СОДЕРЖАНИЕ

Том 85, выпуск 6, 2020

Роль разделения жидких фаз в компартментализации клеточного ядра и пространственной организации генома (обзор)	7.5.5
С.В. Разин, А.А. Гаврилов	/55
Использование регуляторов энергетики клетки для замедления старения тканей и органов (обзор)	
С.С. Соколов, Ф.Ф. Северин	763
Вовлеченность SASH1 в поддержание стабильной межклеточной адгезии А.С. Ильницкая, И.Ю. Житняк, Н.А. Глушанкова	774
Оммохромы сложного глаза насекомых: физико-химические свойства и антиоксидантная активность	
А.Е. Донцов, Н.Л. Сакина, М.А. Яковлева, А.И. Бастраков, И.Г. Бастракова, А.А. Загоринский, Н.А. Ушакова, Т.Б. Фельдман, М.А. Островский	783
Функциональная связь фикоэритрина с фотосистемой II у криптофитовой водоросли <i>Rhodomonas salina</i>	
И.Н. Стадничук, Т.М. Новикова, Г.С. Минюк, <u>В.А. Бойченко</u> , Ю.В. Болычевцева, Е.С. Гусев, Е.П. Лукашев	796
Высокоактивная рекомбинантная формиатдегидрогеназа патогенных бактерий Staphylococcus aureus: получение и кристаллизация	
А.А. Пометун, К.М. Бойко, Т.С. Юрченко, А.Ю. Николаева, И.С. Каргов, Д.Л. Атрошенко, С.С. Савин, В.О. Попов, В.И. Тишков	807
Эволюционная утрата способности первичного донора электрона фотосистемы 1 к редокс-взаимодействию с Mn-бикарбонатными комплексами	
В.В. Терентьев, С.К. Жармухамедов	817
Влияние замен остатка цистеина в составе мотива GCSAG активного центра на свойства эстеразы PMGL2	
М.В. Крюкова, Л.Е. Петровская, К.А. Новотоцкая-Власова, Е.А. Крюкова, С.А. Якимов, А.Ю. Николаева, К.М. Бойко, Д.А. Долгих, М.П. Кирпичников	831
Создание продуцента хитиназы и использование её препарата для разрушения клеточной стенки микроскопических грибов	
О.А. Синицына, Е.А. Рубцова, И.Г. Синельников, Д.О. Осипов, А.М. Рожкова, В.Ю. Матыс, Т.В. Бубнова, В.А. Немашкалов, А.С. Середа, Л.А. Щербакова, А.П. Синицын	840

Vol. 85, Publ. 6, 2020

=

Ξ

The Role of Liquid–Liquid Phase Separation in the Compartmentalization of Cell Nucleus and Spatial Genome Organization (Review)	
S. V. Razin and A. A. Gavrilov	755
Manipulating Cellular Energetics for Slowing the Aging of Tissues and Organs (Review) S. S. Sokolov and F. F. Severin	763
Involvement of SASH1 in the Maintenance of Stable Cell–Cell Adhesion A. S. Ilnitskaya, I. Y. Zhitnyak, and N. A. Gloushankova	774
 Ommochromes of the Complex Eye of Insects: Physicochemical Properties and Antioxidant Activity A. E. Dontsov, N. L. Sakina, M. A. Yakovleva, A. I. Bastrakov, I. G. Bastrakova, A. A. Zagorinsky, N. A. Ushakova, T. B. Feldman, and M. A. Ostrovsky 	783
Phycoerythrin Connection with Photosystem II in the Cryptophyte Alga Rhodomonas salina I. N. Stadnichuk, T. M. Novikova, G. S. Miniuk, V. A. Boichenko, Yu. V. Bolychevtseva, E. S. Gusev, and E. P. Lukashev	796
 Highly Active Recombinant Formate Dehydrogenase from Pathogenic Bacterium Staphylococcus aureus: Preparation and Crystallization A. A. Pometun, K. M. Boyko, T. S. Yurchenko, A. Yu. Nikolaeva, I. S. Kargov, D. L. Atroshenko, S. S. Savin, V. O. Popov, and V. I. Tishkov 	807
Evolutionary Loss of the Ability of the Photosystem I Primary Electron Donor for the Redox Interaction with Mn-Bicarbonate Complexes <i>V. V. Terentyev and S. K. Zharmukhamedov</i>	817
The Influence of Substitutions of the Cysteine Residue in GCSAG Motif of the Active Center on the Properties of the PMGL2 Esterase <i>M. V. Kryukova, L. E. Petrovskaya, K. A. Novototskaya-Vlasova, E. A. Kryukova, S. A. Yakimov,</i> <i>A. Y. Nikolaeva, K. M. Boyko, D. A. Dolgikh, and M. P. Kirpichnikov</i>	831
 Development of the Chitinase Producer and Use of Enzyme Preparation for Disruption of Mycelial Fungal Cell Wall O. A. Sinitsyna, E. A. Rubtsova, I. G. Sinelnikov, D. O. Osipov, A. M. Rozhkova, V. Yu. Matys, T. V. Bubnova, V. A. Nemashkalov, A. S. Sereda, L. A. Tcsherbakova, and A. P. Sinitsyn 	840

УДК 576.315.42

РОЛЬ РАЗДЕЛЕНИЯ ЖИДКИХ ФАЗ В КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЯДРА И ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАШИИ ГЕНОМА

Обзор

© 2020 С.В. Разин^{1,2*}, А.А. Гаврилов¹

¹ Институт биологии гена Российской академии наук. 119334 Москва, Россия; электронная почта: sergey.v.razin@usa.net ² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический университет, 119991 Москва, Россия

> Поступила в редакцию 24.03.2020 После доработки 07.04.2020 Принята к публикации 09.04.2020

 Φ ункциональная компартментализация клеточного ядра играет важную роль в регуляции работы генома, обеспечивая возможность концентрации ферментов в реакционных центрах, таких как транскрипционные фабрики, тельца Кахаля, спеклы и др. Механизмы, обеспечивающие функциональную компартментализацию клеточного ядра, не до конца изучены. В настоящее время есть веские основания полагать, что ведущую роль здесь играет физический процесс разделения жидких фаз. В этом кратком обзоре проанализированы экспериментальные работы, демонстрирующие, что разделение жидких фаз не только обеспечивает функциональную компартментализацию клеточного ядра, но и вносит важный вклад в формирование 3D архитектуры генома.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: разделение жидких фаз, хроматин, клеточное ядро, транскрипция, ядерный компартмент, пространственная организация генома. DOI: 10.31857/S0320972520060019

ВВЕДЕНИЕ

На роль стохастических процессов в компартментализации клеточного ядра обратили внимание сравнительно недавно в связи с демонстрацией того, что энтропийные силы, возникающие при очень высокой концентрации макромолекул, имеющей место в клеточном ядре (т. н. условия макромолекулярного краудинга), играют важную роль в формировании ядрышка, телец Кахаля, PML-телец и ряда других функциональных внутриядерных компартметов [1-4]. В данном обзоре функциональным компартментом обозначен локальный участок клеточного ядра, в котором концентрация ферментов и вспомогательных факторов, участвующих в осуществлении того или иного функционального процесса, существенно превышает таковую в остальных частях ядра. Функциональные компартменты включают т.н. ядерные тельца (тельца Кахаля, PML-тельца, спеклы и др.), но не ограничиваются ими. К числу функциональных компартментов можно отнести, например, приламеллярный и околоядрышковый слои ядра, где сосредоточена значительная часть неактивного хроматина. Было показано, что ядерные тельца легко разбираются при снижении уровня макромолекулярного краудинга и восстанавливаются при его повышении. Силы, возникающие в условиях макромолекулярного краудинга, способствуют агрегации любых крупных объектов [3]. Например, агрегации инициированных транскрипционных комплексов с образованием т.н. транскрипционных фабрик [5]. Однако неспецифическая агрегация тех или иных макромолекул и их комплексов не может объяснить многих свойств ядерных телец, которые характеризуются, в частности, сферической формой, способностью объединяться и быстрым обменом составляющими их компонентами с окружающей средой. Все это типично для объектов, возникших в результате разделения жидких фаз [6, 7]. Примером таких объектов могут служить капельки жира в водной среде. Для того, чтобы начался процесс разделения жидких фаз, необ-

Принятые сокращения: IDR (intrinsically disordered regions) - неструктурированный домен; IC (interchromatin compartment) – интерхроматиновый компартмент.

^{*} Адресат для корреспонденции.

ходимо, чтобы составляющие выделяющуюся фазу компоненты были способны взаимодействовать друг с другом, причем взаимодействия должны быть множественными и неспецифическими [8]. Показано, что такие взаимодействия легко возникают между неструктурированными (дезорганизованными) доменами (intrinsically disordered regions, IDRs), присутствующими в составе многих ядерных белков, в том числе гистонов и белков гетерохроматина [9–16]. Будучи сконцентированными в ограниченном пространстве, эти белки легко устанавливают множественные взаимодействия, приводящие к выделению их в отдельную жидкую фазу [8] (рис. 1). Характер взаимодействий может быть различным, однако в биологических системах наиболее часто разделение жидких фаз стимулируется гидрофобными взаимодействиями между IDR. Такие взаимодействия весьма чувствительны к обработке 2,6-гександиолом [17], в силу чего эта обработка используется для тестирования предположения о том, что изучаемый объект возник в силу разделения жидких фаз [13, 18, 19]. Типичным примером внутриядерного компартмента, возникшего посредством разделения жидких фаз, является ядрышко [20]. Находящиеся внутри ядрышка фибриллярные центры, в составе которых присутствует активная РНК полимераза I, выделяются из остальной части ядрышка также благодаря разделению жидких фаз [21]. Таким образом, ядрышко является многкомпонентной системой, сформированной посредством разделения жидких фаз [22]. На первый взгляд, существует некое противоречие между тем, что ядерные компартменты являются относительно специфичными (т.е. содержат определенные наборы белков), в то время как процесс выделения жидких фаз базируется на неспецифических взаимодействиях. В действительности, никакого противоречия здесь нет. Для того, чтобы инициировать процесс разделения жидких фаз, необходимо обеспечить высокую локальную концентрацию способных к взаимодействию белков. Это становится возможным благодаря мультимеризации, либо привлечения к некой платформе белков, обладающих способностью специфически связываться с этой платформой (рис. 1).

Платформой может быть белок, например, белок PML в PML тельцах [23, 24], или некодирующая РНК, например, NEAT в параспеклах [25-27]. Индуцированная светом определенной длины мультимеризация химерных белков используется в оптогенетической системе, позволяющей оценить потенциал различных IDR к образованию фазовых конденсатов [28]. В этой системе тестируемый IDR экспрессируется в составе химерного белка с активируемым светом, мультимеризующимся доменом белка Cry2 Arabidopsis thaliana. При достижении некой пороговой концентрации химерного белка в клетках облучение их голубым светом приводит к мультимеризации химерного белка и последующему разделению жидких фаз в том случае, когда тестируемые IDR способны к неспецифическому взаимодействию.



Рис. 1. Принцип разделения жидких фаз в клеточном ядре. Белки, несущие неструктурированные домены, взаимодействуют с общей структурной платформой, роль которой может выполнять белок или РНК. Дальнейшее взаимодействие неструктурированных доменов между собой приводит к образованию «белковой капли». (С цветным вариантом рис. 1 и 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

РОЛЬ РАЗДЕЛЕНИЯ ЖИДКИХ ФАЗ В ГЛОБАЛЬНОЙ КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИИ ЯДРА

Говоря о компартментализации клеточного ядра, стоит прежде всего упомянуть хроматиновый домен, состоящий из связанных друг с другом хромосомных территорий. Излишне говорить о том, что в этом домене крайне высока концентрация гистонов. Хорошо известно, что нуклеосомы могут устанавливать контакты через посредство *N*-концевых доменов гистонов [29-32]. Наиболее популярная модель объясняет установление таких контактов электростатическим взаимодействием *N*-концевого домена гистона Н4 с отрицательно заряженным доменом (acidic patch) на поверхности соседней нуклеосомной глобулы [33-36]. Однако ряд результатов позволяет полагать, что не менее важным для опосредованной межнуклеосомными взаимодействиями конденсации хроматина является процесс разделения жидких фаз [37]. Разные типы хроматина, по-видимому, обладают неодинаковой способностью к выделению в обособленную фазу. Так, процесс образования фазовых конденсатов существенно стимулируется гистоном H1, который в присутствии ДНК способен образовывать фазовые конденсаты *in vitro* [38]. Многие белки гетерохроматина, в том числе HP1 и белки комплексов Polycomb, также содержат IDR, способные взаимодействовать с образованием фазовых конденсатов [13, 14, 39-41]. В ряде ситуаций жидкие фазовые конденсаты могут в последующем переходить в гелеобразное состояние [39, 42]. Этот процесс фактически сводится к переходу от жидкого фазового конденсата к полимерному фазовому конденсату, возникновение которого обеспечивается установлением внутренних сшивок в полимере. Среди компонентов активного хроматина также есть белки, способные при определенных концентрациях формировать фазовые конденсаты [37]. IDR присутствуют в составе самой РНК полимеразы II, медиатора и многих транскрипционных факторов [15, 16, 43, 44].

В силу всего сказанного выше можно полагать, что хроматиновый домен в целом выделяется внутри ядра посредством фазового перехода. Более того, сам по себе хроматиновый домен состоит из двух раличающихся фазовых конденсатов, соответствующих эухроматину и гетерохроматину. Анализ хромосомных территорий, выполненный с использованием микроскопии высокого разрешения, свидетельствует о том, что хромосомные территории состоят из глобулярных структур, содержащих ~ 1000 т.п.н. ДНК, на поверхности которых находится актив-

ный хроматин, а внутри – неактивный [45, 46]. Хроматиновый домен пронизывают так называемые интерхроматиновые каналы, совокупность которых составляет интерхроматиновый компартмент (interchromatin compartment, IC), который служит для транспорта различных макромолекул, в том числе, новосинтезированных РНК, а также является местом расположения различных ядерных структур, таких как ядрышко, спеклы, тельца Кахаля и др. [45-47]. Механизмы, обеспечивающие существование IC, не вполне понятны. Не исключено, что и здесь важную роль играет процесс разделения жидких фаз, потому что заполняющие ІС РНК и РНКсвязывающие белки могут взаимодействовать друг с другом, стимулируя процесс фазового разделения [48, 49].

Важную роль в глобальной организации клеточного ядра играют расположенные в ІС функциональные компартменты, многие из которых являются фазовыми конденсатами [40]. Если говорить о глобальной организации ядра, то прежде всего следует обратить внимание на компартменты, играющие важную роль в пространственной организации хроматинового домена посредством привлечения к ним определенных типов хроматина. Давно известно, что значительная часть неактивного хроматина расположена рядом с ядрышком [50, 51]. Результаты полногеномных исследований, выполненных с использованием новых экспериментальных подходов, позволяющих картировать гены, расположенные рядом с различными ядерными компартментами, показывают, что ядрышко составляет своего рода инактивирующий хаб, рядом с которым сосредоточены неактивные гены [52, 53]. Другим таким хабом является ядерная ламина [52]. Активные гены предпочтительно сосредоточены рядом со спеклами [52, 53], которые также являются ядерными компартментами, возникающими вследствие разделения жидких фаз. В спеклах сосредоточены факторы сплайсинга. Предполагается, что привлечение к этим компартментам активных генов обеспечивает возможность быстрого процессинга новосинтезированных транскриптов. Существуют и другие объяснения повышения уровня транскрипции генов, расположенных рядом со спеклами [54]. Хорошо изученными ядерными компартментами, возникающими посредством разделения жидких фаз, являются тельца Кахаля. В этих тельцах сосредоточены ферменты, участвующие в модификации малых ядерных РНК, процессинге концов не подвергающейся полиаденилированию РНК и ряде других процессов [55]. Подобно спеклам, тельца Кахаля также являются некими хабами, к которым могут привлекаться различные гены вне зависимости от близости их расположения на ДНК [56, 57].

Еще одним типом внутриядерных компартментов, который стоит упомянуть в нашей дискуссии, являются транскрипционные фабрики. Достаточно давно было показано, что инициированные и элонгирующие молекулы РНК полимеразы II собраны в кластеры, которые и получили название «транскрипционные фабрики» [58–61]. Механизмы формирования транскрипционных фабрик и возможная роль этих структур обсуждается в литературе в течение 25 лет [5, 58, 62, 63]. В последние годы появились убедительные свидетельства того, что кластеризация транскрипционных комплексов обеспечивается процессом разделения жидких фаз, регулируемого фосфорилированием С-концевого домена РНК полимеразы II [15]. Важно, что к транскрипционным фабрикам могут привлекаться гены, расположенные на значительных геномных расстояниях, а иногда и на разных хромосомах [64, 65]. То же справедливо и для привлечения генов к ядрышку или спеклам. В результате отдельные хромосомные территории оказываются объединенными в единый хроматиновый домен. Этот домен является достаточно эластичным в силу того, что уровень компактизации хроматина может изменяться в широких пределах в ответ на различные воздействия, например, в ответ на гипотонический шок. Было показано, что, будучи прикрепленным одновременно к ядрышку и ядерной ламине, хроматин механически растянут. Утрата заякориваний на ядерной ламине приводит к сокращению объема хроматинового домена [66].

