной значащей цифре представлены в скобках.

** Стандартное отклонение: разница между наблюдаемой и расчётной величиной.

Полученная в данной работе величина K_D для взаимодействия MBP-muRif1-CTD с G4, измеренная впервые с помощью SPR, чётко демонстрирует функциональность очищенного белка. Данная величина K_D хорошо согласуется с величиной K_D (18 нМ), приведённой в работе Masai et al. [13], в которой для оценки K_D использовался EMSA; надо отметить, что SPR считается более чувствительным методом.

Учитывая высокую вероятность олигомеризации белка [13, 14, 20], приведённые в данной работе оценки аффинности были получены только на основании кинетического анализа. Ни более высокие концентрации белка, ни более продолжительное взаимодействие компонентов не рассматривались.

В заключение необходимо отметить, что высокая концентрация соли (500 мМ), необходимая для поддержания белка в растворимом состоянии, и присутствие MBP-метки в составе белка, которая не может быть удалена в виду нестабильность белка, тоже могут влиять на состояние белка и связывание с поверхностью сенсора. Более того, медленный процесс олигомеризации белка может отразиться на данных, получаемых в SPR-эксперименте. Поэтому в будущих исследованиях мы планируем заменить солюбилизирующую метку на меньшую и предпринять попытки изменить конфигурацию SPR-сенсора так, чтобы белок сохранял связь с сенсором посредством нековалентного связывания, что делает возможным его повторное использование.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование было попыткой экспрессии и солюбилизации muRif1-CTD. Представленная платформа для солюбилизации и очистки Rif1-CTD потенциально может быть использована для других нестабильных белков. Было отмечено, что высокие концентрации соли (например, 1 М NaCl/KCl/CH₃COONa) мо-

гут продлить растворимое состояние белка, тем не менее необходимо провести дальнейшие исследования для получения немеченого растворимого белка muRif1-CTD, который может быть использован для изучения его свойств и структуры в кристаллографических исследованиях.

В дополнение, в этой работе мы представили наши исследования кинетики связывания белка MBP-muRif1-CTD со специфической последовательностью G4 (T₆G₂₄), которая, как ранее сообщалось, связывает белок Rif1 с высокой аффинностью [15]. Впервые в этой работе нам удалось измерить K_D для взаимодействия MBP-muRif1-CTD с G4 с помощью SPR, таким образом доказывая биологическую активность очищенного белка. В наших будущих исследованиях мы планируем работать над другими стратегиями солюбилизации и дополнительно исследовать взаимодействие этого белка с его партнёром G4 посредством SPR. Было бы интересно изучить влияние G-повторов на аффинность связывания.

Финансирование. Работа была поддержана исследовательским бюджетом Tarbiat Modares University, Иран (грант № IG-39707).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Prof. Masai и Dr. Kenji из Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Япония, за мудрые советы и щедрый подарок различных конструкций muRif1 и помощь в проведении EMSA.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала Biochemistry (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 7, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rhind, N., and Gilbert, D. M. (2013) DNA replication timing, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a010132, doi: 10.1101/cshperspect.a010132.
2. Hardy, C. F., Sussel, L., and Shore, D. (1992) A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation, *Genes Dev.*, **6**, 801-814.
3. Kedziora, S., Gali, V. K., Wilson, R. H. C., Clark, K. R. M., Nieduszynski, C. A., et al. (2018) Rif1 acts through protein phosphatase 1 but independent of replication timing to suppress telomere extension in budding yeast, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 3993-4003, doi: 10.1093/nar/gky132.
4. Cornacchia, D., Dileep, V., Quivy, J. P., Foti, R., Tili, F., et al. (2012) Mouse Rif1 is a key regulator of the replication-timing programme in mammalian cells, *EMBO J.*, **31**, 3678-3690, doi: 10.1038/emboj.2012.214.
5. Hayano, M., Kanoh, Y., Matsumoto, S., Renard-Guillet, C., Shirahige, K., and Masai, H. (2012) Rif1 is a global regulator of timing of replication origin firing in fission yeast, *Genes Dev.*, **26**, 137-150, doi: 10.1101/gad.178491.111.
6. Yamazaki, S., Ishii, A., Kanoh, Y., Oda, M., Nishito, Y., and Masai, H. (2012) Rif1 regulates the replication timing domains on the human genome, *EMBO J.*, **31**, 3667-3677, doi: 10.1038/emboj.2012.180.

7. Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J. T., et al. (2013) A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice, *Mol. Cell*, **49**, 872-883, doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.001.
8. Silverman, J., Takai, H., Buonomo, S. B., Eisenhaber, F., and de Lange, T. (2004) Human Rif1, ortholog of a yeast telomeric protein, is regulated by ATM and 53BP1 and functions in the S-phase checkpoint, *Genes Dev.*, **18**, 2108-2119, doi: 10.1101/gad.1216004.
9. Xu, D., Muniandy, P., Leo, E., Yin, J., Thangavel, S., et al. (2010) Rif1 provides a new DNA-binding interface for the Bloom syndrome complex to maintain normal replication, *EMBO J.*, **29**, 3140-3155, doi: 10.1038/emboj.2010.186.
10. Sreesankar, E., Senthilkumar, R., Bharathi, V., Mishra, R. K., and Mishra, K. (2012) Functional diversification of yeast telomere associated protein, Rif1, in higher eukaryotes, *BMC Genomics*, **13**, 255, doi: 10.1186/1471-2164-13-255.
11. Sukackaite, R., Jensen, M. R., Mas, P. J., Blackledge, M., Buonomo, S. B., and Hart, D. J. (2014) Structural and biophysical characterization of murine rif1 C-terminus reveals high specificity for DNA cruciform structures, *J. Biol. Chem.*, **289**, 13903-13911, doi: 10.1074/jbc.M114.557843.
12. Kanoh, Y., Matsumoto, S., Fukatsu, R., Kakusho, N., Kono, N., et al. (2015) Rif1 binds to G quadruplexes and suppresses replication over long distances, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 889-897, doi: 10.1038/nsmb.3102.
13. Moriyama, K., Yoshizawa-Sugata, N., and Masai, H. (2018) Oligomer formation and G-quadruplex binding by purified murine Rif1 protein, a key organizer of higher-order chromatin architecture, *J. Biol. Chem.*, **293**, 3607-3624, doi: 10.1074/jbc.RA117.000446.
14. Kobayashi, S., Fukatsu, R., Kanoh, Y., Kakusho, N., Matsumoto, S., et al. (2019) Both a unique motif at the C-terminus and an N-terminal HEAT repeat contribute to G-quadruplex binding and origin regulation by the Rif1 protein, *Mol. Cell. Biol.*, **39**, doi: 10.1128/MCB.00364-18.
15. Masai, H., Fukatsu, R., Kakusho, N., Kanoh, Y., Moriyama, K., et al. (2019) Rif1 promotes association of G-quadruplex (G4) by its specific G4 binding and oligomerization activities, *Sci. Rep.*, **9**, 8618, doi: 10.1038/s41598-019-44736-9.
16. Wang, H., Zhao, A., Chen, L., Zhong, X., Liao, J., et al. (2009) Human RIF1 encodes an anti-apoptotic factor required for DNA repair, *Carcinogenesis*, **30**, 1314-1319, doi: 10.1093/carcin/bgp136.
17. Mei, Y., Peng, C., Liu, Y. B., Wang, J., and Zhou, H. H. (2017) Silencing RIF1 decreases cell growth, migration and increases cisplatin sensitivity of human cervical cancer cells, *Oncotarget*, **8**, 107044-107051, doi: 10.18632/oncotarget.22315.
18. Liu, Y. B., Mei, Y., Long, J., Zhang, Y., Hu, D. L., and Zhou, H. H. (2018) RIF1 promotes human epithelial ovarian cancer growth and progression via activating human telomerase reverse transcriptase expression, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **37**, 182, doi: 10.1186/s13046-018-0854-8.
19. Mariani, S., and Minunni, M. (2014) Surface plasmon resonance applications in clinical analysis, *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 2303-2323, doi: 10.1007/s00216-014-7647-5.
20. Nguyen, H. H., Park, J., Kang, S., and Kim, M. (2015) Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications, *Sensors (Basel)*, **15**, 10481-10510, doi: 10.3390/s150510481.
21. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
22. Gabelica, V., Maeda, R., Fujimoto, T., Yaku, H., Murashima, T., et al. (2013) Multiple and cooperative binding of fluorescence light-up probe thioflavin T with human telomere DNA G-quadruplex, *Biochemistry*, **52**, 5620-5628, doi: 10.1021/bi4006072.
23. Renaud de la Faverie, A., Guedin, A., Bedrat, A., Yatsunyk, L. A., and Mergny, J. L. (2014) Thioflavin T as a fluorescence light-up probe for G4 formation, *Nucleic Acids Res.*, **42**, e65, doi: 10.1093/nar/gku111.
24. Carvalho, J., Queiroz, J. A., and Cruz, C. (2017) Circular dichroism of G-quadruplex: a laboratory experiment for the study of topology and ligand binding, *J. Chem. Educ.*, **94**, 1547-1551, doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00160.

CHARACTERIZATION OF INTERACTION OF THE MBP-TAGGED muRif1-C-TERMINAL DOMAIN WITH G-QUADRUPLEX DNA BY SPR

H. Ghadiri¹, S. Alavi², B. Dabirmanesh¹, and K. Khajeh^{1,2*}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; E-mail: Khajeh@modares.ac.ir

² Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

One of the main players in the cell-specific replication timing pattern is Rap1 interacting factor-1 (Rif1). Rif1 protein consists of N-terminal and C-terminal domains and an intrinsically disordered region in between. It has been suggested that both N- and C-termini of Rif1 are capable of binding to DNA with particularly high affinity to cruciform DNA structures. In the present study, we expressed, solubilized, and purified the maltose-binding protein-tagged murine Rif1 C-terminal domain (MBP-muRif1-CTD). Biological activity of the purified protein was assessed by the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and surface plasmon resonance (SPR). Our results show that the MBP-muRif1-CTD binds G-quadruplex (G4) structure with high affinity (K_D 19.0 ± 0.8 nM), as was previously suggested. This study is the first step in investigation of the interaction of MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD and G4 by SPR.

Keywords: murine Rap1 interacting factor 1 (muRif1), surface plasmon resonance, maltose-binding protein (MBP), G-Quadruplex (G4), gel shift assay

ТОЧНОСТЬ В ТЕРМИНОЛОГИИ

DOI: 10.31857/S0320972521070125

Картина из воспоминаний: химический факультет американского университета, на улице страшная жара, народ в шортах и, вообще, одет весьма небрежно. По коридору идёт человек в отглаженных чёрных брюках и белой рубашке с галстуком, и все, кто его видят, пытаются скрыться, чтобы избежать встречи. Потому что знают, что это представитель фирмы, который будет приставать с рекламой какой-нибудь пипетки, которая на 10% длиннее обычной и поэтому невероятно удобна. Аккуратная одежда коммивояжера – это прихоть главы фирмы? Ни в коем случае! Это просто знание элементарной психологии покупателя – трудно поверить человеку в засаленных джинсах, что производимый его фирмой товар представляет собой последнее чудо техники. Продвижению товара служит и аккуратная и красивая упаковка.