РОЛЬ РАЗДЕЛЕНИЯ ЖИДКИХ ФАЗ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Отличительной особенностью систем контроля транскрипции в эукариотической клетке является наличие удаленных энхансеров. По современным представлениям, количество энхансеров в геноме человека, по меньшей мере, в 10 раз превосходит количество промоторов [67, 68]. Механизм действия энхансеров остается предметом дискуссий [69]. В последние годы опубликовано несколько работ, указывающих на то, что на энхансере формируется активаторный комплекс, обогащенный различными транскрипционными факторами и компонентами транскрипционного аппарата [70]. В формировании данного комплекса ключевую роль играет процесс разделения жидких фаз, направляемый взаимодействием неструктурированных доменов, присутствующих в составе РНК полимеразы, медиатора и многих транскрипционных факторов [18, 70, 71]. Необходимая для инициации процесса разделения жидких фаз концентрация взаимодействующих компонентов обеспечивается наличием множественных сайтов их связывания в границах энхансера. Роль платформы, привлекающей дополнительные белки, может играть энхансерная РНК [72, 73]. Суперэнхансеры, как правило, состоят из нескольких энхансерных модулей, разделенных спейсерами различной длины. Выпетливание разделяющих энхансерные модули сегментов хроматиновой фибриллы позволяет объединиться собранным на этих доменах активаторным комплексам в единый комплекс [70]. Процесс этот может происходить без каких-либо затрат энергии, так как способность к слиянию является внутренним свойством жидких фазовых конденсатов [74]. Для того, чтобы быть активированным тем или иным энхансером, промотор должен оказаться внутри активаторного комплекса, собранного на этом энхансере. Повидимому, это происходит аналогично процессу объединения доменов суперэнхансера. На промоторе собирается свой жидкий конденсат, компоненты которого (транскрипционные факторы, РНК полимераза и т.д.) в значительной мере перекрываются компонентами собранного на энхансере активаторного комплекса [15, 75]. Такие комплексы могут легко слиться, в результате чего промотор будет удерживаться в среде, обеспечивающей благоприятные условия для его работы [71] (рис. 2). Детали всех этих процессов еще предстоит выяснить. В настоящее время продемонстрировано, что на суперэнхансерах формируются фазовые конденсаты, содержащие различные факторы транскрипции, РНК полимеразу II и медиатор, и что к этим конденсатам привлекаются активные гены, работа которых направляется данными суперэнхансерами [18, 19]. Открытыми остаются вопросы о том, как определяется специфика активации суперэнхансером определенных промоторов, как происходит освобождение элонгирующей РНК полимеразы из энхансерпромоторного комплекса, влияет ли энхансер на процесс элонгации и т.д. Недавно было продемонстрировано, что фосфорилирование Сконцевого домена РНК полимеразы II регулирует ее сродство к конденсатам, содержащим медиатор, и конденсатам, содержащим факторы сплайсинга [76]. Можно ожидать, что в ближайшее время число примеров регулируемого перемещения макромолекул между различными фазовыми компартментами существенно возрастет.



Рис. 2. Роль жидкостного разделения фаз в коммуникации энхансеров и промоторов. Транскрипционные факторы связываются с энхансером и промотором с образованием жидкостных конденсатов. Дальнейшее слияние конденсатов обеспечивает сближение промотора и энхансера и активацию транскрипции

Изучение роли разделения жидких фаз в клеточном ядре стало одним из наиболее динамично развивающихся направлений в молекулярной биологии. Иногда складывается впечатление, что разделением жидких фаз пытаются объяснить все, что происходит в клеточном ядре. При этом нередко игнорируются те факты, которые не укладываются в развиваемую модель. В этой связи хотелось бы обратить внимание на необходимость более взвешенного анализа результатов. Если говорить о роли разделения жидких фаз в формировании хроматиновых доменов, то стоит указать на то, что многие результаты, указывающие на способность гистонов и белков гетерохроматина образовывать фазовые конденсаты, получены в экспериментах in vitro [37]. Результаты экспериментов, предпринятых для того, чтобы продемонстрировать роль разделения жидких фаз в формировании гетерохроматина в живых клетках, остаются довольно противоречивыми [13, 77]. Критерии фазовых конденсатов остаются размытыми, и далеко не все объекты, которые принято считать фазо-

кты, ции комплекса различных механизмов, вклад каждого из которых будет различен в конкретных случаях. Так, формирование гетерохромаанаиновых доменов может начинаться с разделения жидких фаз и заканчиваться образованием гелей, которые по ряду параметров существенно отличаются от жидких конденсатов [39, 42]. Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 18-14-00011).

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

выми конденсатами, удовлетворяют всем этим

критериям [42, 78]. Не отрицая важную роль

процесса разделения жидких фаз в формирова-

нии внутриядерной архитектуры, включая и 3D

организацию генома, мы полагаем, что вся эта организация складывается в результате коопера-

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Hancock, R. (2004) Internal organisation of the nucleus: assembly of compartments by macromolecular crowding and the nuclear matrix model, *Biol. Cell*, **96**, 595-601.
- Hancock, R. (2004) A role for macromolecular crowding effects in the assembly and function of compartments in the nucleus, *J. Struct. Biol.*, **146**, 281-290, doi: 10.1016/ j.jsb.2003.12.008.
- Hancock, R. (2018) Crowding, entropic forces, and confinement: crucial factors for structures and functions in the cell nucleus, *Biochemistry (Moscow)*, 83, 326-337, doi: 10.1134/S0006297918040041.
- Marenduzzo, D., Finan, K., and Cook, P. R. (2006) The depletion attraction: an underappreciated force driving cellular organization, *J. Cell. Biol.*, 175, 681-686, doi: 10.1083/jcb.200609066.
- Razin, S. V., Gavrilov, A. A., Pichugin, A., Lipinski, M., Iarovaia, O. V., and Vassetzky, Y. S. (2011) Transcription factories in the context of the nuclear and genome organization, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9085-9092, doi: 10.1093/ nar/gkr683.
- 6. Erdel, F., and Rippe, K. (2018) Formation of chromatin subcompartments by phase separation, *Biophys. J.*, **114**, 2262-2270, doi: 10.1016/j.bpj.2018.03.011.
- Boeynaems, S., Alberti, S., Fawzi, N. L., Mittag, T., Polymenidou, M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Shorter, J., Wolozin, B., Van Den Bosch, L., Tompa, P., and Fuxreiter, M. (2018) Protein phase separation: a new phase in cell biology, *Trends Cell. Biol.*, 28, 420-435, doi: 10.1016/j.tcb. 2018.02.004.
- Uversky, V. N. (2017) Protein intrinsic disorder-based liquid–liquid phase transitions in biological systems: complex coacervates and membrane-less organelles, *Adv. Coll. Interface Sci.*, 239, 97-114, doi: 10.1016/j.cis.2016.05.012.
- Meng, F., Na, I., Kurgan, L., and Uversky, V. N. (2015) Compartmentalization and functionality of nuclear disorder: intrinsic disorder and protein–protein interactions in intra-nuclear compartments, *Intern. J. Mol. Sci.*, 17, doi: 10.3390/ijms17010024.
- Darling, A. L., Liu, Y., Oldfield, C. J., and Uversky, V. N. (2018) Intrinsically disordered proteome of human membrane-less organelles, *Proteomics*, 18, e1700193, doi: 10.1002/pmic.201700193.
- 11. Uversky, V. N. (2017) Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: membrane-less organelles, phase separation, and intrinsic disorder, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **44**, 18-30, doi: 10.1016/j.sbi.2016.10.015.
- Turner, A. L., Watson, M., Wilkins, O. G., Cato, L., Travers, A., Thomas, J. O., and Stott, K. (2018) Highly disordered histone H1-DNA model complexes and their condensates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 11964-11969, doi: 10.1073/pnas.1805943115.
- Larson, A. G., Elnatan, D., Keenen, M. M., Trnka, M. J., Johnston, J. B., Burlingame, A. L., Agard, D. A., Redding, S., and Narlikar, G. J. (2017) Liquid droplet formation by HP1alpha suggests a role for phase separation in heterochromatin, *Nature*, 547, 236-240, doi: 10.1038/ nature22822.
- Tatavosian, R., Kent, S., Brown, K., Yao, T., Duc, H. N., Huynh, T. N., Zhen, C. Y., Ma, B., Wang, H., and Ren, X. (2019) Nuclear condensates of the polycomb protein chromobox 2 (CBX2) assemble through phase separation, *J. Biol. Chem.*, **294**, 1451-1463, doi: 10.1074/jbc.RA118. 006620.
- Boehning, M., Dugast-Darzacq, C., Rankovic, M., Hansen, A. S., Yu, T., Marie-Nelly, H., McSwiggen, D. T., Kokic, G., Dailey, G. M., Cramer, P., Darzacq, X., and Zweckstetter, M. (2018) RNA polymerase II clustering

through carboxy-terminal domain phase separation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 833-840, doi: 10.1038/s41594-018-0112-y.

- Nagulapalli, M., Maji, S., Dwivedi, N., Dahiya, P., and Thakur, J. K. (2016) Evolution of disorder in mediator complex and its functional relevance, *Nucleic Acids Res.*, 44, 1591-1612, doi: 10.1093/nar/gkv1135.
- 17. Alberti, S., Gladfelter, A., and Mittag, T. (2019) Considerations and challenges in studying liquid–liquid phase separation and biomolecular condensates, *Cell*, **176**, 419-434, doi: 10.1016/j.cell.2018.12.035.
- Sabari, B. R., Dall'Agnese, A., Boija, A., Klein, I. A., Coffey, E. L., Shrinivas, K., Abraham, B. J., Hannett, N. M., Zamudio, A. V., Manteiga, J. C., Li, C. H., Guo, Y. E., Day, D. S., Schuijers, J., Vasile, E., Malik, S., Hnisz, D., Lee, T. I., Cisse, I. I., Roeder, R. G., et al. (2018) Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control, *Science*, **361**, doi: 10.1126/science.aar3958.
- Cho, W. K., Spille, J. H., Hecht, M., Lee, C., Li, C., Grube, V., and Cisse, I. I. (2018) Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates, *Science*, **361**, 412-415, doi: 10.1126/science. aar4199.
- Hernandez-Verdun, D. (2006) The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions, *Histochem. Cell. Biol.*, **126**, 135-148, doi: 10.1007/s00418-006-0212-3.
- Yao, R. W., Xu, G., Wang, Y., Shan, L., Luan, P. F., Wang, Y., Wu, M., Yang, L. Z., Xing, Y. H., Yang, L., and Chen, L. L. (2019) Nascent pre-rRNA sorting *via* phase separation drives the assembly of dense fibrillar components in the human nucleolus, *Mol. Cell*, **76**, 767-783, e711, doi: 10.1016/j.molcel.2019.08.014.
- 22. Correll, C. C., Bartek, J., and Dundr, M. (2019) The nucleolus: a multiphase condensate balancing ribosome synthesis and translational capacity in health, aging and ribosomopathies, *Cells*, **8**, doi: 10.3390/cells8080869.
- Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T., Strauss, J. F., 3rd, and Maul, G. G. (1999) PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1, *J. Cell. Biol.*, 147, 221-234, doi: 10.1083/jcb.147.2.221.
- 24. Lallemand-Breitenbach, V., and de The, H. (2010) PML nuclear bodies, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2, a000661.
- 25. Yamazaki, T., Nakagawa, S., and Hirose, T. (2020) Architectural RNAs for membraneless nuclear body formation, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, doi: 10.1101/sqb.2019.84.039404.
- Fox, A. H., and Lamond, A. I. (2010) Paraspeckles, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2, a000687, doi: 10.1101/csh-perspect.a000687.
- Fox, A. H., Nakagawa, S., Hirose, T., and Bond, C. S. (2018) Paraspeckles: where long noncoding RNA meets phase separation, *Trends Biochem. Sci.*, 43, 124-135, doi: 10.1016/j.tibs.2017.12.001.
- Shin, Y., Berry, J., Pannucci, N., Haataja, M. P., Toettcher, J. E., and Brangwynne, C. P. (2017) Spatiotemporal control of intracellular phase transitions using light-activated optodroplets, *Cell*, 168, 159-171, doi: 10.1016/j.cell.2016.11.054.
- Zhou, J., Fan, J. Y., Rangasamy, D., and Tremethick, D. J. (2007) The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14, 1070-1076.
- Kalashnikova, A. A., Porter-Goff, M. E., Muthurajan, U. M., Luger, K., and Hansen, J. C. (2013) The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin

structure, J. Royal Soc. Interface/Royal Soc., 10, 20121022, doi: 10.1098/rsif. 2012.1022.

- Sinha, D., and Shogren-Knaak, M. A. (2010) Role of direct interactions between the histone H4 tail and the H2A core in long range nucleosome contacts, *J. Biol. Chem.*, 285, 16572-16581, doi: 10.1074/jbc.M109.091298.
- Pepenella, S., Murphy, K. J., and Hayes, J. J. (2014) Intraand inter-nucleosome interactions of the core histone tail domains in higher-order chromatin structure, *Chromosoma*, **123**, 3-13, doi: 10.1007/s00412-013-0435-8.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution, *Nature*, **389**, 251-260, doi: 10.1038/38444.
- Schalch, T., Duda, S., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (2005) X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre, *Nature*, 436, 138-141, doi: 10.1038/nature03686.
- Chodaparambil, J. V., Barbera, A. J., Lu, X., Kaye, K. M., Hansen, J. C., and Luger, K. (2007) A charged and contoured surface on the nucleosome regulates chromatin compaction, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14, 1105-1107, doi: 10.1038/nsmb1334.
- Chen, Q., Yang, R., Korolev, N., Liu, C. F., and Nordenskiold, L. (2017) Regulation of nucleosome stacking and chromatin compaction by the histone H4 N-terminal tail-H2A acidic patch interaction, *J. Mol. Biol.*, **429**, 2075-2092, doi: 10.1016/j.jmb.2017.03.016.
- Gibson, B. A., Doolittle, L. K., Schneider, M. W. G., Jensen, L. E., Gamarra, N., Henry, L., Gerlich, D. W., Redding, S., and Rosen, M. K. (2019) Organization of chromatin by intrinsic and regulated phase separation, *Cell*, **179**, 470-484, doi: 10.1016/j.cell.2019.08.037.
- Shakya, A., Park, S., Rana, N., and King, J. T. (2020) Liquid–liquid phase separation of histone proteins in cells: role in chromatin organization, *Biophys. J.*, **118**, 753-764, doi: 10.1016/j.bpj.2019.12.022.
- Strom, A. R., Emelyanov, A. V., Mir, M., Fyodorov, D. V., Darzacq, X., and Karpen, G. H. (2017) Phase separation drives heterochromatin domain formation, *Nature*, 547, 241-245, doi: 10.1038/nature22989.
- Strom, A. R., and Brangwynne, C. P. (2019) The liquid nucleome – phase transitions in the nucleus at a glance, *J. Cell. Sci.*, 132, jcs235093, doi: 10.1242/jcs.235093.
- Plys, A. J., Davis, C. P., Kim, J., Rizki, G., Keenen, M. M., Marr, S. K., and Kingston, R. E. (2019) Phase separation of polycomb-repressive complex 1 is governed by a charged disordered region of CBX2, *Genes Dev.*, **33**, 799-813, doi: 10.1101/gad. 326488.119.
- 42. Peng, A., and Weber, S. C. (2019) Evidence for and against liquid–liquid phase separation in the nucleus, *Noncoding RNA*, **5**, doi: 10.3390/ncrna5040050.
- Boija, A., Klein, I. A., Sabari, B. R., Dall'Agnese, A., Coffey, E. L., Zamudio, A. V., Li, C. H., Shrinivas, K., Manteiga, J. C., Hannett, N. M., Abraham, B. J., Afeyan, L. K., Guo, Y. E., Rimel, J. K., Fant, C. B., Schuijers, J., Lee, T. I., Taatjes, D. J., and Young, R. A. (2018) Transcription factors activate genes through the phase-separation capacity of their activation domains, *Cell*, **175**, 1842-1855, doi: 10.1016/j.cell.2018.10.042.
- 44. Tarczewska, A., and Greb-Markiewicz, B. (2019) The significance of the intrinsically disordered regions for the functions of the bHLH transcription factors, *Intern. J. Mol. Sci.*, **20**, doi: 10.3390/ijms20215306.
- Cremer, T., and Cremer, M. (2010) Chromosome territories, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2, a003889, doi: 10.1101/cshperspect.a003889.
- 46. Cremer, T., Cremer, M., Hubner, B., Silahtaroglu, A., Hendzel, M., Lanctot, C., Strickfaden, H., and Cremer, C.

(2020) The interchromatin compartment participates in the structural and functional organization of the cell nucleus, *BioEssays*, **42**, e1900132, doi: 10.1002/bies.201900132.

- Cremer, T., Cremer, M., and Cremer, C. (2018) The 4D nucleome: genome compartmentalization in an evolutionary context, *Biochemistry (Moscow)*, 83, 313-325, doi: 10.1134/S000629791804003X.
- Garcia-Jove Navarro, M., Kashida, S., Chouaib, R., Souquere, S., Pierron, G., Weil, D., and Gueroui, Z. (2019) RNA is a critical element for the sizing and the composition of phase-separated RNA-protein condensates, *Nat. Commun.*, **10**, 3230, doi: 10.1038/s41467-019-11241-6.
- Fay, M. M., and Anderson, P. J. (2018) The role of RNA in biological phase separations, *J. Mol. Biol.*, **430**, 4685-4701, doi: 10.1016/j.jmb.2018.05.003.
- Fedoriw, A. M., Starmer, J., Yee, D., and Magnuson, T. (2012) Nucleolar association and transcriptional inhibition through 5S rDNA in mammals, *PLoS Genet.*, 8, e1002468, doi: 10.1371/journal.pgen.1002468.
- Bersaglieri, C., and Santoro, R. (2019) Genome organization in and around the nucleolus, *Cells*, 8, doi: 10.3390/cells8060579.
- Chen, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Zhang, L., Brinkman, E. K., Adam, S. A., Goldman, R., van Steensel, B., Ma, J., and Belmont, A. S. (2018) Mapping 3D genome organization relative to nuclear compartments using TSA-Seq as a cytological ruler, *J. Cell. Biol.*, 217, 4025-4048, doi: 10.1083/ jcb.201807108.
- Quinodoz, S. A., Ollikainen, N., Tabak, B., Palla, A., Schmidt, J. M., Detmar, E., Lai, M. M., Shishkin, A. A., Bhat, P., Takei, Y., Trinh, V., Aznauryan, E., Russell, P., Cheng, C., Jovanovic, M., Chow, A., Cai, L., McDonel, P., Garber, M., and Guttman, M. (2018) Higher-order interchromosomal hubs shape 3D genome organization in the nucleus, *Cell*, **174**, 744-757, doi: 10.1016/j.cell.2018. 05.024.
- Kim, J., Venkata, N. C., Hernandez Gonzalez, G. A., Khanna, N., and Belmont, A. S. (2020) Gene expression amplification by nuclear speckle association, *J. Cell. Biol.*, 219, e201904046, doi: 10.1083/jcb.201904046.
- Dundr, M. (2012) Nuclear bodies: multifunctional companions of the genome, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 24, 415-422, doi: 10.1016/j.ceb.2012.03.010.
- 56. Sawyer, I. A., Sturgill, D., and Dundr, M. (2019) Membraneless nuclear organelles and the search for phases within phases, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **10**, e1514, doi: 10.1002/wrna.1514.
- 57. Wang, Q., Sawyer, I. A., Sung, M. H., Sturgill, D., Shevtsov, S. P., Pegoraro, G., Hakim, O., Baek, S., Hager, G. L., and Dundr, M. (2016) Cajal bodies are linked to genome conformation, *Nat. Commun.*, 7, 10966, doi: 10.1038/ncomms10966.
- Carter, D. R., Eskiw, C., and Cook, P. R. (2008) Transcription factories, *Biochem. Soc. Trans.*, 36, 585-589, doi: 10.1042/BST0360585.
- Hozak, P., Hassan, A. B., Jackson, D. A., and Cook, P. R. (1993) Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton, *Cell*, **73**, 361-373.
- Iborra, F. J., Pombo, A., Jackson, D. A., and Cook, P. R. (1996) Active RNA polymerases are localized within discrete transcription "factories" in human nuclei, *J. Cell. Sci.*, **109**, 1427-1436.
- Jackson, D. A., Hassan, A. B., Errington, R. J., and Cook, P. R. (1993) Visualization of focal sites of transcription within human nuclei, *EMBO J.*, 12, 1059-1065.
- 62. Sutherland, H., and Bickmore, W. A. (2009) Transcription factories: gene expression in unions? *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 457-466.

- 63. Cook, P. R., and Marenduzzo, D. (2018) Transcriptiondriven genome organization: a model for chromosome structure and the regulation of gene expression tested through simulations, *Nucl. Acids Res.*, **46**, 9895-9906, doi: 10.1093/nar/gky763.
- Osborne, C. S., Chakalova, L., Brown, K. E., Carter, D., Horton, A., Debrand, E., Goyenechea, B., Mitchell, J. A., Lopes, S., Reik, W., and Fraser, P. (2004) Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription, *Nat. Genet.*, 36, 1065-1071.
- Osborne, C. S., Chakalova, L., Mitchell, J. A., Horton, A., Wood, A. L., Bolland, D. J., Corcoran, A. E., and Fraser, P. (2007) Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh, *PLoS Biol.*, 5, e192.
- Ulianov, S. V., Doronin, S. A., Khrameeva, E. E., Kos, P. I., Luzhin, A. V., Starikov, S. S., Galitsyna, A. A., Nenasheva, V. V., Ilyin, A. A., Flyamer, I. M., Mikhaleva, E. A., Logacheva, M. D., Gelfand, M. S., Chertovich, A. V., Gavrilov, A. A., Razin, S. V., and Shevelyov, Y. Y. (2019) Nuclear lamina integrity is required for proper spatial organization of chromatin in *Drosophila*, *Nat. Commun.*, **10**, 1176, doi: 10.1038/s41467-019-09185-y.
- Arnold, C. D., Gerlach, D., Stelzer, C., Boryn, L. M., Rath, M., and Stark, A. (2013) Genome-wide quantitative enhancer activity maps identified by STARR-seq, *Science*, **339**, 1074-1077, doi: 10.1126/science.1232542.
- Consortium, E. P., Bernstein, B. E., Birney, E., Dunham, I., Green, E. D., Gunter, C., and Snyder, M. (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome, *Nature*, 489, 57-74, doi: 10.1038/nature11247.
- 69. Furlong, E. E. M., and Levine, M. (2018) Developmental enhancers and chromosome topology, *Science*, **361**, 1341-1345, doi: 10.1126/science.aau0320.
- Hnisz, D., Shrinivas, K., Young, R. A., Chakraborty, A. K., and Sharp, P. A. (2017) A phase separation model for transcriptional control, *Cell*, **169**, 13-23, doi: 10.1016/j.cell. 2017.02.007.
- Gurumurthy, A., Shen, Y., Gunn, E. M., and Bungert, J. (2019) Phase separation and transcription regulation: are super-enhancers and locus control regions primary sites of

transcription complex assembly? *BioEssays*, **41**, e1800164, doi: 10.1002/bies.201800164.

- Arnold, P. R., Wells, A. D., and Li, X. C. (2019) Diversity and emerging roles of enhancer RNA in regulation of gene expression and cell fate, *Front. Cell Develop. Biol.*, 7, 377, doi: 10.3389/fcell.2019.00377.
- 73. Nair, S. J., Yang, L., Meluzzi, D., Oh, S., Yang, F., Friedman, M. J., Wang, S., Suter, T., Alshareedah, I., Gamliel, A., Ma, Q., Zhang, J., Hu, Y., Tan, Y., Ohgi, K. A., Jayani, R. S., Banerjee, P. R., Aggarwal, A. K., and Rosenfeld, M. G. (2019) Phase separation of ligand-activated enhancers licenses cooperative chromosomal enhancer assembly, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 193-203, doi: 10.1038/s41594-019-0190-5.
- Hyman, A. A., Weber, C. A., and Julicher, F. (2014) Liquid–liquid phase separation in biology, *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.*, **30**, 39-58, doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013325.
- Cramer, P. (2019) Organization and regulation of gene transcription, *Nature*, **573**, 45-54, doi: 10.1038/s41586-019-1517-4.
- 76. Guo, Y. E., Manteiga, J. C., Henninger, J. E., Sabari, B. R., Dall'Agnese, A., Hannett, N. M., Spille, J. H., Afeyan, L. K., Zamudio, A. V., Shrinivas, K., Abraham, B. J., Boija, A., Decker, T. M., Rimel, J. K., Fant, C. B., Lee, T. I., Cisse, I. I., Sharp, P. A., Taatjes, D. J., and Young, R. A. (2019) Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates, *Nature*, **572**, 543-548, doi: 10.1038/s41586-019-1464-0.
- 77. Erdel, F., Rademacher, A., Vlijm, R., Tunnermann, J., Frank, L., Weinmann, R., Schweigert, E., Yserentant, K., Hummert, J., Bauer, C., Schumacher, S., Al Alwash, A., Normand, C., Herten, D. P., Engelhardt, J., and Rippe, K. (2020) Mouse heterochromatin adopts digital compaction states without showing hallmarks of HP1-driven liquid—liquid phase separation, *Mol. Cell*, doi: 10.1016/j.molcel.2020.02.005.
- Mir, M., Bickmore, W., Furlong, E. E. M., and Narlikar, G. (2019) Chromatin topology, condensates and gene regulation: shifting paradigms or just a phase? *Development*, 146, doi: 10.1242/dev.182766.

THE ROLE OF LIQUID–LIQUID PHASE SEPARATION IN THE COMPARTMENTALIZATION OF CELL NUCLEUS AND SPATIAL GENOME ORGANIZATION

Review

S. V. Razin^{1,2*} and A. A. Gavrilov¹

¹ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; E-mail: sergey.v.razin@usa.net ² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia

> Received March 24, 2020 Revised April 7, 2020 Accepted April 9, 2020

Functional compartmentalization of the cell nucleus plays an important role in the regulation of genome activity by providing accumulation of enzymes and auxiliary factors in the reaction centers, such as transcription factories, Cajal bodies, speckles, etc. The mechanisms behind the nucleus functional compartmentalization are still poorly understood. There are reasons to believe that the key role in the nucleus compartmentalization belongs to the process of liquid–liquid phase separation. In this brief review, we analyze results of experimental studies demonstrating that liquid–liquid phase separation not only governs functional compartmentalization of the cell nucleus but also contributes to the formation of the 3D genomic architecture.

Keywords: liquid–liquid phase separation, chromatin, cell nucleus, transcription, nuclear compartment, spatial genome organization

УДК 577.24

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ ЭНЕРГЕТИКИ КЛЕТКИ ДЛЯ ЗАМЕДЛЕНИЯ СТАРЕНИЯ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ*

Обзор

© 2020 С.С. Соколов, Ф.Ф. Северин**

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

> Поступила в редакцию 11.04.2020 После доработки 30.04.2020 Принята к публикации 01.05.2020

К настоящему времени опубликовано огромное количество геронтологических исследований. Тем не менее на сегодняшний день наиболее эффективными и достоверными способами продления здорового периода жизни является известное с древних времен ограничение по питанию. Физические нагрузки также являются хорошо известным геропротектором, особенно эффективно действующие на замедление старения скелетных мышц. В данном обзоре мы рассматриваем молекулярные механизмы действия физических нагрузок на мышечную ткань, а также обсуждаем возможность распространения этих способов для замедления старения всего организма. Непосредственно во время упражнения падает уровень АТР и, как и при голодании, активируется АМР-зависимая протеинкиназа, АМРК. Эта киназа стимулирует антиоксидантный потенциал клетки и дыхательную емкость митохондрий. Этому же способствует гормезисный ответ на окислительный стресс, возникающий во время нагрузок. Кроме того, во время упражнения происходит генерация активаторов mTOR. По окончании нагрузки уровень АТР повышается, что позволяет активацию mTOR. Таким образом, хронические упражнения попеременно усиливают как антиоксидантную защиту и биогенез митохондрий мышечной ткани (через АМРК и гормезисный ответ), так и стимулируют ее пролиферацию (через mTOR), что, в свою очередь, препятствует старческой атрофии мышц. Следуя нашей логике, попеременный прием фармакологических стимуляторов (і) АМРК в комбинации с индукторами небольшого окислительного стресса и (ii) mTOR мог бы частично заменить упражнения. В отличие от упражнений, искусственная активация АМРК происходит без падения уровня АТР. Возможно, применение разобщителей дыхания и окислительного фосфорилирования в фазе стимуляции АМРК может предотвратить негативные последствия, связанные с гипер-энергизацией клеток. Считается, что снижение как антиоксидантного, так и пролиферативного потенциала клеток является причинами старения многих тканей, не только мышечной. С нашей точки зрения, приведенная выше логика может быть применима к большинству тканей человеческого организма.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, ограничение питания, разобщители, геропротекторы, физическая нагрузка, mTOR, AMPK.

DOI: 10.31857/S0320972520060020

введение

За последние десятилетия произошел существенный интеллектуальный прорыв в области

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio. msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-093, 22.05.2020.

** Адресат для корреспонденции.

клеточной биологии. Сейчас, вероятно, основные молекулярные механизмы деления, дифференцировки, защиты от стресса, старения и запрограммированной смерти клетки уже известны. В то же время прогресс в понимании биологии клетки не привел к существенному прогрессу в области геронтологии. Следовательно, можно ожидать, что очередной прорыв в понимании механизмов старения произойдет на следующем за клеточным уровнем сложности, на уровне органов и тканей.

Для экспериментальных позвоночных животных, крыс и мышей, популярные в плане увеличения продолжительности жизни фармакологические препараты, как правило, увеличивают продолжительности жизни лишь на 10–30%. К таким препаратам относятся рапамицин, сали-

Принятые сокращения: $A\Phi K$ – активные формы кислорода; AMPK – AMP-зависимая протеинкиназа; AICAR – 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибофуранозид (5-aminoimidazole-4-сагbохатide ribonucleotide); IGF1 – инсулиноподобный фактор роста 1 (insulinlike growth factor 1); GH – гормон роста, соматотропин (growth hormone); MGF – фактор роста мышц (Muscle Growth Factor); mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих (mammalian target of гаратусіп).

цилат, ресвератрол, метформин, спермидин, 2-дезоксиглюкоза, сенолитики и некоторые другие [1]. Примерно такой же эффект дает давно известное ограничение по питанию [2–6].

Физические нагрузки также являются хорошо известным геропротектором. Так, возможность бега в колесе удлиняет жизнь экспериментальных крыс примерно на 10% [7]. В отличие от ограничения по питанию, в большинстве экспериментальных систем физические упражнения увеличивают не столько продолжительность жизни, сколько ее здоровую часть (healthspan) [2]. Этот эффект во многом обусловлен влиянием физических нагрузок на сохранность мышечной массы у пожилых людей [8]. Действительно, во многих работах было показано, что физические нагрузки практически предотвращают возраст-зависимую дегенерацию скелетных мышц [9]. В частности, в работе Hernández-Álvarez et al. [10] было показано, что к 20-ти месяцам сила хватки у контрольных крыс снижалась ~2×. Однако, как следует из рис. 3 этой статьи, у 20-ти месячных крыс, подвергавшихся физическим нагрузкам, сила хватки снижалась всего лишь на 10%. Аналогичные данные были получены на крысах в возрасте 26 мес. [11]. Авторы этой работы также обнаружили, что максимальная скорость бега и время бега до изнеможения у 26-месячных контрольных крыс примерно вдвое ниже, чем у 8-месячных. Как оказалось, физические нагрузки полностью отменяли это снижение [11].

Таким образом, можно утверждать, что эффект ограничения питания влияет на продолжительность жизни (~30%) значительно ниже, чем эффект физических нагрузок на возраст-зависимую дегенерацию скелетных мышц (в несколько раз). Важно отметить, что молекулярные механизмы положительного воздействия физических нагрузок на скелетные мышцы хорошо изучены. Это базовые механизмы активации антиоксидантных систем, улучшения общей физиологии и защиты ткани от атрофии (рассмотрены в следующем разделе). Фармакологическая активация этих механизмов, очевидно, может быть полезна для замедления старения большинства других тканей. Действительно, было показано, что некоторые так называемые вещества-миметики физических нагрузок (exercise mimetics, например, ресвератрол, метформин) продлевали жизнь ряду модельных организмов [12, 13]. Поскольку физические нагрузки активируют не один, а несколько внутриклеточных сигнальных каскадов, ни одно из известных на сегодняшний день веществ-миметиков, использованное индивидуально, не способно полностью воспроизвести эффект физических нагрузок на скелетную мышцу. Более того, основные активируемые физическими нагрузками сигнальные каскады, AMPK-зависимый и mTOR-зависимый (mTOR, мишень рапамицина у млекопитающих, mammalian target of rapemycin), взаимно ингибируют друг друга. Поэтому необходима попеременная стимуляция. Интересно, что с точки зрения снижения уровня глюкозы и холестерина в крови перемежающееся голодание является не менее эффективным, чем обычное ограничение по калориям [14, 15].