Публикация статьи – это своего рода «продажа» своих научных достижений другим людям, которые должны поверить, что «товар» точен и достоверен. И убедить в этом помогает качество текста статьи – «упаковка товара». Один из элементов такого качества – правильное использование терминологии, присущей науке, в данном случае биохимии и молекулярной биологии. Про «первичную последовательность» и «степень гомологии» уже много написано (ссылки в заметке «Изучить или измерить» – «Биохимия», том 86, № 4, с. 615-616). Еще несколько примеров распространённых ошибок с пояснениями приведены ниже. Часть из них представляет собой смешение понятий, часть пришла из лабораторного жаргона.

«Ион металла *диссоциирует* из комплекса». Диссоциировать, т.е. разрушаться, может только комплекс в целом, поэтому правильно: «комплекс диссоциирует» или «ион металла уходит из комплекса».

«Белок *экспрессируется*» – экспрессируется ген, а белок продуцируется, синтезируется.

«Аланины» вместо «остатки аланина». Аланин – это название химического соединения, которое в принципе не имеет множественного числа. Никто же не скажет «серные кислоты», имея в виду несколько бутылей с серной кислотой.

«Переходный комплекс» – смешение понятий. Правильно: «переходное состояние», комп-

лекс – это совсем другое в химии. Как известно, комплексу всегда соответствует минимум энергии, а переходному состоянию – максимум.

«Карман» для обозначения полости на поверхности макромолекулы. Карман – это элемент одежды и может использоваться в биохимии только в переносном смысле (в кавычках). Кроме того, он применим в отношении не всякой полости, а только узкой и глубокой, напоминающей карман в одежде.

«Мутант белка» или даже просто «мутант» вместо «мутантный белок». Понятие «мутант» относится к целому организму, а не к отдельному белку.

«50 кДа белок» или «16S РНК» – это калькирование английского текста. В русском языке такие определения перед существительным невозможны. Правильно: «белок с массой 50 кДа» и «16S-РНК» (это комбинированное сокращение «рибонуклеиновая кислота с коэффициентом седиментации 16 S»). Ну и, конечно, начинать предложение с цифры считается дурным тоном.

Использование величины константы Михаэлиса (K_m) как характеристики сродства фермента к субстрату. Константа Михаэлиса не является термодинамической константой равновесия в общем случае, а представляет собой комбинацию трёх или более констант скорости индивидуальных стадий ферментативного катализа. Сродство фермента к субстрату характеризует константа равновесия K_s , определение которой, чаще всего, нетривиальная задача. В зависимости от кинетической схемы реакции, K_m может быть по величине больше или меньше K_s [1]. Кстати, Международный союз биохимии и молекулярной биологии (The International Union of Biochemistry and Molecular Biology) рекомендует обозначать константу Михаэлиса K_m , а не K_M (<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/kinetics/ek4t6.html#p42>).

И, напоследок, «метод Бредфорд», хотя эта неточность несколько иной категории. Много лет лекторы химфака МГУ, в том числе и я, рекомендовали студентам писать и говорить именно так, полагая по имени изобретателя метода определения концентрации белка, что это женщина. Недавно автор одной рукописи, присланной в журнал «Биохимия», указал мне в

ответе на рецензию, что Marion Bradford – сто-процентный мужчина (можно проверить по Wikipedia). Выяснилось, что это имя универсальное и может принадлежать как женщине, так и мужчине. Поэтому правильно: «метод Бредфорда».

Возвращаясь к тому, с чего эта заметка начинается, всегда следует иметь в виду, что небрежность текста не может не заронить сомнение в компетентности автора. И не важно, каков рейтинг журнала, для которого пишется статья, – профессионал всегда профессионал.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science. A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, W. H. Freeman and Company, New York, p. 106-109.

А.А. Байков

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

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. Общие положения

1.1. Ежемесячный международный журнал «Биохимия»/Biochemistry (Moscow), учредителем которого является Российская академия наук, издается и распространяется одновременно на русском и английском языках.

1.2. Журнал «Биохимия» публикует работы по всем разделам биохимии, а также концептуально важные работы по биохимическим аспектам смежных областей (молекулярной биологии, биоорганической химии, микробиологии, иммунологии, физиологии, нейробиологии, биомедицинских наук и др.), направленные на понимание молекулярных и клеточных основ биологических процессов. Тематика журнала также охватывает новые экспериментальные методики в области биохимии, теоретические достижения, имеющие значение для биохимии, обзоры современных биохимических тем исследования и мини-обзоры. **Журнал не рассматривает** чисто феноменологические работы, которые описывают изменения биохимических параметров или маркеров биологических процессов **без связи с механизмами**, вызвавшими эти изменения или являющимися следствием таких изменений, а также работы по клонированию и экспрессии (в том числе в трансгенных животных и растениях) индивидуальных генов и материалы по анализу геномных полиморфизмов.

1.3. К публикации принимаются законченные оригинальные работы, содержащие новые экспериментальные результаты; методические работы, включающие описание новых методов биохимических исследований; материалы теоретического характера с изложением новых принципов, подходов для решения тех или иных биохимических задач.

Раздел «**Краткие сообщения**» публикует короткие экспериментальные статьи заявочного, приоритетного характера, требующие скорейшей публикации. В сопроводительном письме в редакцию авторам следует мотивировать необходимость ускоренного прохождения материала. Срок публикации таких сообщений 3–4 месяца.