Вещества-активаторы АМРК и mTOR существуют, некоторые из них признаны спортивными допингами. Причина отрицательных последствий применения стимуляторов mTOR очевидна. Являясь антагонистом АМРК, гипер-активированный mTOR переключает метаболизм клеток с дыхания на гликолиз, провоцирует воспалительные процессы. Стимуляторы АМРК, повидимому, менее опасны. Большинство из них являются антидиабетическими препаратами. Несмотря на позитивный эффект на мышечную ткань, при продолжительном применении наиболее популярного из таких препаратов, 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибофуранозида (AICAR), наблюдалась атрофия мышц [16]. Одна из причин побочных эффектов, вероятно, в том, что активация АМРК в условиях высокого уровня питательных веществ приводит к аномальному повышению уровня АТР в клетке. Это может вызвать гиперполяризацию митохондрий, что является причиной генерации активных форм кислорода (АФК) в дыхательной цепи. Аномальное повышение уровня АТР и, как следствие, истощение ADP может иметь и другие негативные последствия. Ранее мы предположили, что дозированное снижение уровня АТР и мембранного потенциала митохондрий можно достичь с помощью веществ - разобщителей митохондриального дыхания и синтеза АТР [17].

В данном обзоре мы попытались предложить комбинации фармакологических препаратов и биодобавок, способные в максимальной степени имитировать эффект физических нагрузок на скелетную мышцу, и таким образом распространить его на большинство тканей организма. Рассмотрим молекулярные механизмы воздействия физических нагрузок на мышечную ткань.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕРОПРОТЕКТОРНОГО ВЛИЯНИЯ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК НА СКЕЛЕТНЫЕ МЫШЦЫ

Один из основных путей возраст-зависимой дегенерации скелетных мышц — это саркопе-

ния, процесс, инициируемый разрушением нейромышечных контактов (NMJ, neuro-muscular junctions). Считается, что такая денервация мышечных волокон происходит из-за проблем с гомеостазом Ca²⁺, основного молекулы-сигнала на сокращение миофибриллы. По-видимому, основная причина нарушения круговорота Ca²⁺ в мышечной клетке — вызванная окислительным стрессом утечка из саркоплазматического ретикулума [18]. Кроме того, с возрастом снижается пролиферация скелетных мышц (см. выше). В этом разделе мы аргументируем, что хронические физические нагрузки повышают как антиоксидантный, так и пролиферативный потенциал скелетной мышцы.

Гормезис вследствие небольшого окислительного стресса. Физические нагрузки вызывают в скелетных мышцах небольшой окислительный стресс. Основные источники этого стресса – продукция перекиси водорода NADPH оксидазой Nox2 [19], а также генерация митохондриальных АФК [20]. Известно, что этот окислительный стресс индуцирует компенсаторный, гормезисный эффект путем активации редоксрегулируемых факторов транскрипции, таких как PPARy, Nrf2, HIF-1, NF-kB [21-23]. Активация факторов транскрипции приводит к непосредственному увеличению сопротивляемости клетки окислительному стрессу путем стимуляции экспрессии антиоксидантных ферментов. Кроме того, есть и косвенные антиоксидантные эффекты от такой активации транскрипции, такие как ускорение биогенеза митохондрий и изменение кальциевого гомеостаза в мышечной клетке [23].

Активация АМРК. Непосредственно во время физических нагрузок в мышечных клетках активируется гидролиз АТР, возрастает концентрация ADP, в результате реакции 2ADP ≈ ATP + AMP, активируется AMP-зависимая протеинкиназа, AMPK [24–27]. Кроме того, увеличивается соотношение NAD⁺/NADH, что приводит к активации деацетилазы Sirt1. Этот фермент дополнительно активирует AMPK, а также повышает устойчивость клеток к окислительному стрессу [17, 28]. Как следствие, повышаются антиоксидантный потенциал клетки и активируется биогенез митохондрий.

Интересно, что AMPK также активируется при дегенерации скелетной мышцы при длительном отсутствии физической нагрузки. В нескольких работах было показано, что отсутствие мышечных сокращений приводит к атрофии мышцы. Эта атрофия, по-видимому, происходит из-за дисфункции митохондрий, которая приводит к активации AMPK [29]. Этот факт вполне согласуется с наблюдениями о том, что активация AMPK может привести к клеточной смерти [30–32]. В частности, недавно было показано взаимное ингибирование AMPK и HSF1, ключевого фактора транскрипции, стимулирующего выживание и пролиферацию клеток в стрессовых условиях [33]. Можно предположить, что физиологическая роль опосредованной AMPK атрофии неиспользуемых мышц заключается в том, чтобы в условиях дефицита энергии избавиться от «лишних» клеток.

Активация mTOR. Хорошо известно, что во время физической нагрузки происходит генерация активаторов mTOR, сигнального комплекса – антагониста АМРК. Физическая нагрузка стимулирует mTOR работающей мышцы как минимум тремя способами. Во-первых, растяжение Z-диска запускает внутриклеточный каскад активации. Во-вторых, активно работающая мышца секретирует MGF (фактор роста мышц, Muscle Growth Factor), эндокринный активатор mTOR. MGF – это сплайс-вариант хорошо известного инсулин-подобного фактора роста IGF1. Подобно соматотропину (гормон роста, GH), IGF1 – один из ключевых анаболических гормонов, стимулирующих пролиферацию. В-третьих, в ответ на интенсивную работу мышц гипоталамус секретирует GH, также являющийся центральным эндокринным активатором mTOR, в том числе и в мышечной ткани [34].

Важно отметить, что физическая нагрузка одновременно является и активатором, и ингибитором роста скелетной мышцы. Как сказано выше, нагрузка приводит к увеличению соотношения ADP/ATP и, как следствие, активации AMPK. Будучи антагонистом mTOR, во время физической нагрузки AMPK ингибирует mTOR, и этот ингибирующий эффект перевешивает активирующее действие. Когда мышца переходит в состояние покоя, уровень ATP повышается, что делает возможным активацию mTOR [35].

Секреция миокинов. Кроме упомянутого выше MGF, под действием физической нагрузки мышцы секретируют еще ряд сигнальных молекул, называемых миокинами. К ним относится ряд интерлейкинов, ирисин, метеорин, FGF-21 (Fibroblast Growth Factor) и GDF-15 (Growth and Differentiation Factor). Считается, что миокины способствуют мобилизации энергетических ресурсов организма и подавляют воспалительные процессы в условиях повышенных энергозатрат вследствие интенсивной работы мышц. Рецепторы миокинов есть во многих тканях, миокины позитивно влияют на физиологию организма, их эффект похож на таковой от ограничения по калориям [36–38]. В рамках данного раздела важно упомянуть, что как минимум один из миокинов, GDF-15, непосредственно воздействует и на са-

му мышечную ткань. Как и в случае активации AMPK, эффект GDF-15 на мышцы является двойственным: этот миокин улучшает стресс-ус-тойчивость мышечной ткани [39, 40], но может также вызывать ее атрофию [38, 41, 42].

ИМИТАЦИЯ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК: РЕЖИМ ПИТАНИЯ И ФАРМПРЕПАРАТЫ

Можно ли имитировать эффект физических упражнений путем фармакологической активации упомянутых выше сигнальных путей? Этот вопрос особенно важен потому, что стимуляция физической нагрузкой невозможна для большинства не мышечных тканей. Действительно, следуя нашей логике, попеременный прием стимуляторов AMPK и mTOR теоретически может подействовать на большинство тканей так же, как физические нагрузки действуют на скелетные мышцы. Здесь интересно отметить, что в последнее время выходит все больше работ по перемежающемуся голоданию. В частности было показано, что мыши, в течение года получавшие свободный доступ к корму только дважды в сутки (1 час утром и 1 час вечером), существенно улучшали свои физиологические показатели, в частности снижались уровни глюкозы и триглицеридов в плазме крови, увеличивалась чувствительность к инсулину. Важно отметить, что, в отличие от обычного ограничения по калориям, при перемежающемся голодании не уменьшалась мышечная масса [14]. Аналогичные результаты были получены и на человеке. В течение 4-х дней опытная группа людей, имеющих лишний вес, принимала пищу только с 8-ми ч утра до 2-х ч дня. Даже за такой короткий период было достигнуто существенное улучшение метаболизма глюкозы и жиров [15].

В то же время кажется маловероятным, что такое прерывистое голодание является существенно более эффективным способом замедления старения, чем обычное ограничение по калориям. Иначе на протяжении многих тысяч лет истории человечества такой режим голодания был бы, скорее всего, обнаружен эмпирически и многократно использован. Рассмотрим возможности более эффективной стимуляции как mTOR, так и AMPK.

Стимуляция mTOR. К настоящему времени известно большое количество веществ-активаторов mTOR, из-за побочных последствий их применения многие из них признаны спортивными допингами. Одна из причин отрицательных последствий применения стимуляторов mTOR (анаболики: гормон роста, тестостерон, оксиметалон) очевидна. Являясь антагонистом Sirt1/AMPK, гипер-активированный mTOR переключает метаболизм клеток с дыхания на гликолиз, провоцирует воспалительные процессы. Фармакологический ингибитор mTOR, рапамицин, продлевает жизнь экспериментальных животных, его эффект сравним с таковым от ограничения по питанию [2–4]. По этой причине в качестве геропротекторных в основном рассматриваются воздействия не повышающие, но снижающие уровень GH [43]. Тем не менее периодически возникают попытки использовать GH и его агонисты в качестве геропротекторных средств. Действительно, в старческом возрасте сильно снижается концентрация GH в крови. В литературе описано несколько попыток лечения пожилых людей с помощью IGF1 или GH. В частности, отмечалось положительное влияние на мышечную массу и общее самочувствие пациентов [43-45].

Все эти факты вполне согласуются с основной гипотезой данного обзора о пользе попеременной стимуляции mTOR и AMPK. Каков оптимальный способ стимуляции mTOR? С одной стороны, неограниченное обильное питание не является максимально эффективным способом активации mTOR. Очевидно, что комбинация соответствующей диеты с физическими нагрузками и/или веществами-анаболиками является значительно более эффективным способом увеличения мышечной массы, чем диета сама по себе. С другой стороны, интуитивно кажется понятным, что использование веществ анаболиков - спортивных допингов - вряд ли совместимо с концепцией замедления старения. Промежуточным между этими двумя подходами является стимуляция mTOR с помощью биодобавок. Хорошо известно, что mTOR является сенсором концентрации аминокислот в клетке, поэтому обычные аминокислоты являются активаторами mTOR. Аминокислоты с разветвленной боковой цепью являются наиболее эффективными с точки зрения активации mTOR [46]. Так, в целях борьбы с саркопенией и для увеличения мышечной массы спортсменов были использованы добавки лейцина. Как выяснилось, в этом отношении более эффективным является метаболит лейцина гидрокси-метил бутират (НМВ), а также L-цитруллин [47-49]. Насколько нам известно, эти вещества никогда не использовались в опытах по замедлению старения млекопитающих. Согласно логике данного обзора, они могут быть использованы для этой цели в комбинации с другими миметиками физических нагрузок.

Стимуляция АМРК. Стимуляторы АМРК, по-видимому, менее опасны, чем анаболики-активаторы mTOR. Некоторые из них (метформин и ресвератрол) являются антидиабетическими препаратами. Даже AICAR, будучи признан спортивным допингом, используется для лечения диабета. При краткосрочном применении они, аналогично физическим нагрузкам, улучшают общую физиологию мышц и, в частности, функциональность митохондрий. В то же время при длительном применении AICAR наблюдалось снижение мышечной массы вследствие хронической активации катаболических процессов [16]. Согласно приведенным выше аргументам, это негативное последствие может быть скомпенсировано периодической активацией mTOR. Есть ли другие препятствия для долговременного применения активаторов AMPK?

Ранее мы высказали предположение, что фармакологическая стимуляция АМРК может вызвать гипер-энергизацию клеток [17]. Действительно, активация АМРК в условиях высокого уровня питательных веществ может привести к аномальному повышению уровня АТР в клетке. Это может, в свою очередь, привести к гиперполяризации митохондрий, что является причиной генерации АФК в дыхательной цепи митохондрий [17]. Недавно мы показали, что распад АТР в непосредственной близости от митохондрий за счет активности гексокиназы достаточен для предотвращения окислительных повреждений митохондриальными АФК. Мы также показали, что у нескольких видов млекопитающих активность митохондриальной гексокиназы положительно коррелирует с продолжительностью жизни [50].

Аномальное повышение уровня АТР и, как следствие, истощение ADP может иметь и другие негативные (непредсказуемые) последствия, в частности связанные с гликолизом. Поскольку обратимая реакция, катализируемая пируваткиназой, сопряжена с синтезом ATP из ADP, гипер-энергизация клетки будет приводить к накоплению промежуточных продуктов гликолиза. Эти продукты (триозофосфаты, фруктозо-1,6-бисфосфат) являются регуляторными молекулами. В частности, они инициируют эффект Сrabtree: подавление энергетической функции митохондрий и стимуляция гликолиза [51].

Еще одна потенциальная проблема, которая может возникнуть при гипер-энергизации клетки – это снижение соотношения NAD⁺/NADH. Действительно, вызванная стимуляцией AMPK активация гликолиза должна увеличить скорость синтеза NADH, а высокий трансмембранный потенциал митохондрий – снизить скорость его окисления до NAD⁺ [17]. NAD⁺ – лимитирующий по скорости субстрат деацетилаз. Во многих работах было показано, что эти ферменты, самым известным из которых является деацетилаза гистонов Sirt1, участвуют в регуляции продолжительности жизни [52, 53]. Возможно, по этой причине отсутствуют работы, в которых непосредственные фармакологические активаторы AMPK (AICAR, GW501516, MK-8722) продлевали бы жизнь модельным организмам.

Следуя этой логике, можно предположить, что оптимальным с точки зрения замедления старения способом активации АМРК является увеличение соотношения ADP/ATP в клетках. Именно так происходит в скелетных мышцах под влиянием физических нагрузок. Возможно ли достичь мягкого, дозированного снижения уровня АТР во всех тканях организма? Проблема заключается в том, что уровень глюкозы, основного «топлива» организма, в крови регулируется очень строго. Действительно, при стандартных режимах ограничения по питанию, используемых для продления жизни, концентрация глюкозы в плазме крови экспериментальных мышей и крыс снижается всего на 10-30% по сравнению с таковой у животных, имевших неограниченный доступ к корму [54, 55]. Такое снижение, очевидно, достаточно для активации гормонального ответа специальными тканямисенсорами, которые гуморальным образом активируют Sirt1/AMPK в остальных тканях [17]. В то же время потребление энергии клеткой в состоянии покоя и в активном состоянии может отличаться в несколько раз. Так, активация макрофагов приводит к ~4× увеличению потребления глюкозы [56]. Также очевидно, что стандартное ограничение по калориям не способно снизить уровень питательных веществ у многих типов клеток, имеющих непосредственный контакт с плазмой крови. Рассмотрим, например, эндотелий капилляров кровеносных сосудов. Практически вся глюкоза, поступающая в организм, диффундирует через транспортер GLUT1 плазматической мембраны монослоя эндотелия [57]. Таким образом, доступ к глюкозе у этого типа клеток неизмеримо выше, чем у периферических тканей.

Таким образом, как в случае стимуляции с помощью прямых фармакологических активаторов, так и в случае ограничения по питанию активация АМРК в большинстве тканей происходит не за счет повышения соотношения ADP/ATP в клетках. Маловероятно, что, искусственно снизив в несколько раз концентрацию глюкозы в крови человека, можно достичь увеличения продолжительности жизни. Альтернативный путь – это фармакологическая активация AMPK в комбинации с веществами, снижающими негативные эффекты гипер-энергизации клетки.

Ранее мы представили обзор литературы о том, как дозированное снижение АТР и мембранного потенциала митохондрий с помощью веществ-разобщителей можно использовать с целью замедления старения [17]. Дозированное снижение мембранного потенциала может иметь и другие позитивные последствия для физиологии клетки, например усиление контроля качества митохондрий [58]. Из логики нашего обзора следует, что стимуляция АМРК с помощью разобщителей может быть даже более эффективна, чем обычное ограничение по питанию, поскольку разобщители могут снизить мембранный потенциал и уровень АТР во всех тканях. В литературе описана попытка замедления старения мышей с помощью наиболее исследованного разобщителя, DNP (2,4-динитрофенол). Подобно классическому ограничению по питанию, добавка DNP в питьевую воду мышей приводила к ~30% снижению концентрации глюкозы в крови и небольшому (<10%) увеличению продолжительности жизни животных [59]. Возможно, относительно слабая эффективность DNP как геропротектора объясняется недостаточной степенью разобщения. Действительно, авторы статьи использовали концентрацию вещества, соответствующую потреблению менее 1 мкмоль/кг веса животного. В то же время действующая концентрация DNP в клеточной культуре составляла 100 мкмоль/литр [60], а в кратковременном опыте на мышах – 5,5 ммоль/ кг веса мыши [61]. Тем не менее даже небольшие дозы DNP защищают нейроны в случае мышиной модели болезни Паркинсона [62, 63]. Резюмируя эту часть, можно предположить, что либо DNP, либо другие разобщители [17] потенциально могут быть использованы в комбинации с фармакологическими активаторами для стимуляции АМРК.

Имитация действия миокинов и гормезиса вследствие окислительного стресса. Как уже обсуждалось, основные мышечные эндорфины, действующие на саму мышцу, - это MGF и GDF-15. MGF – активатор mTOR, его действие, теоретически, можно имитировать биологически активными добавками к пище (см. выше). Возможно, наиболее простой и безопасный путь активации секреции GDF-15 в организме – это употребление метформина. Недавно было показано, что эффекты метформина, как миметика ограничения по питанию, во многом обусловлены вызванной им секрецией GDF-15 [64]. В то же время хорошо известно, что GDF-15 секретируется многими органами в ответ на окислительный стресс [65]. Является ли метформин индуктором гормезисного окислительного стресса? Известно, что метформин ингибирует комплекс I дыхательной цепи митохондрий [66]. Также известно, что ингибирование этого комплекса зачастую активирует генерацию супероксида в дыхательной цепи [67-69].

Конечно, использование метформина — не единственно возможный способ вызвать мягкий окислительный стресс. Например, в этом качестве широко используется витамин К3, менадион, и его производные. В частности, было показано, что за счет гормезисного эффекта менадион увеличивает продолжительность жизни червям *Caenorhabditis elegans* [70] и пекарским дрожжам [71]. Насколько нам известно, на высших организмах менадион не применяли в качестве геропротектора. В то же время менадион и его аналоги, благодаря своему прооксидантному действию, применяются как антираковые средства [72].

Необходимо отметить, что использование антиоксидантов с целью замедления старения плохо сочетается с концепцией о пользе гормезиса от окислительного стресса. Действительно, в литературе практически отсутствует описание успешных примеров продления жизни млекопитающих с помощью антиоксидантов. Более того, не исключено, что использование стандартных низкомолекулярных антиоксидантов может повысить риск онкологических заболеваний [73, 74].

Исключение, по-видимому, составляет митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1. Было несколько удачных попыток как продления жизни мышам, так и излечения ряда старческих заболеваний с его помощью [73, 75-77]. Возможно, причина исключительности заключается в том, что SkQ1 снижает уровень АФК локально, в митохондриях, но не в цитоплазме. Известно, что именно цитоплазматическая перекись водорода реагирует с различными факторами транскрипции и таким образом вызывает гормезисный ответ [78, 79]. Кроме того, недавно было показано, что пластохинон, антиоксидантная часть молекулы SkQ1, может реагировать с супероксидом, и в результате этой реакции супероксид превращается в перекись водорода: $PQH_2 + O_2^- = PQ^- + H_2O_2$ [80, 81]. Согласно авторам, константа равновесия этой реакции превышает 10⁹ [81]. Из этих данных следует, что, являясь антиоксидантом (защита от супероксида), SkQ1 в то же время может активировать каскад защиты клетки от АФК (генерация перекиси водорода, легко диффундирующей через мембраны). Предположительно, комбинация про-оксидант + SkQ1 может инициировать гормезисный ответ на окислительный стресс.

Резюмируя, мы предполагаем, что попеременная фармакологическая стимуляция mTOR



Механизмы геропротекторного влияния периодических физических нагрузок на мышечную ткань и предполагаемого эффекта фармакологических миметиков физических нагрузок на немышечные ткани

и АМРК может быть эффективна для продления функциональности мышечной ткани, а также что применение разобщителей на стадии стимуляции АМРК может предотвратить негативные последствия, связанные с гипер-энергизацией клеток. Одновременно со стимуляцией АМРК мы предлагаем имитировать гормезисный эффект окислительного стресса. На рисунке суммированы упомянутые в данном обзоре эффекты физических нагрузок на скелетные мышцы и предложенные способы их имитации в немышечных тканях. Еще раз отметим, что активация mTOR, с одной стороны, и остальные эффекты, указанные на рисунке, с другой, – являются противоположно направленными и ингибируют друг друга. Следовательно, подобно перемежающемуся голоданию, для достижения желаемого эффекта предполагается чередование двух типов воздействий. Временные периоды чередования, очевидно, будут зависеть от фармакокинетики конкретных препаратов.

Считается, что снижение как антиоксидантного, так и пролиферативного потенциала клеток является причинами старения многих тканей, не только мышечной [82]. С нашей точки зрения, приведенная выше стратегия геропротекции может быть применима к большинству типов клеток человеческого организма. Очевидно, невозможно предсказать, как предлагаемый

2 БИОХИМИЯ том 85 вып. 6 2020

комплекс воздействий повлияет на каждую из тканей. В то же время не менее очевидно, что возраст-зависимая дегенерация различных тканей по-разному отражается на старении организма. Потеря функциональности каких тканей ограничивает продолжительность жизни человека? Статистические данные указывают на четыре основных причин смерти у людей: рак, диабет, сердечно-сосудистые заболевания и хроническая обструктивная болезнь легких [83, 84]. Следовательно, можно предположить, что продолжительность жизни человека лимитируется иммунной системой, тканями-сенсорами глюкозы, а также тканями эндотелия кровеносных сосудов и легких. С нашей точки зрения предлагаемый комплекс воздействий как минимум не является разрушительным для каждой из этих тканей.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-14-50642).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Qian, M., and Liu, B. (2018) Pharmaceutical intervention of aging, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1086**, 235-254, doi: 10.1007/978-981-13-1117-8_15.
- Mercken, E. M., Carboneau, B. A., Krzysik-Walker, S. M., and de Cabo, R. (2012) Of mice and men: the benefits of caloric restriction, exercise, and mimetics, *Ageing Res. Rev.*, **11**, 390-398, doi: 10.1016/j.arr.2011.11.005.
- Palliyaguru, D. L., Moats, J. M., Di Germanio, C., Bernier, M., and de Cabo, R. (2019) Frailty index as a biomarker of lifespan and healthspan: focus on pharmacological interventions, *Mech. Ageing Dev.*, **180**, 42-38, doi: 10.1016/j.mad.2019.03.005.
- Martel, J., Ojcius, D. M., Ko, Y.-F., Chang, C.-J., and Young, J. D. (2019) Antiaging effects of bioactive molecules isolated from plants and fungi, *Med. Res. Rev.*, 39, 1515-1552, doi: 10.1002/med.21559.
- Fontana, L., Partridge, L., and Longo, V. D. (2010) Extending healthy life span – from yeast to humans, *Science*, 328, 321-326, doi: 10.1126/science.1172539.
- Mulvey, L., Sinclair, A., and Selman, C. (2014) Lifespan modulation in mice and the confounding effects of genetic background, *J. Genet. Genomics*, **41**, 497-503, doi: 10.1016/j.jgg.2014.06.002.
- Holloszy, J. O. (1998) Longevity of exercising male rats: effect of an antioxidant supplemented diet, *Mech. Ageing Dev.*, 100, 211-219, doi: 10.1016/s0047-6374(97)00140-1.
- Prado, C. M., Purcell, S. A., Alish, C., Pereira, S. L., Deutz, N. E., Heyland, D. K., Goodpaster, B. H., Tappenden, K. A., and Heymsfield, S. B. (2018) Implications of low muscle mass across the continuum of care: a narrative review, *Annal. Med.*, **50**, 675-693, doi: 10.1080/07853890.2018.1511918.
- 9. Distefano, G., and Goodpaster, B. H. (2018) Effects of exercise and aging on skeletal muscle, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **8**, doi: 10.1101/cshperspect.a029785.
- Hernández-Álvarez, D., Mena-Montes, B., Toledo-Pérez, R., Pedraza-Vázquez, G., López-Cervantes, S. P., Morales-Salazar, A., Hernández-Cruz, E., Lazzarini-Lechuga, R., Vázquez-Cárdenas, R. R., Vilchis-DeLaRosa, S., Posadas-Rodríguez, P., Santín-Márquez, R., Rosas-Carrasco, O., Ibańez-Contreras, A., Alarcón-Aguilar, A., López-Díazguerrero, N. E., Luna-López, A., and Königsberg, M. (2019) Long-term moderate exercise combined with metformin treatment induces an hormetic response that prevents strength and muscle mass loss in old female wistar rats, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2019, 3428543, doi: 10.1155/2019/3428543.
- Li, F.-H., Sun, L., Zhu, M., Li, T., Gao, H.-E., Wu, D.-S., Zhu, L., Duan, R., and Liu, T. C. (2018) Beneficial alterations in body composition, physical performance, oxidative stress, inflammatory markers, and adipocytokines induced by long-term high-intensity interval training in an aged rat model, *Exp. Gerontol.*, **113**, 150-162, doi: 10.1016/ j.exger.2018.10.006.
- Klimova, B., Novotny, M., and Kuca, K. (2018) Anti-aging drugs – prospect of longer life? *Curr. Med. Chem.*, 25, 1946-1953, doi: 10.2174/0929867325666171129215251.
- 13. Carmona, J. J., and Michan, S. (2016) Biology of healthy aging and longevity, *Rev. Invest. Clin.*, **68**, 7-16.
- Martinez-Lopez, N., Tarabra, E., Toledo, M., Garcia-Macia, M., Sahu, S., Coletto, L., Batista-Gonzalez, A.,

Barzilai, N., Pessin, J. E., Schwartz, G. J., Kersten, S., and Singh, R. (2017) System-wide benefits of intermeal fasting by autophagy, *Cell Metab.*, **26**, 856-871, doi: 10.1016/j.cmet.2017.09.020.

- Jamshed, H., Beyl, R. A., Della Manna, D. L., Yang, E. S., Ravussin, E., and Peterson, C. M. (2019) Early timerestricted feeding improves 24-hour glucose levels and affects markers of the circadian clock, aging, and autophagy in humans, *Nutrients*, **11**, doi: 10.3390/ nu11061234.
- Hawley, J. A., and Holloszy, J. O. (2009) Exercise: it's the real thing! *Nutr. Rev.*, 67, 172-178, doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00185.x.
- Knorre, D. A., and Severin, F. F. (2016) Uncouplers of oxidation and phosphorylation as antiaging compounds, *Biochemistry (Moscow)*, 81, 1438-1444, doi: 10.1134/S0006297916120051.
- Espinosa, A., Henríquez-Olguín, C., and Jaimovich, E. (2016) Reactive oxygen species and calcium signals in skeletal muscle: a crosstalk involved in both normal signaling and disease, *Cell Calcium*, **60**, 172-179, doi: 10.1016/ j.ceca.2016.02.010.
- Ferreira, L. F., and Laitano, O. (2016) Regulation of NADPH oxidases in skeletal muscle, *Free Radic. Biol. Med.*, **98**, 18-28, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016. 05.011.
- Ji, L. L., Kang, C., and Zhang, Y. (2016) Exercise-induced hormesis and skeletal muscle health, *Free Radic. Biol. Med.*, 98, 113-22, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.025.
- 21. Musci, R. V., Hamilton, K. L., and Linden, M. A. (2019) Exercise-induced mitohormesis for the maintenance of skeletal muscle and healthspan extension, *Sports (Basel)*, 7, doi: 10.3390/sports7070170.
- Webb, R., Hughes, M. G., Thomas, A. W., and Morris, K. (2017) The ability of exercise-associated oxidative stress to trigger redox-sensitive signalling responses, *Antioxidants* (*Basel*), 6, doi: 10.3390/antiox6030063.
- 23. Merry, T. L., and Ristow, M. (2016) Mitohormesis in exercise training, *Free Radic. Biol. Med.*, **98**, 123-130, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.032.
- Ferrer, A., Caelles, C., Massot, N., and Hegardt, F. G. (1985) Activation of rat liver cytosolic 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase kinase by adenosine 5'-monophosphate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 132, 497-504, doi: 10.1016/0006-291x(85)91161-1.
- Carling, D., Clarke, P. R., Zammit, V. A., and Hardie, D. G. (1989) Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities, *Eur. J. Biochem.*, 186, 129-136, doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb15186.x.
- Hardie, D. G., and Carling, D. (1997) The AMP-activated protein kinase – fuel gauge of the mammalian cell? *Eur. J. Biochem.*, 246, 259-273, doi: 10.1111/j.1432-1033.1997. 00259.x.
- Hardie, D. G. (2011) Energy sensing by the AMP-activated protein kinase and its effects on muscle metabolism, *Proc. Nutr. Soc.*, **70**, 92-99, doi: 10.1017/S0029665110003915.
- Guerrieri, D., Moon, H. Y., and van Praag, H. (2017) Exercise in a pill: the latest on exercise-mimetics, *Brain Plast.*, 2, 153-169, doi: 10.3233/BPL-160043.

- Vilchinskaya, N. A., Krivoi, I. I., and Shenkman, B. S. (2018) AMP-activated protein kinase as a key trigger for the disuse-induced skeletal muscle remodeling, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, doi: 10.3390/ijms19113558.
- Bodur, C., Karakas, B., Timucin, A. C., Tezil, T., and Basaga, H. (2016) AMP-activated protein kinase couples 3-bromopyruvate-induced energy depletion to apoptosis via activation of FoxO3a and upregulation of proapoptotic Bcl-2 proteins, *Mol. Carcinogen.*, 55, 1584-1597, doi: 10.1002/mc.22411.
- Shin, S., Buel, G. R., Wolgamott, L., Plas, D. R., Asara, J. M., Blenis, J., and Yoon, S.O. (2015) ERK2 mediates metabolic stress response to regulate cell fate, *Mol. Cell*, **59**, 382-398, doi: 10.1016/j.molcel.2015.06.020.
- Green, D. R., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2014) Cell biology. Metabolic control of cell death, *Science*, 345, 1250256, doi: 10.1126/science.1250256.
- Su, K.-H., Dai, S., Tang, Z., Xu, M., and Dai, C. (2019) Heat shock factor 1 is a direct antagonist of AMP-activated protein kinase, *Mol. Cell*, 76, 546-561, doi: 10.1016/ j.molcel.2019.08.021.
- Sharples, A. P., Hughes, D. C., Deane, C. S., Saini, A., Selman, C., and Stewart, C. E. (2015) Longevity and skeletal muscle mass: the role of IGF signalling, the sirtuins, dietary restriction and protein intake, *Aging Cell*, 14, 511-523, doi: 10.1111/acel.12342.
- 35. Thomson, D. M. (2018) The role of AMPK in the regulation of skeletal muscle size, hypertrophy, and regeneration, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, doi: 10.3390/ijms19103125.
- Ost, M., Coleman, V., Kasch, J., and Klaus, S. (2016) Regulation of myokine expression: role of exercise and cellular stress, *Free Radic. Biol. Med.*, **98**, 78-89, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.018.
- Eckel, J. (2019) Myokines in metabolic homeostasis and diabetes, *Diabetologia*, **62**, 1523-1538, doi: 10.1007/ s00125-019-4927-9.
- Graf, C., and Ferrari, N. (2019) Metabolic health the role of adipo-myokines, *Int. J. Mol. Sci.*, 20, doi: 10.3390/ ijms20246159.
- Zhang, M., Pan, K., Liu, Q., Zhou, X., Jiang, T., and Li, Y. (2016) Growth differentiation factor 15 may protect the myocardium from no-reflow by inhibiting the inflammatory-like response that predominantly involves neutrophil infiltration, *Mol. Med. Rep.*, **13**, 623-362, doi: 10.3892/ mmr.2015.4573.
- Zhang, Y., Moszczynski, L. A., Liu, Q., Jiang, J., Zhao, D., Quan, D., Mele, T., McAlister, V., Jevnikar, A., Baek, S. J., Liu, K., and Zheng, X. (2017) Over-expression of growth differentiation factor 15 (GDF15) preventing cold ischemia reperfusion (I/R) injury in heart transplantation through Foxo3a signaling, *Oncotarget*, 8, 36531-3644, doi: 10.18632/oncotarget.16607.
- Lerner, L., Tao, J., Liu, Q., Nicoletti, R., Feng, B., Krieger, B., Mazsa, E., Siddiquee, Z., Wang, R., Huang, L., Shen, L., Lin, J., Vigano, A., Chiu, M. I., Weng, Z., Winston, W., Weiler, S., and Gyuris, J. (2016) MAP3K11/ GDF15 axis is a critical driver of cancer cachexia, J. Cachexia Sarcopenia Muscle, 7, 467-482, doi: 10.1002/ jcsm.12077.
- Jones, J. E., Cadena, S. M., Gong, C., Wang, X., Chen, Z., Wang, S. X., Vickers, C., Chen, H., Lach-Trifilieff, E., Hadcock, J. R., and Glass, D. J. (2018) Supraphysiologic administration of GDF11 induces Cachexia in part by

upregulating GDF15, *Cell Rep.*, **22**, 1522-1530, doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.044.