Журнал печатает заказанные редколлегией (или предлагаемые авторами и одобренные редколлегией) **обзоры** по наиболее актуальным проблемам биохимии и смежных наук. К обзор-

ным статьям предъявляются следующие требования: 1) у авторов должны быть **свои работы** по теме обзора; 2) список цитированной литературы должен включать **работы**, опубликованные по данной теме в течение последних 5 лет; 3) обзор не должен быть пересказом и, подчас, дословным цитированием кусков ранее опубликованных работ, в нем должен быть критический разбор цитируемых материалов и своя концепция, свое видение проблемы, побудившее авторов написать данный обзор! Редакция и рецензенты строго следят за плагиатом!

Раздел «**Дискуссии**» предоставляет авторам возможность опубликовать комментарии, критические замечания и иные соображения по поводу напечатанных ранее на страницах журнала работ, выступить с новой гипотезой. Раздел носит полемический характер и печатает ответные реплики затронутых в публикациях сторон.

1.4. Журнал индексируется и включен в библиографические базы данных Web of Sciences, Biochemistry and Biophysics Citation Index, Biological Abstracts, BIOSIS Database, Chemical Abstracts, Chemical Titles, Current Contents/Life Science, Excerpta Medica, Index Internacional de Cardiologia, Index Medicus (MEDLINE/Pubmed), International Abstracts of Biological Sciences, The ISI Alerting Service, Science Citation Index, Science Citation Index Expanded, SCOPUS, Compendx; РИНЦ. Журнал включен в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК.

1.5. Правила для авторов и информацию о журнале можно найти на сайтах журнала <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya> и <https://biochemistrymoscow.com>, а также на порталах издательств Pleiades <http://pleiades.online/ru/journal/biochmsc/> и Springer <https://link.springer.com/journal/10541>. На сайте журнала на английском языке представлены содержания всех выпусков, начиная с 1996 г., с резюме статей, ключевыми словами и адресами авторов. В свободном доступе также находятся две-три лучшие полнотекстовые статьи каждого выпуска, а также в полном объеме тематические выпуски журнала, посвященные наиболее актуальным проблемам биохимии. Кроме того, в рубрике «Papers in Press» размещаются до выхода в свет принятые к публикации рукописи, получившие высшие оценки при рецензировании.

1.6. Импакт-фактор Biochemistry (Moscow) в 2020 г. составил 2.487, импакт-фактор РИНЦ для «Биохимии» – 2.435. По данным Scopus журнал находится во 2-й квартили (Q2) среди журналов биохимического и медико-биологического профилей.

1.7. Для увеличения охвата читательской аудитории и повышения цитируемости своей работы вы можете опубликовать статью в Biochemistry (Moscow) в режиме открытого доступа (Open Access). В этом случае в статье необходимо указать тип лицензии Creative Commons. Всю информацию о публикации статьи в свободном доступе можно найти на сайте издательства: <http://pleiades.online/ru/authors/openaccess/>.

2. Порядок подачи рукописей

2.1. Редакция принимает на рассмотрение рукописи, присланные по электронной почте в форме присоединенных файлов (attachment) на адреса редакции: editorial@biochemistrymoscow.com или ozrina@bio.chem.msu.ru.

2.2. Материал статьи – текст, включая резюме на русском и английском языках, список литературы, рисунки с подписями и таблицы – оформляется одним файлом; каждый рисунок дополнительно оформляется отдельным файлом. Если пересылаемый материал велик по объему, следует использовать программы для архивирования.

Все страницы рукописи, в том числе содержащие список литературы, таблицы и подписи к ним, следует пронумеровать; номера строк также следует пронумеровать.

На отдельной странице прилагаются сведения об авторах с указанием адресов, контактных телефонов, факса и электронной почты, а также указывается автор, ответственный за переписку с редакцией и работу с корректурой.

2.3. Одновременно с русским желателно представить аутентичный английский вариант рукописи.

2.4. При подаче рукописи авторам следует прислать в редакцию **сопроводительное письмо**, в котором надо указать, что: 1) представленный материал (или его части) не был ранее нигде опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях; 2) авторы ознакомились с этическими нормами, предписанными международными соглашениями о публикациях научных статей, и соблюдают их;

3) авторами представлена информация о потенциальных конфликтах интересов; 4) авторы ознакомились с правилами проведения исследований с участием человека и/или животных и соблюдают их; 5) каждый соавтор сообщает о своем согласии на авторство в статье (см. соответствующие Положения на сайтах журнала и на порталах Springer и Pleiades).

3. Требования к оформлению рукописей

3.1. Текст статьи должен быть изложен по возможности сжато и тщательно отредактирован, но без ущерба для ее понимания и воспроизведения результатов.

3.2. Рукопись должна быть построена следующим образом: 1) индекс УДК; 2) заглавие; 3) инициалы и фамилии авторов; 4) полные названия учреждений, индекс, город и электронная почта (аффилиация); 5) резюме на русском языке; 6) ключевые слова; 7) краткое заглавие статьи (колонтитул); 8) текст статьи, включающий список цитированной литературы, таблицы, подписи к рисункам; 9) резюме на английском языке (с переводом названия статьи, фамилий авторов, аффилиации и ключевых слов).

Индекс УДК выделяется курсивом и ставится в верхнем левом углу первой страницы.

Заглавие должно быть максимально кратким, информативным и без сокращений.

Если авторы статьи являются сотрудниками разных учреждений, то учреждения следует пронумеровать и после каждой *фамилии* надстрочным знаком указать соответствующий номер; звездочкой справа от цифры необходимо отметить автора, ответственного за переписку с редакцией. Для каждого из авторов приводится полное название учреждения с индексом, городом и страной; для автора, ответственного за переписку, указывается также адрес электронной почты.

Резюме должно быть кратким (не более 250 слов), сжато и ясно описывающим основные конкретные результаты работы и вытекающие из них выводы.

Ключевых слов – не более 7.

При использовании нестандартных сокращений должен быть добавлен раздел *Принятые сокращения*.

Текст статьи следует разбить на разделы: 1) Введение, 2) Методы исследования, 3) Результаты исследования, 4) Обсуждение результатов (объединенный раздел «Результаты и их обсуждение» допускается в тех случаях, когда обсуж-

дение невелико по объему), 5) Список литературы; 6) Резюме на английском языке.

Во *введении* кратко излагается история вопроса с обязательным рассмотрением работ, в которых аналогичные или близкие исследования уже проводились, и формулируется цель исследования.

Основное требование к изложению *методов исследования* состоит в том, чтобы процедуры были описаны максимально кратко, но по описанию можно было воспроизвести эксперименты; сюда же должны быть включены использованные в работе материалы, реактивы и приборы с указанием фирмы и страны-производителя, например: глицерин («Sigma-Aldrich», США), электронный микроскоп JEM 100C («JEOL», Япония). Только новые методы следует детально описывать; на ранее опубликованные и общеизвестные достаточно сослаться в списке литературы, указав автора и/или название метода (например, концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [7]). Если метод известен не слишком широко, желательно изложить его принцип и указать автора. **Не допускаются** ссылки на методы по типу «нуклеазу измеряли методом [7]» или «по [7]» (ссылка не может быть самостоятельным членом предложения).

Результаты исследования обычно представлены рисунками и таблицами; те эксперименты, которые не нуждаются в документации, описываются в тексте. В этом разделе не следует приводить обсуждение результатов, можно ограничиться объяснением причинно-следственных связей между описываемыми экспериментами.

Раздел «*Обсуждение результатов*» должен содержать интерпретацию результатов (но не их повторение) и сравнение с ранее опубликованными результатами. Желательно основные результаты иллюстрировать простой и наглядной схемой.

В случае необходимости рукопись завершается *заключением*, которое отделяется от раздела «Обсуждение результатов» отбивкой.

В связи с участием журнала в международном Комитете по этике публикаций (Committee on Publication Ethics – COPE) авторам следует внести в конце статьи несколько фраз, демонстрирующих приверженность международным этическим стандартам. Ниже приведены образцы представления соответствующих разделов в заключительной части статьи.

1) Если работа выполнена при поддержке какой-либо организации, в разделе «Финансирование» следует указать, каким фондом и грантом поддержано данное исследование и каждая часть работы в отдельности, если источники финансирования разные. Следует приводить пол-

ные названия институтов и организаций-спонсоров.

2) В разделе «Благодарности» по желанию авторов сообщается информация о любой помощи в проведении работы и подготовке статьи: о полезных обсуждениях и дискуссиях, благодарности коллегам; о предоставлении материалов, научных данных, компьютерного оборудования, приборов; о проведении исследований в центрах коллективного пользования; о помощи в технической подготовке текста. Приветствуется описание роли каждого из авторов публикации.

3) В разделе «Конфликт интересов» авторы заявляют о наличии или отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере. Данный раздел является обязательным.

4) Обязательным является также раздел «Соблюдение этических норм». Если исследования проводились на животных, то в данном разделе указывается: «Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций».

Если исследования проводились с участием людей, то в разделе «Соблюдение этических норм» указывается: «Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие».

Если в статьях не содержится описания исследований с участием людей или использованием животных и выполненных кем-либо из авторов, в разделе «Соблюдение этических норм» указывается: «Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов».

5) Если статья содержит персональную информацию об участниках исследования, то необходимо включить следующее положение в раздел «Информированное согласие»: «От всех участников, чья персональная информация содержится в этой статье, получено дополнительное письменное добровольное согласие».

Список цитируемой литературы должен быть максимально кратким (не более 100 ссылок), но содержащим ссылки на все принципиально важные последние публикации по данному вопросу. В журнале принята последователь-

ная нумерационная система цитирования, т.е. по ходу изложения указывается порядковый номер процитированного источника (в квадратных скобках), соответствующий номеру в Списке литературы. Авторам следует очень внимательно проверить последовательность нумерации ссылок в тексте и соответствие номера каждой ссылки в тексте и списке литературы. **Не допускается** включение в список литературы ссылок на веб-сайты, необходимо ссылаться на публикации авторов, предлагающих эти электронные ресурсы (программы/базы данных). Если такие публикации отсутствуют, ссылка дается в тексте так же, как на другие неопубликованные материалы (например, База данных структур бактериальных углеводов, [csdb/glycoscience.ru/bacterial](http://csdb.glycoscience.ru/bacterial)).

Список литературы печатается как отдельный раздел рукописи с указанием фамилий и инициалов всех авторов, названия цитируемой статьи и выходных данных. Кроме этого, желательно дать DOI статьи. Ниже приводятся примеры ссылок на журналы, книги, сборники, диссертации.

1. Beltrami, C., Besnier, M., Shantikumar, S., Shearn, A.I.U., Rajakaruna, C., et al. (2017) Human pericardial fluid contains exosomes enriched with cardiovascular-expressed microRNAs and promotes therapeutic angiogenesis, *Mol. Ther.*, **25**, 679-693, doi: 10.1016/j.ymthe.2016.12.022.

2. Sloan-Dennison, S., and Schultz, Z.D. (2018) Label-free plasmonic nanostar probes to illuminate *in vitro* membrane receptor recognition, *Chem. Sci.*, **10**, 1807-1815, doi: 10.1039/c8sc05035j.

3. Анисимов В.Н. (2008) *Молекулярные и физиологические механизмы старения*, Наука, СПб.

4. Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

5. Tanphaichitr, V. (2001) in *Handbook of vitamins* (Rucker, R., and Suttie, J., eds), Marcell Dekker, N.Y., pp. 275-316.

6. Гендролис А.А., Серебрянников Н.В., Гандель В.Г. (1978) В кн. *Простагландины* (под ред. Ажгихина И.С.), Медицина, Москва, с. 332-347.

7. Гандельман О.А. (1992) *Кинетика и механизм биологического окисления люциферина светляков*. Дис. канд. хим. наук, МГУ, Москва.

8. Rosenkranz, A.A., Slastnikova, T.A., Durymanov, M.O., and Sobolev, A.S. (2013) Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor, *Biochemistry (Moscow)*, **11**, 1228-1237, doi: 10.1134/S00062979-13110035.

Для авторов, использующих систему EndNote, редакция предоставляет стиль, который поддер-

живает форматирование цитат в тексте и список литературы. Стилизованный файл можно найти на сайтах журнала <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya> и <https://biochemistrymoscow.com> в разделах для авторов.

В конце статьи дается *резюме на английском языке*, являющееся аутентичным переводом заглавия статьи, инициалов и фамилий авторов в английской транскрипции, названий учреждений с индексами, названиями городов и адресами электронной почты, текста аннотации и ключевых слов.

3.3.1. Объем экспериментальной статьи, включая список литературы, таблицы, рисунки (3 рисунка считаются за 1 страницу) и подписи к ним, резюме на английском языке, не должен превышать 20 машинописных страниц, количество рисунков – не более 8; **краткое сообщение** – не более 12 страниц (включая не более 4 рисунков и/или таблиц); **мини-обзор** – не более 16 страниц (включая не более 5 рисунков); **обзор** – не более 35 страниц (включая не более 8 рисунков); сообщения в разделе «**Дискуссии**» – до 4 страниц.

3.3.2. Текстовые файлы следует представлять в формате Microsoft Word (версия 6.0 и более поздние), шрифты для основного текста – Times New Roman и Symbol, размер букв 12, полтора интервала, в одну колонку без выравнивания по правому краю, без переноса слов, с полями 3 см с левой стороны, на странице – не более 30 строк.

Для оформления текста можно использовать курсив, полужирные начертания, подстрочные и надстрочные индексы, греческие и математические символы (шрифт Symbol) в соответствии со стилизованным оформлением журнала.

Стиль оформления текстового материала должен быть простым: **без запрограммированных заголовков, вставок, шаблонов, ссылок на литературные источники (гиперссылок)**; без увеличения межстрочных и межбуквенных интервалов; без использования шаблонов – в окне «стиль» должно быть «обычный». Особенно это относится к «Списку литературы», т.к. запрограммированные порядковые номера при переносе в издательскую программу исчезают.

Авторы не должны использовать такие функции программы Word, как «Закладка», «Примечание», «Сноска», «Концевая сноска», потому что они неправильно интерпретируются издательской программой. Если в тексте встречается сноска (или концевая сноска), то сразу после предложения или абзаца с ее номером, следует набрать «{Footnote}», т.е. «{Сноска}», и далее непосредственно текст сноски.

Если при подготовке статьи была использована функция «Рецензирование», то перед сохранением файла нужно отменить функцию «Рецензирование» и затем использовать функцию «Принять все изменения в документе».

3.3.3. Таблицы следует приводить в тех случаях, когда данные не могут быть приведены в тексте.

Каждая таблица оформляется на отдельной странице и имеет свой заголовок. Колонки в таблице должны быть озаглавлены, с указанием через запятую размерности приводимых величин. Необходимо стремиться к максимальной краткости заголовков колонок, не давать величин, легко выводимых из имеющихся (например, разность или проценты). Повторение одних и тех же данных в тексте, в таблицах или на рисунках не допускается.

Таблицы принимаются только в формате Word (doc, docx). Если таблицы содержат графические вставки, эти вставки следует прислать в виде отдельных графических файлов высокого качества.

3.3.4. Рисунки с подрисуночными подписями следует располагать в тексте по месту ссылки на каждый рисунок. Кроме того, рисунки должны быть представлены в виде отдельных файлов, удовлетворяющих следующим требованиям:

– для схем и графиков **без полутоновых вставок**: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в черно-белом режиме (Line-art, Black-and-White, Bitmap). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg;

– для **полутоновых рисунков** или графиков **с полутоновыми вставками**: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в полутоновом черно-белом режиме (градации серого – Grayscale). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg;

– для **цветных рисунков**: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в цветном режиме CMYK (для цветной печати), RGB (для цветных рисунков в электронной версии). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg.

– независимо от типа графики, рисунок должен обладать **высоким реальным разрешением**: не ниже 300 dpi для полутоновых иллюстраций; не ниже 600 dpi для штриховых и смешанных (полутоновых/штриховых) иллюстраций. Пикселизация изображений в форматах растровой графики не должна быть грубой. Линии рисунков должны быть толщиной не менее 3 пунктов (point). Следует избегать чрезмерно мелких обозначений (букв, цифр, значков и т.д.). Пикселизированные (растровые) рисунки не следует вставлять в документ Word или переводить в формат PDF, так как это ухудшает их качество;

– рисунки должны иметь размеры, соответствующие их информативности. Размер рисунка на одну колонку не должен быть менее 8 см; на две колонки – менее 17 см. Рисунки не должны быть чрезмерно крупными;

– векторные иллюстрации не должны содержать точечных закрасок, таких как «Noise», «Black&white noise», «Top noise». Для векторной графики все использованные шрифты должны быть включены в файл;

– шрифты внутри рисунков выбираются из гарнитуры Arial размером 9 пунктов;

– следует избегать сканирования рисунков из книг и других печатных изданий, так как такие файлы дают низкое качество при печати и имеют неоправданно большой размер.