- Bartke, A., and Darcy, J. (2017) GH and ageing: pitfalls and new insights, *Best Pract. Res. Clin.Endocrinol. Metab.*, 31, 113-125, doi: 10.1016/j.beem.2017.02.005.
- Rudman, D., Feller, A. G., Nagraj, H. S., Gergans, G. A., Lalitha, P. Y., Goldberg, A. F., Schlenker, R. A., Cohn, L., Rudman, I. W., and Mattson, D. E. (1990) Effects of human growth hormone in men over 60 years old, *N. Engl. J. Med.*, **323**, 1-6, doi: 10.1056/NEJM199007053230101.
- Sattler, F. R. (2013) Growth hormone in the aging male, Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., 27, 541-555, doi: 10.1016/j.beem.2013.05.003.
- Kim, J., and Guan, K.-L. (2019) mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth, *Nat. Cell Biol.*, 21, 63-71, doi: 10.1038/s41556-018-0205-1.
- Weihrauch, M., and Handschin, C. (2018) Pharmacological targeting of exercise adaptations in skeletal muscle: benefits and pitfalls, *Biochem. Pharmacol.*, 147, 211-220, doi: 10.1016/j.bcp.2017.10.006.
- Kaczka, P., Michalczyk, M. M., Jastrzab, R., Gawelczyk, M., and Kubicka, K. (2019) Mechanism of action and the effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation on different types of physical performance – a systematic review, *J. Hum. Kinet.*, 68, 211-222, doi: 10.2478/hukin-2019-0070.
- Cruz-Jentoft, A. J. (2018) Beta-hydroxy-beta-methyl butyrate (HMB): from experimental data to clinical evidence in sarcopenia, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **19**, 668-672, doi: 10.2174/1389203718666170529105026.
- Vyssokikh, M. Y., Holtze, S., Averina, O. A., Lyamzaev, K. G., Panteleeva, A. A., Marey, M. V., Zinovkin, R. A., Severin, F. F., Skulachev, M. V., Fasel, N., Hildebrandt, T. B., and Skulachev, V. P. (2020) Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 6491-6501, doi: 10.1073/pnas.1916414117.
- Sokolov, S. S., Markova, O. V., Nikolaeva, K. D., Fedorov, I. A., and Severin, F. F. (2017) Triosephosphates as intermediates of the Crabtree effect, *Biochemistry (Moscow)*, 82, 458-464, doi: 10.1134/S0006297917040071.
- Chen, C., Zhou, M., Ge, Y., and Wang, X. (2020) SIRT1 and aging related signaling pathways, *Mech. Ageing Dev.*, 187, 111215, doi: 10.1016/j.mad.2020.111215.
- Santos, L., Escande, C., and Denicola, A. (2016) Potential modulation of sirtuins by oxidative stress, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016, 9831825, doi: 10.1155/2016/9831825.
- Yamaza, H., Komatsu, T., Wakita, S., Kijogi, C., Park, S., Hayashi, H., Chiba, T., Mori, R., Furuyama, T., Mori, N., and Shimokawa, I. (2010) FoxO1 is involved in the antineoplastic effect of calorie restriction, *Aging Cell*, 9, 372-382, doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00563.x.
- 55. Badreh, F., Joukar, S., Badavi, M., Rashno, M., and Dehesh, T. (2019) The effects of age and fasting models on blood pressure, insulin/glucose profile, and expression of longevity proteins in male rats, *Rejuvenation Res.*, doi: 10.1089/rej.2019.2205.
- Rodríguez-Prados, J.-C., Través, P. G., Cuenca, J., Rico, D., Aragonés, J., Martín-Sanz, P., Cascante, M., and Boscá, L. (2010) Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation, *J. Immunol.*, **185**, 605-614, doi: 10.4049/jimmunol. 0901698.

- Mann, G. E., Yudilevich, D. L., and Sobrevia, L. (2003) Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells, *Physiol. Rev.*, 83, 183-252, doi: 10.1152/physrev.00022.2002.
- Karavaeva, I. E., Golyshev, S. A., Smirnova, E. A., Sokolov, S. S., Severin, F. F., and Knorre, D. A. (2017) Mitochondrial depolarization in yeast zygotes inhibits clonal expansion of selfish mtDNA, *J. Cell Sci.*, **130**, 1274-1284, doi: 10.1242/jcs.197269.
- Caldeira da Silva, C. C., Cerqueira, F. M., Barbosa, L. F., Medeiros, M. H. G., and Kowaltowski, A. J. (2008) Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity, *Aging Cell*, 7, 552-560, doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00407.x.
- Pelletier, A., and Coderre, L. (2007) Ketone bodies alter dinitrophenol-induced glucose uptake through AMPK inhibition and oxidative stress generation in adult cardiomyocytes, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 292, E1325-E1332, doi: 10.1152/ajpendo.00186.2006.
- Zakharova, V. V., Pletjushkina, O. Y., Galkin, I. I., Zinovkin, R. A., Chernyak, B. V., Krysko, D. V., Bachert, C., Krysko, O., Skulachev, V. P., and Popova, E. N. (2017) Low concentration of uncouplers of oxidative phosphorylation decreases the TNF-induced endothelial permeability and lethality in mice, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1863**, 968-977, doi: 10.1016/j.bbadis.2017.01.024.
- Lee, Y., Heo, G., Lee, K. M., Kim, A. H., Chung, K. W., Im, E., Chung, H. Y., and Lee, J. (2017) Neuroprotective effects of 2,4-dinitrophenol in an acute model of Parkinson's disease, *Brain Res.*, 1663, 184-193, doi: 10.1016/j.brainres.2017.03.018.
- Kishimoto, Y., Johnson, J., Fang, W., Halpern, J., Marosi, K., Liu, D., Geisler, J. G., and Mattson, M. P. (2020) A mitochondrial uncoupler prodrug protects dopaminergic neurons and improves functional outcome in a mouse model of Parkinson's disease, *Neurobiol. Aging*, **85**, 123-130, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.09.011.
- Coll, A. P., Chen, M., Taskar, P., Rimmington, D., Patel, S., et al. (2020) GDF15 mediates the effects of metformin on body weight and energy balance, *Nature*, **578**, 444-448, doi: 10.1038/s41586-019-1911-y.
- Klaus, S., and Ost, M. (2020) Mitochondrial uncoupling and longevity – a role for mitokines? *Exp. Gerontol.*, **130**, 110796, doi: 10.1016/j.exger.2019.110796.
- Spiering, M. J. (2019) The mystery of metformin, J. Biol. Chem., 294, 6689-6691, doi: 10.1074/jbc.CL119.008628.
- Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I., and Stoppani, A. O., (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinolcytochrome c reductase from beef-heart mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.*, 180, 248-257, doi: 10.1016/0003-9861(77)90035-2.
- Mirphy, M. P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem. J.*, 417, 1-13, doi: 10.1042/ BJ20081386.
- Lenaz, G., Tioli, G., Falasca, A. I., and Genova, M. L. (2016) Complex I function in mitochondrial supercomplexes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1857, 991-1000, doi: 10.1016/j.bbabio.2016.01.013.
- Hunt, P. R., Son, T. G., Wilson, M. A., Yu, Q.-S., Wood, W. H., Zhang, Y., Becker, K. G., Greig, N. H., Mattson, M. P., Camandola, S., and Wolkow, C. A. (2011) Extension of lifespan in C. elegans by naphthoquinones

that act through stress hormesis mechanisms, *PLoS One*, **6**, e21922, doi: 10.1371/journal.pone.0021922.

- Sakurai, H., and Ota, A. (2011) Regulation of chaperone gene expression by heat shock transcription factor in Saccharomyces cerevisiae: importance in normal cell growth, stress resistance, and longevity, *FEBS Lett.*, 585, 2744-2748, doi: 10.1016/j.febslet.2011.07.041.
- Badave, K. D., Khan, A. A., and Rane, S. Y. (2016) Anticancer vitamin K3 analogs: a review, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 16, 1017-1030, doi: 10.2174/1871520616666160310143316.
- Sies, H., and Jones, D. P. (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
- 74. Wiel, C., Le Gal, K., Ibrahim, M. X., Jahangir, C. A., Kashif, M., Yao, H., Ziegler, D. V., Xu, X., Ghosh, T., Mondal, T., Kanduri, C., Lindahl, P., Sayin, V. I., and Bergo, M. O. (2019) BACH1 stabilization by antioxidants stimulates lung cancer metastasis, *Cell*, **178**, 330-345, doi: 10.1016/j.cell.2019.06.005.
- Skulachev, M. V., and Skulachev, V. P. (2017) Programmed aging of mammals: proof of concept and prospects of biochemical approaches for anti-aging therapy, *Biochemistry* (*Moscow*), 82, 1403-1422, doi: 10.1134/S000629791712001X.
- Isaev, N. K., Stelmashook, E. V., Genrikhs, E. E., Korshunova, G. A., Sumbatyan, N. V., Kapkaeva, M. R., and Skulachev, V. P. (2016) Neuroprotective properties of mitochondria-targeted antioxidants of the SkQ-type, *Rev. Neurosci.*, 27, 849-855, doi: 10.1515/revneuro-2016-0036.
- Baksheeva, V. E., Gancharova, O. S., Tiulina, V. V., Iomdina, E. N., Zamyatnin, A. A. Jr., Philippov, P. P., Zernii, E. Y., and Senin, I. I. (2018) Iatrogenic damage of eye tissues: current problems and possible solutions, *Biochemistry (Moscow)*, 83, 1563-1574, doi: 10.1134/ S0006297918120143.
- Sies, H., Berndt, C., and Jones, D. P. (2017) Oxidative stress, *Annu. Rev. Biochem.*, 86, 715-748, doi: 10.1146/ annurev-biochem-061516-045037.
- Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., and Antunes, F. (2014) Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors, *Redox Biol.*, 2, 535-562, doi: 10.1016/j.redox.2014.02.006.
- Borisova-Mubarakshina, M. M., Vetoshkina, D. V., and Ivanov, B. N. (2019) Antioxidant and signaling functions of the plastoquinone pool in higher plants, *Physiol. Plant.*, 166, 181-198, doi: 10.1111/ppl.12936.
- Borisova-Mubarakshina, M. M., Naydov, I. A., and Ivanov, B. N. (2018) Oxidation of the plastoquinone pool in chloroplast thylakoid membranes by superoxide anion radicals, *FEBS Lett.*, **592**, 3221-3228, doi: 10.1002/1873-3468.13237.
- Северин Ф. Ф., Скулачев В. П. (2009) Запрограммированная клеточная смерть как мишень борьбы со старением организма, *Успехи геронтологии*, 22, 37-48.
- NCD Countdown 2030 collaborators (2018) NCD Countdown 2030: worldwide trends in non-communicable disease mortality and progress towards Sustainable Development Goal target 3.4, *Lancet*, 392, 1072-1088, doi: 10.1016/S0140-6736(18)31992-5.
- Gong, J. B., Yu, X. W., Yi, X. R., Wang, C. H., and Tuo, X. P. (2018) Epidemiology of chronic noncommunicable diseases and evaluation of life quality in elderly, *Aging Med.*, 1, 64-66, doi: 10.1002/agm2.12009.

ФАЗЫ ЭНЕРГЕТИКИ КЛЕТКИ И СТАРЕНИЕ

MANIPULATING CELLULAR ENERGETICS FOR SLOWING THE AGING OF TISSUES AND ORGANS*

Review

S. S. Sokolov and F. F. Severin**

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

> Received April 11, 2020 Revised April 30, 2020 Accepted May 1, 2020

Up to now numerous studies in the field of gerontology have been published. Nevertheless, a well-known food restriction remains the most reliable and efficient way of lifespan extension. Physical activity is also a well-documented anti-aging intervention being especially efficient in slowing down the age-associated decline of skeletal muscle mass. In this review we focus on the molecular mechanisms of the effect of physical exercise on muscle tissues. We also discuss the possibilities of pharmacological extension of this effect to the rest of the tissues. During the exercise, the level of ATP decreases triggering activation of AMP-dependent protein kinase (AMPK). This kinase stimulates antioxidant potential of the cells and their mitochondrial respiratory capacity. The exercise also induces mild oxidative stress, which, in turn, mediates the stimulation via hormetic response. Furthermore, during the exercise cells generate activators of mammalian target of rapamycin (mTOR). The intracellular ATP level increases during the rest periods between exercises thus promoting mTOR activation. Therefore, regular exercise intermittently activates anti-oxidant defenses and mitochondrial biogenesis (via AMPK and the hormetic response) of the muscle tissue, as well as its proliferative potential (via mTOR), which, in turn, impedes the age-dependent muscle atrophy. Thus, the intermittent treatment with activators of (i) AMPK combined with the inducers of hormetic response and of (ii) mTOR might partly mimic the effects of physical exercise. Importantly, pharmacological activation of AMPK takes place in the absence of ATP level decrease. The use of uncouplers of respiration and oxidative phosphorylation at the phase of AMPK activation could also prevent negative consequences of the cellular hyper-energization. It is believed that the decline of both antioxidant and proliferative potentials of the cells causes the age-dependent decline of multiple tissues, rather than only the muscular one. We argue that the approach above is applicable for the majority of tissues in an organism.

Keywords: aging, caloric restriction, uncouplers, geroprotectors, mTOR, AMPK

УДК 616-006.6

ВОВЛЕЧЕННОСТЬ SASH1 В ПОДДЕРЖАНИЕ СТАБИЛЬНОЙ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ*

© 2020 А.С. Ильницкая, И.Ю. Житняк, Н.А. Глушанкова**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478 Москва, Россия; электронная noчта: natglu@hotmail.com

> Поступила в редакцию 01.04.2020 После доработки 29.04.2020 Принята к публикации 03.05.2020

SASH1 является адаптерным сигнальным белком, имеющим в своей структуре SH3 и SAM домены, отвечающие за межбелковые взаимодействия. Выраженное снижение экспрессии SASH1 описано для многих опухолей. С использованием конфокальной микроскопии нами было проведено иммунофлуоресцентное исследование распределения SASH1 в культурах нормальных эпителиальных клеток IAR-20 и клеток линии колоректального рака HT-29. Нормальные эпителиоциты IAR-20 и эпителиоциты HT-29, имеющие эпителиальный фенотип, образовывали стабильные линейные межклеточные адгезионные контакты (АК), ассоциированные с кольцевыми актиновыми пучками. В этих клетках SASH1 колокализовался с кольцевыми пучками и линейными АК. В ламеллиподиях SASH1 не детектировался. Под воздействием эпидермального фактора роста клетки IAR-20 и HT-29 вступали в эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). ЭМП в культурах IAR-20 и HT-29 имел существенные различия. Клетки IAR-20 проходили неполный ЭМП, приобретая способность к миграции, но при этом сохраняя E-кадхерин в радиальных нестабильных AK. SASH1 присутствовал в таких контактах. При прохождении ЭМП клетками НТ-29 наблюдалось полное исчезновение AK, что также приводило к разрушению стабильной межклеточной адгезии. SASH1 уходил из зон межклеточного взаимодействия. Супрессия SASH1 посредством RNA-интерференции вызывала разрушение стабильных линейных АК клеток IAR-20. Через 48 ч после трансфекции siRNA SASH1 в культуре отмечалось появление клеток с мезенхимальным фенотипом. Полученные данные указывают на вовлеченность SASH1 в поддержание стабильной межклеточной адгезии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SASH1, межклеточная адгезия, Е-кадхерин, эпителиально-мезенхимальный переход. **DOI:** 10.31857/S0320972520060032

введение

Ген SASH1 был впервые описан при анализе генов, экспрессия которых была значительно снижена в карциномах молочной железы [1]. SASH1 экспрессируется во многих тканях, за исключением дендритных клеток и лимфоцитов, и рассматривается в качестве кандидата в опухолевые супрессоры. Снижение экспрессии SASH1 было обнаружено в 74% образцов рака молочной железы, а также в карциномах легких, щитовидной железы и гепатоцеллюлярных карциномах [1, 2]. Для карцином молочной железы, толстой кишки, яичника и шейки матки SASH1 считается прогностическим маркером, выраженное снижение его экспрессии показано для продвинутых стадий опухолевого роста. В аденомах и карциномах на ранних стадиях экспрессия *SASH1* сохранялась на высоком уровне [1, 3–5].

Белок SASH1 является адаптерным сигнальным белком, он содержит центральную область, включающую NLS домен, ответственный за ядерную локализацию белка, а также два домена SAM (sterile α module domain) и домен SH3 (Src homology 3 domain), участвующие в межбелковых взаимодействиях [1]. Присутствие в составе молекулы домена SH3 указывает на возможное участие SASH1 в сигналинге и его возможную связь с интегральными мембранными белками, как скаффолдного и адаптерного белка. При оверэкспрессии SASH1 в клетках линий гепатокарциномы и карциномы желудка отмечалось уменьшение экспрессии мезенхимальных маркеров виментина и N-кадхерина, повышение экспрессии Е-кадхерина, снижение клеточной подвижности и инвазивной активности, усиление адгезии клеток к внеклеточному матриксу

Принятые сокращения: АК – межклеточные адгезионные контакты, ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход, EGF – эпидермальный фактор роста.

^{*} Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio. msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-082, 01.06.2020.

^{**} Адресат для корреспонденции.

[6, 7]. В клетках НСТ116 нокдаун SASH1 с использованием CRISPR-Cas9 приводил к угнетению экспрессии Е-кадхерина, активации экспрессии виментина и транскрипционного фактора эпителиально-мезенхимального перехода ($\Im M\Pi$) — Zeb1. Подавление SASH1 приводило к активации миграционной и инвазивной активности клеток in vitro, а также стимулировало метастатическую активность клеток in vivo при росте в ортотопических ксенотрансплантатах у иммунодефицитных мышей [8]. Было показано, что SASH1 взаимодействует с *N*-концевым SH3 доменом белка CRKL. Предполагается, что CRKL активирует SRC/FAK сигналинг, тем самым активируя ЭМП [9]. Кроме того, белки CRK (CRK II и CRKL) могут рекрутировать факторы обмена нуклеотидов в непосредственной близости от мембраны, тем самым активируя малые ГТФазы Rap1 и Rac1 [10]. Хорошо известно, что малая ГТФаза Rac1 играет центральную роль в клеточной миграции. Активный Rac1 посредством WAVE активирует комплекс ARP2/3, нуклеирующий полимеризацию актиновой сети в ламеллиподиях на ведущем крае клетки [11]. До настоящего времени, несмотря на достаточно большое количество данных о влиянии изменений содержания SASH1 на функциональные характеристики клеток, исследований внутриклеточной локализации SASH1 не проводили. В единственной работе Martini et al. [12] утверждается, что SASH1 аккумулируется в ламеллиподиях и колокализуется с кортактином, который, как известно, связываясь с комплексом Arp2/3, стабилизирует структуру актиновой сети, что способствует эффективной миграции клеток [13].

Появление миграционной активности у эпителиальных клеток является ключевой характеристикой ЭМП – программы, которая играет ведущую роль в эмбриональном развитии и при заживлении ран. Раковые клетки используют программу ЭМП для инициации инвазионнометастатического каскада. Важнейшими звеньями ЭМП являются утрата эпителиоцитами апикально-базальной полярности и стабильной межклеточной адгезии и приобретение миграционного фенотипа [14, 15]. Пусковым механизмом ЭМП считается индукция транскрипционных факторов ЭМП (Snail, Twist, Zeb и др.) и связанное с этим угнетением экспрессии Екадхерина, и ослабление межклеточной адгезии. Недавно мы показали, что разрушение стабильной межклеточной адгезии может быть также обусловлено специфической реорганизацией актинового цитоскелета и замещением стабильных линейных Е-кадхериновых межклеточных адгезионных контактов (АК) нестабильными радиальными [16]. Было обнаружено, что связанные с АК кольцевые актиновые пучки, образованные β -актином [17], разрушаются уже на самых ранних этапах ЭМП, что приводит к перестройке АК и ослаблению межклеточной адгезии. Целью настоящей работы было исследование распределения SASH1 в зонах межклеточного взаимодействия эпителиальных клеток, изучение особенностей его внутриклеточной локализации в ходе ЭМП при разрушении стабильных АК и кольцевых актиновых пучков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. Линия нормальных иммортализованных эпителиоцитов IAR-20 была выделена из печени крыс в Международном раковом агентстве Монтесано и коллегами [18]. В работе была также использована линия колоректальной аденокарциномы человека HT-29 (ATCC, США). 1×10^5 клеток рассевали в чашки Петри с покровными стеклами или в чашки Петри со стеклянным дном («MatTek Corporation», США) и культивировали в модифицированной Дальбекко среде Игла (DMEM) («Sigma», США) с 10%-ной телячьей эмбриональной сывороткой («PAA Laboratories», Австрия) в течение 24 ч. Далее клетки культивировали в среде с 1%-ной телячьей эмбриональной сывороткой в течение 20 ч. Для индукции ЭМП клетки IAR-20 и HT-29 обрабатывали EGF («Sigma», США) в концентрации 40 и 50 нг/мл соответственно, добавляя в культуральную среду из стокового раствора.

Иммунофлуоресцентная микроскопия и DIC видеомикроскопия. Для иммунофлуоресцентного окрашивания были использованы следующие антитела: мышиные моноклональные антитела к Е-кадхерину (клон 36, 1 : 200; «BD Transduction Labs», США), кроличьи антитела к SASH1 (клон 266A, 1:100; «Bethyl Laboratories», США), мышиные моноклональные антитела к β -актину (клон 4C2, 1 : 100; «Merck, Millipore», США,), мышиные моноклональные антитела к кортактину (клон 4F11, 1 : 200; «Sigma», США), а также антитела козы к мышиным IgG1, IgG2a и антитела козы к мышиному и кроличьему IgG, конъюгированные с Alexa Fluor488, Alexa Fluor594 или Alexa Fluor647 (1: 200; «Jackson ImmunoResearch», США). Клетки на стеклах фиксировали 15 мин смесью метанола/ацетона (1/1) при -10 °C, после чего инкубировали с первыми антителами. После промывки фосфатным буфером (1× PBS pH 7,4) инкубировали со вторыми антителами. Препараты исследовали с применением конфокального микроскопа Leica TCS SP5, с использованием объектива HDX PL

APO 63×/1.3 («Leica Microsystems», Швейцария) и эпифлуоресцентного микроскопа Axioplan Zeiss, с использованием объектива Plan-Neofluar 100×/1.3 («Carl Zeiss», Германия). Для получения изображений с помощью DIC видеомикроскопии за 20 мин до визуализации произсмену культуральной водили среды на DMEM/F12 без фенолового красного, с L-глутамином и HEPES с добавлением 1%-ной телячьей эмбриональной сыворотки. Через час после начала съемки в культуральную среду добавляли EGF для индукции ЭМП. Прижизненную микроскопию осуществляли с помощью микроскопа NikonEclipseTi с использованием объектива PlanFluor40× и цифровой камеры ORCA-ER («Hamamatsu Photonics», Япония) и программного обеспечения NIS-Elements AR 3.22 («Nikon», Япония). Частота съемки 1 кадр в мин в течение 6 ч (для клеточной культуры Iar-20) и каждые 10 мин в течение 10 ч (для клеточной культуры НТ-29).

RNA-интерференция. Для супрессии SASH1 была использована ON-TARGETplus SMARTpool rat Sash1 siRNA (50 нМ) и в качестве трансфицирующего агента – DharmaFECT1 («Dharmacon», США). GFP siRNA использовали в качестве негативного контроля. Культуры инкубировали 48 ч в среде DMEM с 10%-ной сывороткой. Далее клетки лизировали и анализировали с помощью иммуноблоттинга. Стекла с трансфицированными клетками также фиксировали для иммунофлуоресцентного окрашивания.

Иммуноблоттинг. Клетки лизировали лизисбуфером RIPA (50 мМ Tris-HCl, pH 7,4 («MP Biomedicals», Франция); 150 мМ NaCl («Sigma», США); 2 мМ EDTA («Sigma», США); 1% NP-40 («Fluka», США); 0,1% SDS («AppliChem», Испания) с добавлением 0,25 мМ Na₃VO₄, 1 мМ DTT, 10 мМ NaF и коктейля ингибиторов протеаз («Sigma», США). Образцы смешивали с 5× буфером для нанесения (250 мМ Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS, 30% (v/v) глицерин, 5% β-меркаптоэтанол, 0,02% бромфеноловый синий) и инкубировали при 95 °C в течение 10 мин. Далее образцы наносили на 10% SDS-полиакриламидный гель и проводили вертикальный электрофорез согласно протоколу («Bio-Rad», США). Белки после электрофореза переносили с гелей на Amersham Hybond-P PVDF мембраны («GE Healthcare», США). Мембраны блокировали 5%-м раствором молока («Fluka», США) на фосфатном буфере ($1 \times PBS pH 7.4$) с добавлением 0,1% (v/v) Tween-20 («AppliChem», Испания) в течение 1 ч на качалке. Далее мембраны инкубировали с первыми антителами 16 ч при 4 °С. После отмывки фосфатным буфером с добавлением 0.1% (v/v) Tween-20 мембраны инкубировали со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой, в течение 1 ч при комнатной температуре. Для контроля загрузки использовали моноклональные антитела к общему актину (клон C4, 1 : 1000; «Merck, Millipore», США) Сигнал детектировали с помощью Pierce ECL Western Blotting Substrate («Thermo Fisher Scientific», США), изображения получали с помощью прибора Image Quant LAS 4000 («GE Healthcare», США). Для денситометрии полученных изображений блотов использовали программу ImageJ [imagej.net]. Значения оптической плотности полос SASH1 нормировали на маркерный белок – актин. При статистической обработке результатов трех экспериментов использовали критерий Стьюдента, данные представляли, как средние значения ± ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С использованием конфокальной микроскопии было проведено исследование распределения SASH1 в нормальных эпителиоцитах линии IAR-20, а также в клетках линии колоректального рака НТ-29. Клетки этих линий имели эпителиальный фенотип и в редкой культуре образовывали островки, а в густой культуре - монослои. Было выполнено тройное иммунофлуоресцентное окрашивание Е-кадхерина, актина и SASH1 (рис. 1, *a*). Как показала конфокальная микроскопия, клетки IAR-20 формировали линейные межклеточные адгезионные контакты, ассоциированные с кольцевыми актиновыми пучками. Такие контакты аккумулировали SASH1. SASH1 также детектировался в зоне краевого актинового пучка. Антитела хорошо выкрашивали SASH1 при фиксации клеток метанолом/ацетоном, которая вместе с тем приводила к неспецифическому свечению вторых антител (рис. 1, δ). Выраженное свечение в цитоплазме при микроскопии клеток в дальнем красном канале конфокального микроскопа не было связано с SASH1 и было обусловлено сорбцией меченных Alexa647 вторичных антител к кроличьему иммуноглобулину на внутриклеточных органеллах. Также в цитоплазме отмечалось неспецифическое свечение вторичных антител к изотипам мышиных иммуноглобулинов, которые использовались для одновременной детекции Е-кадхерина и β-актина. Вместе с тем на периферии клеток неспецифическое свечение вторичных антител не было выражено, что позволило детально исследовать межклеточные границы и зоны клеточного края.



Рис. 1. SASH1 в нормальных эпителиальных клетках IAR-20. a – Конфокальная микроскопия: Е-кадхерин (красный канал), β -актин (зеленый канал), SASH1 (дальний красный канал). Флажок указывает на межклеточный контакт, представленный с большим увеличением на врезках. SASH1 аккумулируется в области AK. δ – Конфокальная микроскопия. Контроль вторых антител. Неспецифическое свечение вторичных антител. Красный канал – анти-мышиные IgG_{2a}, меченные Alexa594, зеленый канал – анти-мышиные IgG, меченные Alexa647. e – Флуоресцентное окрашивание на кортактин, Е-кадхерин и SASH1 присутствует в AK и в зоне краевого актинового пучка. Во врезках – участок клеточного края при большем увеличении. Масштаб – 10 мкм. (С цветными вариантами рис. 1–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

Маrtini et al. [12] утверждали, что SASH1 детектируется в ламеллиподиях и колокализуется с кортактином, белком, тесно связанным с актиновой сетью. Как показали наши эксперименты, в клетках IAR-20 и HT-29 колокализации кортактина и SASH1 нет. В клетках IAR-20 кортактин присутствовал в актиновой сети ламеллиподий на свободном крае и также колокализовался с краевым актиновым пучком (рис. 1, e), в то время как SASH1 в зонах ламеллиподий отсутствовал. Его распределение на активном крае клеток было ограничено краевым актиновым пучком.

Ранее мы показали, что при обработке эпидермальным фактором роста (EGF) клетки IAR-20 вступают в ЭМП, разрывая стабильные связи друг с другом и приобретая способность к миграции [16] (рис. 2, a).

Клетки IAR-20 в присутствии EGF могут мигрировать как индивидуально, так и в составе

БИОХИМИЯ том 85 вып. 6 2020

группы клеток, они могут устанавливать контакты с соседними клетками, но такие контакты нестабильны. При исследовании ранних этапов ЭМП мы обнаружили, что ослабление межклеточной адгезии у клеток IAR-20 связано не с угнетением экспрессии Е-кадхерина или его аккумуляцией на межклеточных границах, а с разрушением кольцевого актинового пучка, связанного с линейными АК, появлением ламеллиподий на границах между клетками и замещением линейных АК нестабильными радиальными АК, также образованными Е-кадхерином. В связи с этим мы задались вопросом, как меняется распределение SASH1 в клетках IAR-20, вступивших в ЭМП. Оказалось, что параллельно с реорганизацией АК также изменялась и локализация SASH1 в зонах межклеточного взаимодействия. Как показала конфокальная микроскопия, в ламеллиподиях, образующихся как на свободном клеточном крае, так и на межклеточных грани-

ИЛЬНИЦКАЯ и др.



Рис. 2. Эпителиоциты IAR-20 в присутствии EGF. a - DIC видеомикроскопия. До добавления EGF клетки IAR-20 образуют островки. После добавления EGF (0 мин) клетки вступают в ЭМП: индуцируется протрузионная активность, разрушаются межклеточные контакты, активируется клеточная миграция. При миграции клетки могут формировать контакты с соседними клетками. Такие контакты нестабильны. Флажки – зоны разрыва межклеточных контактов, стрелки – вновь образованные контакты. δ , $e - \Phi$ луоресцентное окрашивание клеток IAR-20 на β -актин, E-кадхерин, SASH1. $\delta - 10$ мин инкубации с EGF. Появление ламеллиподий на межклеточных границах. SASH1 не детектируется в ламеллиподиях. e - 30 мин инкубации с EGF. SASH1 присутствует в радиальных E-кадхерин-содержащих AK. Флажки указывают на межклеточные границы, представленные с большим увеличением на врезках. Масштаб – 10 мкм

цах, SASH1 отсутствовал, при этом во вновь образованных радиальных AK SASH1 детектировался (рис. 2, δ и θ).

Исследование было продолжено на клетках линии колоректальной аденокарциномы HT-29. Клетки HT-29 имеют эпителиальный фенотип и формируют стабильные линейные AK, которые образованы Е-кадхерином (рис. 3, *a*). Такие контакты ассоциированы с кольцевым актиновым пучком. SASH1 аккумулировался в области линейных AK клеток HT-29. Клетки HT-29 под действием EGF также вступали в ЭМП. В отличие от эпителиоцитов IAR-20, клетки HT-29 проходили полный ЭМП, они теряли связи друг с другом и по субстрату мигрировали индивидуально (рис. 3, δ). Иммунофлуоресцентное окрашивание показало полное разрушение AK у клеток HT-29, обработанных EGF. Е-кадхерин ухо-

дил из контактов и обнаруживался в эндосомах, из зон межклеточного взаимодействия параллельно разрушению AK уходил и SASH1. В некоторых клетках, для которых была характерна аккумуляция актиновых филаментов на клеточном крае, SASH1 также аккумулировался в этой зоне в виде тонкой линии (рис. 3, *в*).