Общие требования к подготовке графиков, диаграмм и формул:

– **график** должен содержать обозначения координатных осей (измеряемый параметр и единица измерения), а также кривых и других деталей. Надписи по осям выполняются вдоль осей шрифтом Arial с заглавной буквы, единица измерения отделяется запятой, а не скобками (например, Объем элюента, мл). Линии внутри рисунка следует пронумеровать (цифры выполняются *курсивом* – 1, 2 и т.д.), и в подрисуночной подписи (не на рисунке) дать пояснения к каждой линии. Экспериментальные точки предпочтительно представлять заштрихованными и незаштрихованными кружками, квадратами, треугольниками, ромбами. Отдельные кривые могут различаться также сплошным или штриховым изображением. Все линии должны быть изображены четко с толщиной линий (обычно 3 пункта), позволяющей уменьшить рисунок до конечного размера в журнале. Координатные оси в большинстве случаев необходимо отображать черными (не серыми) линиями. Фон графика или диаграммы должен быть белым, без линий координатной сетки (за исключением случаев, когда иной цвет фона или наличие сетки необходимы для правильного восприятия);

– на **диаграммах** и **фотографиях** отдельные элементы (столбцы, дорожки геля и пр.) следует пронумеровать *курсивными* арабскими цифрами (1, 2 и т.д.) и в подрисуночной подписи (не на рисунке) дать пояснения к каждой цифре. Если помимо арабских требуется введение римских цифр (I, II, III и т.д.), эти цифры должны быть прямого начертания.

– если рисунок состоит из нескольких частей (диаграмм, графиков, схем, структур белков, фотографий, в т.ч. электрофореграмм), их нужно обозначить строчными *курсивными* буквами (a, b, в и т.д.) гарнитурой Times, размером большим, чем основной текст, и поместить эти бук-

вы в верхних левых углах соответствующих частей. В подрисунковой подписи следует дать пояснение к каждой части рисунка;

– для написания **химических формул** в тексте используется программа ChemWindows;

– длинные и сложные **математические формулы** следует представлять в виде рисунков без подписей в одном из допустимых форматов (pdf, tiff или jpg). Каждую формулу нужно дать отдельным файлом, название которого соответствует номеру формулы; при подготовке данных файлов следует руководствоваться правилами подготовки графических материалов. Функцией «Редактор уравнений» надо пользоваться **только для развернутых уравнений** (как нумерованных, так и встречающихся в тексте), но не для небольших выражений (обозначений), вкрапленных в текст, например, ΔG , $T\Delta S$, K_m . (Для таких небольших выражений должны использоваться основные функции программы Word, как и для всего остального текста статьи.) Для выражений, в которых требуется «кернинг» (нижний и верхний индексы, расположенные один под другим), надо использовать только надстрочные и подстрочные знаки (например, NH_3^+), а «кернинг» будет выполнен макетчиком. Эти требования обусловлены тем, что издательская программа неправильно воспринимает данные, полученные с помощью функции «Редактор уравнений»;

– в ширину формула не должна превышать 8,5 см (ширина колонки журнала). Более длинные формулы должны быть разбиты автором на несколько строк. Формулы должны быть набраны шрифтами Times New Roman и Symbol. В случае если формулы представляются в виде пикселизированных (растровых) изображений, они должны быть представлены в черно-белом режиме (Line-art, Black-and-White, Bitmap) в формате tiff или jpg. Такие изображения должны обладать **высоким реальным разрешением** (пикселизация не должна быть грубой). Особое внимание следует уделять качеству графической передачи надписей, цифр и мелких элементов пикселизированного изображения. Пикселизированные (растровые) изображения не стоит вставлять в документ Word или переводить в формат PDF, так как это зачастую ухудшает их качество;

– **аминокислотные, нуклеотидные и пр. последовательности** часто изображаются в форме, требующей строго вертикального расположения компонентов. Поэтому во избежание ошибок и необходимости проверять большие количества сложной информации авторы должны представлять в редакцию материалы такого рода в виде, пригодном для репродукции.

Обращаем внимание на общие условия публикации иллюстраций:

– надписи и обозначения на рисунках могут меняться в русской и английской версиях при переводе, поэтому для фотографий и рисунков, где надписи наложены на сложный, неоднотонный фон, желательно предоставить второй вариант без текста и всех обозначений, для остальных иллюстраций – располагать надписи на иллюстрации так, чтобы они не соприкасались с другими ее частями. Авторы также могут сами подготовить версии рисунков с английскими надписями;

– рисунок должен иметь заголовок и информативную подрисунковую подпись, делающую его смысл понятным без обращения к тексту – указываются условия, специфические для данного эксперимента; ссылки на основной текст допускаются только чтобы избежать повторений и неясностей;

– цветные иллюстрации публикуются **бесплатно для авторов** в том случае, если они будут размещены **только в электронной версии статьи**, а в печатной версии журнала они будут в черно-белом исполнении. При этом авторы должны иметь в виду, что в печатной версии с черно-белыми рисунками сохраняются подрисунковые подписи из цветной электронной версии, поэтому следует избегать указаний на цвет в подрисунковых подписях. Авторам необходимо подбирать цвета таким образом, чтобы при черно-белой печати не утратилась информативность. Цветные линии графиков желательно размечать обозначениями, цифрами или спецсимволами, или делать различающиеся типы линий для каждого цвета. Цветные области на иллюстрациях желательно размечать различающимися обозначениями или спецсимволами, а не одинаковыми символами разных цветов. Если цветовое разделение областей находится примерно в одном цветовом тоне, то желательно провести тонкую линию границы между ними. При большом количестве цветных областей в схожих цветовых тонах желательно дополнительно обозначить области символами или штриховкой. Все надписи и обозначения желательно делать не цветными, а черными или белыми, в зависимости от подложки;

– если электронная версия статьи содержит несколько цветных рисунков, в печатной версии возможна платная публикация всех этих рисунков в цвете, либо бесплатная публикация всех этих рисунков в черно-белом исполнении. Публикация в печатной версии только части цветных рисунков в цветном исполнении невозможна;

– подготовленные рисунки желательно распечатать, чтобы убедиться, что они хорошо вы-

глядят в напечатанном виде: все элементы рисунка должны быть хорошо видны на распечатке, фон должен быть чистым, надписи и цифры должны легко читаться. Зачастую бывает достаточно сложно оценить качество рисунка только по тому, как он выглядит на экране компьютера.

— подписи к рисункам следует сгруппировать в последовательном порядке и оформить как отдельный раздел в конце рукописи;

— если авторы используют в своей рукописи иллюстрации или таблицы из других публикаций (в том числе своих собственных), то им необходимо запросить у Издателей этих публикаций разрешение на перепечатку или использование материалов.

Несоблюдение правил подготовки графического материала приводит к необходимости переработки рисунков авторами и задержке публикации рукописи.

3.3.5. Дополнительные материалы к статьям.

Для более полного описания исследования к статье могут прилагаться дополнительные материалы (аудио- и видеофайлы, презентации, дополнительные таблицы, рисунки и пр.) при условии, что автор является правообладателем прилагаемых материалов, и автором ранее не были переданы авторские права на их использование иным (кроме издателя) лицам, либо автор имеет письменное разрешение правообладателя на их использование в целях опубликования и распространения в журнале. Дополнительные материалы публикуются только в электронной версии журнала на сайте: <http://link.springer.com>, а также на сайте журнала: <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>. При наличии дополнительных материалов в тексте необходимо разместить ссылку на Приложение к статье.

3.3.6. Все физические величины рекомендуются приводить в международной системе СИ.

4. Порядок работы с рукописями (рецензирование, редакционная подготовка, корректура)

4.1. Поступившей в редакцию правильно оформленной рукописи присваивается регистрационный номер и фиксируется дата поступления, о чем редакция информирует авторов по электронной почте. **Рукописи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам без рассмотрения.**

4.2. **Рецензирование.** При подаче рукописи авторы могут указать двух потенциальных ре-

цензентов (ФИО, адрес электронной почты) из числа специалистов в данной области исследований, а также тех, чье участие в рецензировании нежелательно.

Все рукописи рассматривает Ответственный ученый секретарь (Executive Editor-in-Chief) и направляет Ответственному Редактору по соответствующей конкретной области исследований; он, в свою очередь, указывает двух-трех специалистов для рецензирования рукописи. Список Ответственных Редакторов и членов редколлегии размещен на сайте журнала, а также на сайтах Biochemistry (Moscow) на порталах Pleiades и Springer.

На основании экспертных заключений редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи и в спорных случаях привлекает дополнительных рецензентов. По решению редколлегии рукопись может быть принята к публикации в представленном виде, отправлена авторам на доработку или отклонена. Основанием для отклонения рукописи являются недостаточно высокие оценки при рецензировании вследствие несоответствия профилю или уровню публикаций журнала.

Рукопись, получившая высшую оценку двух независимых рецензентов, печатается со специальной пометкой «Ускоренная публикация» (срок публикации — 3–4 месяца).

В случае необходимости рукопись направляется авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, после чего она повторно рецензируется, и редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости рукописи для публикации. В начале публикуемой статьи приводятся даты первоначального поступления рукописи в редакцию, поступления после окончательной доработки и принятия к публикации.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение трех месяцев после получения авторами отзывов; в противном случае рукопись рассматривается как вновь поступившая — ей присваивается новый регистрационный номер и ставится новая дата поступления в редакцию.

В журнале принято «одностороннее слепое рецензирование» (single blind review), т.е. авторам недоступны имена рецензентов, и редакция строго соблюдает конфиденциальность рецензентов. Все редакционные письма авторам идут за подписью Ответственного ученого секретаря журнала.

4.3. С 2003 г. редакция приступила к практике предварительной публикации рукописей (*Papers in Press*) на сайте *Biochemistry (Moscow)* (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) до выхода в свет статьи.

На сайте размещаются экспериментальные статьи на английском языке, получившие высокие оценки при рецензировании и принятые к публикации.

4.4. На всех стадиях работы с рукописями, а также для общения с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи адресу электронной почты и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

4.5. Через месяц после сдачи очередного выпуска журнала в печать редакция рассылает авторам по электронной почте корректуру статьи в виде PDF-файла и инструкцию по работе с ней.

На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если все же это необходимо, то вопрос решается редколлегией; в крайнем случае, статья переносится в другой номер.

5. Англоязычный вариант журнала

5.1. Каждый выпуск журнала готовится одновременно на русском и английском языках.

Перевод статей осуществляет группа высококвалифицированных переводчиков-биохимиков. В ходе работы у переводчиков часто возникает необходимость связаться с авторами и устранить неточности в русском тексте статьи. Согласованные с авторами исправления вносятся и в русский, и в английский тексты на стадии корректуры.

Авторы, достаточно хорошо владеющие профессиональным английским языком, представляют в редакцию свой **аутентичный** перевод статьи.

5.2. Переводы редактируются английской редакцией журнала, и подготовленный текст направляется авторам для корректировки.

5.3. После выхода журнала в свет редакция рассылает авторам оттиски русского и английского вариантов статей в виде PDF-файлов.