Полученные данные указывают на то, что SASH1 присутствует в AK, и это свидетельствует о его возможном участии в функционировании AK. Мы решили выяснить, как влияет супрессия SASH1 на морфологию клеток и межклеточную адгезию. Для этого мы использовали ON-TARGETplus SMARTpool rat SASH1 siRNA (рис. 4, a, δ). Как показало иммунофлуоресцентное исследование, супрессия SASH1 в клетках IAR-20 оказывала значительное влияние на структуры межклеточной адгезии. Через 48 ч после трансфекции SASH1 siRNA стабильные линейные E-кадхериновые AK, характерные для эпителиоцитов IAR-20, разрушались. На межклеточных границах были видны отдельные точечные или короткие радиальные AK (рис. 4, a). В цитоплазме были видны эндосомы, заполненные E-кадхерином. Островки клеток часто распадались, в культуре было много клеток, кото-



Рис. 3. SASH1 в клетках карциномы HT-29. $a - \Phi$ луоресцентное окрашивание контрольной культуры на Е-кадхерин, β-актин и SASH1. Конфокальная микроскопия. Клетки образуют линейные AK, ассоциированные с кольцевыми актиновыми пучками. SASH1 аккумулируется в области AK. Масштаб – 10 мкм. δ , e - Индукция ЭМП под действием EGF. $<math>\delta - DIC$ видеомикроскопия. До добавления EGF клетки HT-29 образуют островки. Под действием EGF клетки проходят ЭМП: разрушается стабильная межклеточная адгезия, индуцируется миграционная активность. Цифрами отмечено положение клеток. Масштаб – 50 мкм. e - 8-часовая инкубация с EGF. Флуоресцентное окрашивание на Е-кадхерин, β -актин и SASH1. Полное разрушение AK и эндоцитоз Е-кадхерина, разрушение стабильной межклеточной адгезии. SASH1 уходит из AK, но присутствует на свободном крае клеток. Масштаб – 10 мкм



Puc. 4. Супрессия SASH1 в клетках культуры IAR-20. a -Иммуноблоттинг культуры через 48 ч после трансфекции SASH1 siRNA. Окрашивание полноразмерной мембраны на SASH1 и на общий актин. I -GFP siRNA (негативный контроль), 2 -контрольная культура, 3, 4 -SASH1 siRNA. $\delta -$ Денситометрический анализ блотов из трех экспериментов. * p < 0.05, ** p < 0.01. I -GFP siRNA (негативный контроль), 2 -контрольная культура (негативный контроль), 2 -контрольная культура, 3 -SASH1 siRNA. e, c -Флуоресцентное окрашивание культуры через 48 ч после трансфекции SASH1 siRNA. e -Эпифлуоресцентная микроскопия E-кадхерина и SASH1. На межклеточных границах E-кадхерин аккумулируется в редких точечных AK. Эндосомы содержат E-кадхерин (стрелки). c -Конфокальная микроскопия E-кадхерина, β -актина, SASH1. Клетки приобрели мезенхимальный фенотип. Масштаб – 10 мкм

рые утратили эпителиальную форму и приобрели мезенхимальный фенотип (рис. 4, *г*). Таким образом, оказалось, что уменьшение содержания SASH1 в клетках снижает стабильность межклеточной адгезии, что влияет на морфологию клеток и может приводить к появлению у клеток миграционного фенотипа.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, мы впервые показали, что SASH1 участвует в поддержании межклеточной адгезии. В наших экспериментах супрессия SASH1 посредством RNA-интерференции приводила к разрушению стабильных Е-кадхериновых АК и сдвигала фенотип эпителиальных клеток в сторону мезенхимального. Эти данные согласуются с данными Franke et al. [8], описавших индукцию ЭМП у клеток гепатокарциномы при выключении SASH1 посредством CRISPR-Cas9. Ранее с использованием дрожжевого двугибридного скрининга было показано взаимодействие SASH1 с активным Rac1 [19], и на основании этого можно было бы считать SASH1 эффектором Rac1. Вместе с тем данные о вовлеченности Rac1 в формирование АК противоречивы. С одной стороны, считается, что активный Rac1 стабилизирует АК, рекрутируя актин к гомофильно связанным Е-кадхериновым рецепторам [20]. С другой стороны, известно, что активность Rac1 детектируется в зонах межклеточного взаимодействия только на самых ранних этапах формирования стабильных АК – при взаимодействии ламеллиподий и существенно снижается по мере расширения и созревания линейного АК [21]. Недавно мы показали, что в клетках IAR-20 на ранних этапах ЭМП разрушение кольцевого актинового пучка и замещение стабильных АК нестабильными радиальными АК сопровождается полимеризацией Arp2/3-зависимой актиновой сети и появлением ламеллиподий в зонах межклеточного взаимодействия, то есть активацией Rac [16]. Мы считаем, что Rac, скорее всего, не участвует в поддержании стабильности АК. Его активация при воздействии ростовых факторов, напротив, индуцирует образование ламеллиподий на межклеточных границах, что приводит к утрате контактного паралича и дестабилизации межклеточной

адгезии. На основании полученных нами данных, мы предполагаем, что SASH1, возможно, не является эффектором Rac-GTP, но является его негативным регулятором на межклеточных границах, стабилизируя адгезию между клетками. Ранее было показано, что SASH1 взаимодействует с *N*-концевым SH3 доменом белка CRKL и активирует SRC/FAK онкогенный сигналинг [9]. С другой стороны, имеются данные о том, что оверэкспрессия СRК белков (CRK II и CRKL) вызывает активацию Rac, образование ламеллиподий на свободном клеточном крае, разрушение АК и скэттеринг эпителиальных островков [22]. Возможно, в зонах межклеточных контактов SASH1, как скаффолд-белок, связывая белок CRKL и активный Rac или факторы обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF) Rac, приводит к угнетению его активности, что стабилизирует АК. Супрессия SASH1 высвобождает онкогенную активность CRKL, что способствует активации Rac и приводит к разрушению межклеточной адгезии. Подтверждение высказанной нами гипотезы, очевидно, требует дальнейшей экспериментальной проверки.

Следует также отметить, что SASH1, локализуясь на межклеточных границах и имея в структуре NLS последовательность для транспортировки в ядро, может быть связан с контактным торможением пролиферации, характерным для

нормальных эпителиальных клеток. Подобная регуляторная функция описана, в частности, для многофункционального белка мерлина, который не только ассоциирован с кольцевым актиновым пучком и АК, но также негативно регулирует EGFR и Rac/PAK сигналинг и способствует переходу из ядра в цитоплазму транскрипционных коактиваторов YAP/TAZ при высокой плотности эпителиального монослоя [23]. Возможно, SASH1 является тем ключевым игроком, чья способность формировать комплексы с многими белками на мембране и в ядре может обеспечивать его значимую роль в опухолевой супрессии, связывая воедино негативное влияние на миграционную и пролиферативную активность клеток.

Финансирование. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-54-16005). Работа по изучению ЭМП поддержана Российским научным фондом (грант № 16-15-10288).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zeller, C., Hinzmann, B., Seitz, S., Prokoph, H., Burkhard-Goettges, E., Fischer, J., Jandrig, B., Schwarz, L.-E., Rosenthal, A., and Scherneck, S. (2003) *SASH1*: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer, *Oncogene*, 22, 2972-2983, doi: 10.1038/sj.onc.1206474.
- 2. Peng, L., Wei, H., and Liren, L. (2014) Promoter methylation assay of SASH1 gene in hepatocellular carcinoma, *J. BUON*, **19**, 1041-1047.
- Rimkus, C., Martini, M., Friederichs, J., Rosenberg, R., Doll, D., Siewert, J. R., Holzmann, B., and Janssen, K. P. (2006) Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene SASH1 in colon cancer, *Br. J. Cancer*, 95, 1419-1423, doi: 10.1038/ sj.bjc.6603452.
- Ren, X., Liu, Y., Tao, Y., Zhu, G., Pei, M., Zhang, J., and Liu, J. (2016) Downregulation of SASH1 correlates with tumor progression and poor prognosis in ovarian carcinoma, *Oncol. Lett.*, **11**, 3123-3130, doi: 10.3892/ol.2016.4345.
- 5. Xie, J., Zhang, W., Zhang, J., and Luan, Y.-F. (2017) Downregulation of SASH1 correlates with poor prognosis in cervical cancer, *Eur. Rev. Med. Pharm. Sci.*, **21**, 3781-3786.
- He, P., Zhang, H., Sun, C., Chen, C., and Jiang, H. (2016) Overexpression of SASH1 Inhibits the proliferation, invasion, and EMT in hepatocarcinoma cells, *Oncol. Res.*, 24, 25-32, doi: 10.3727/096504016X14575597858609.
- Zong, W., Yu, C., Wang, P., and Dong, L. (2016) Overexpression of SASH1 inhibits TGF-b1-induced EMT in gastric cancer cells, *Oncol. Res.*, 24, 17-23, doi: 10.3727/ 096504016X14570992647203.

- Franke, F. C., Müller, J., Abal, M., Medina, E. D., Nitsche, U., Weidmann, H., Chardonnet, S., Ninio, E., and Janssen, K. P. (2018) The tumor suppressor SASH1 interacts with the signal adaptor CRKL to inhibit epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer, *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 7, 33-53, doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.08.007.
- Franke, F. C., Slusarenko, B. O., Engleitner, T., Johannes, W., Laschinger, M., Rad, R., Nitsche, U., and Janssen, K. P. (2020) Novel role for CRK adaptor proteins as essential components of SRC/FAK signaling for epithelial-mesenchymal transition and colorectal cancer aggressiveness, *Int. J. Cancer*, **146**, doi: 10.1002/ijc.32955.
- Feller, S. (2001) Crk family adaptors signalling complex formation and biological roles, *Oncogene*, 20, 6348-6371, doi: 10.1038/sj.onc.1204779.
- Krause, M., and Gautreau, A. (2014) Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 577-590, doi: 10.1038/nrm3861.
- Martini, M., Gnann, A., Scheikl, D., Holzmann, B., and Janssen, K. P. (2011) The candidate tumor suppressor SASH1 interacts with the actin cytoskeleton and stimulates cell-matrix adhesion, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 43, 1630-1640, doi: 10.1016/j.biocel.2011.07.012.
- Rottner, K., and Stradal, T. (2016) How distinct Arp2/3 complex variants regulate actin filament assembly, *Nat. Cell Biol.*, 18, 1-3, doi: 10.1038/ncb3293.
- 14. Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition,

Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **15**, 178-196, doi: 10.1038/nrm3758.

- Nieto, M. A., Huang, R. Y., Jackson, R. A., and Thiery, J. P. (2016) EMT: 2016, *Cell*, **166**, 21-45, doi: 10.1016/j.cell. 2016.06.028.
- Zhitnyak, I. Y., Rubtsova, S. N., Litovka, N. I., and Gloushankova, N. A. (2020) Early events in actin cytoskeleton dynamics and E-cadherin-mediated cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, *Cells*, 9, pii: E578, doi: 10.3390/cells9030578.
- Dugina, V., Zwaenepoel, I., Gabbiani, G., Clément, S., and Chaponnier, C. (2009) β- and γ-Cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity, *J. Cell Sci.*, **122**, 2980-2988, doi: 10.1242/jcs.041970.
- Montesano, R., Saint Vincent, L., Drevon, C., and Tomatis, L. (1975) Production of epithelial and mesenchymal tumors with rat liver cells transformed *in vitro*, *Int. J. Cancer*, 16, 550-558, doi: 10.1002/ijc.2910160405.
- Ломакина М. Е., Полесская А., Александрова А. Ю., Готро А. (2016) Поиск новых регуляторов клеточного

движения среди недавно обнаруженных партнеров связывания ГТФазы Rac, *Успехи молекулярной онколо*сии, **3**, 20.

- McCormack, J., Welsh, N. J., and Braga, V. M. (2013) Cycling around cell-cell adhesion with Rho GTPase regulators, J. Cell Sci., 126, 379-391, doi: 10.1242/jcs.097923.
- 21. Yamada, S., and Nelson, W. J. (2007) Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion, *J. Cell Biol.*, **178**, 517-527, doi: 10.1083/jcb.200701058.
- Lamorte, L., Royal, I., Naujokas, M., and Park, M. (2002) Crk adapter proteins promote an epithelial-mesenchymallike transition and are required for HGF-mediated cell spreading and breakdown of epithelial adherens junctions, *Mol. Biol. Cell*, 13, 1449-1461, doi: 10.1091/mbc.01-10-0477.
- Furukawa, K. T., Yamashita, K., Sakurai, N., and Ohno, S. (2017) The epithelial circumferential actin belt regulates YAP/TAZ through nucleocytoplasmic shuttling of merlin, *Cell Rep.*, 20, 1435-1447, doi: 10.1016/j.celrep. 2017.07.032.

INVOLVEMENT OF SASH1 IN THE MAINTENANCE OF STABLE CELL–CELL ADHESION*

A. S. Ilnitskaya, I. Y. Zhitnyak, and N. A. Gloushankova**

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

> Received April 1, 2020 Revised April 29, 2020 Accepted May 3, 2020

SASH1 is an adapter and signaling protein that contains SH3 and SAM domains responsible for protein—protein interactions. SASH1 downregulation has been observed in many tumors. We examined localization of SASH1 in cultures of normal IAR-20 epithelial cells and HT-29 colorectal cancer cells using immunofluorescence staining and confocal microscopy. IAR-20 normal epithelial cells and HT-29 cells with epithelial phenotype formed stable linear adherens junctions (AJs) associated with circumferential actin bundles. In both IAR-20 and HT-29 cells, SASH1 was co-localized with zones of circumferential actin bundles and linear AJs. SASH1 was not detected in lamellipodia. IAR-20 and HT-29 cells treated with Epidermal Growth Factor underwent epithelial-mesenchymal transition (EMT). We observed significant differences in the course of EMT between IAR-20 and HT-29 cultures. IAR-20 cells underwent partial EMT acquiring migratory phenotype but retaining E-cadherin in unstable radial AJs. SASH1 was present in these contacts. Disappearance of AJs was observed in HT-29 cell undergoing a complete EMT, which also resulted in disruption of stable cell–cell adhesion. SASH1 was lost from the zones of cell–cell interaction. SASH1 depletion by means of RNA interference in IAR-20 cells led to destruction of stable linear AJs and acquisition of mesenchymal phenotype by some of the cells. These data indicate involvement of SASH1 in the maintenance of stable cell–cell adhesion.

Keywords: SASH1, cell-cell adhesion, E-cadherin, epithelial-mesenchymal transition

УДК 577.117; 541.515; 678.048

ОММОХРОМЫ СЛОЖНОГО ГЛАЗА НАСЕКОМЫХ: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ*

© 2020 А.Е. Донцов¹, Н.Л. Сакина¹, М.А. Яковлева¹, А.И. Бастраков², И.Г. Бастракова³, А.А. Загоринский⁴, Н.А. Ушакова², Т.Б. Фельдман^{1,5}, М.А. Островский^{1,5**}

¹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,

119334 Москва, Россия; электронная почта: ostrovsky3535@mail.ru

² ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 119071 Москва, Россия

³ ФБУ ВНИИ лесоводства и механизации лесного хозяйства, 141200 Пушкино, Московская обл., Россия

⁴ ФБУ Рослесозащита, 141202 Пушкино, Московская обл., Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 01.04.2020 После доработки 05.05.2020 Принята к публикации 08.05.2020

Цель работы – скрининг и сравнительное исследование антиоксидантных свойств оммохромов сложного глаза насекомых. Оммохромы были выделены в препаративных количествах из насекомых пяти различных семейств: Stratiomyidae, Sphingidae, Blaberidae, Acrididae и Tenebrionidae. Количественный выход оммохромов в зависимости от вида насекомого составил 0,9-5,4% сухого веса пигмента от влажного веса исходного сырья. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии был проведен качественный анализ всех изолированных оммохромов. Показано, что эти пигменты представляют собой смесь нескольких оммохромов омматинового типа. Оммохромы, выделенные из всех перечисленных видов животных, проявляют выраженную флуоресценцию с максимумами эмиссии в области 435-450 нм и 520-535 нм, причем интенсивность эмиссионного максимума значительно возрастает при окислении оммохромов пероксидом водорода. Установлено, что оммохромы имеют стабильный сигнал ЭПР, представляющий собой синглетную линию с величиной g = 2,0045 - 2,0048, шириной 1,20-1,27 мT и высокой концентрацией парамагнитных центров (> 10¹⁷ спин/г сухого веса). Все исследованные оммохромы проявляют высокую антирадикальную активность, измеряемую по степени тушения хемилюминесценции в модельной системе окисления, содержащей люминол, гемоглобин и пероксид водорода. Оммохромы проявляли высокую ингибирующую активность в отношении пероксидации наружных сегментов фоторецепторных клеток, индуцированную видимым светом в присутствии в качестве сенсибилизатора липофусциновых гранул из клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека, а также в отношении железо-аскорбат-индуцированной пероксидации липидов. Полученные результаты важны как для понимания биологической функции оммохромов у беспозвоночных, так и для выявления тех видов беспозвоночных, оммохромы которых можно было бы наиболее эффективно использовать как фармакологические препараты, главным образом, для предотвращения и лечения патологий, связанных с развитием окислительного стресса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оммохромы, насекомые, ЭПР спектрометрия, флуоресценция, антиоксидантная активность.

DOI: 10.31857/S0320972520060044

введение

Оммохромы – природные пигменты беспозвоночных животных. Характерная особенность этих пигментов – наличие в структуре феноксазинового/фенотиазинового колец. Оммохромы подразделяют на две основных подгруппы – омматины и оммины, представляющие собой димеры или олигомеры производных кинуренина соответственно [1, 2]. Омматины и оммины *in vivo* – темноокрашенные пигменты, как правило, желто-коричневого или пурпурного цвета. Насекомые используют оммохромы для окраски различных частей тела, для мимикрии. Так, на-

** Адресат для корреспонденции.

Принятые сокращения: УФ – ультрафиолет; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ЭПР – электронный перамагнитный резонанс; ТБК – тиобарбитуровая кислота.

^{*} Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/ biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-084, 29.05.2020.

пример, было показано, что ксантомматин и его производные (такие как омматин D) ответственны за цвет и его изменения у членистоногих [3–5]. Значительные количества оммохромов содержатся в сложном глазу членистоногих, где они находятся в высокой концентрации и выполняют важную функцию. Так, ранее было нами показано, что концентрация оммохромов в глазу креветки-опоссум Mysis relicta достигает 80 мг сухого веса на 1 мл или 200 мкг сухого веса на 1 мг белка [6]. Сложный глаз большинства членистоногих состоит из множества небольших глазков (омматидиев), каждый со своими фоторецепторными клетками (рабдомами). Во всех органах зрения, наряду со светочувствительными ретиналь-содержащими зрительными пигментами, присутствуют и не светочувствительные экранирующие пигменты оммохромы. Их главная функция в сложных глазах оптическая – светофильтрующая и светопоглощающая [7, 8]. Оммохромы участвуют в формировании спектральной чувствительности глаза, поглощая или пропуская свет в определенных областях спектра. Кроме того, поглощая рассеянный свет, они повышают контрастность и четкость изображения.

Наряду с оптической, оммохромы выполняют также защитную, антиоксидантную функцию [9-12]. Эта защита необходима в связи с тем, что кванты света, особенно в фиолетовой и синей областях спектра, высокоэнергетичны. Вследствие этого они представляют потенциальную опасность для структур глаза, особенно для фоторецепторных клеток сетчатки (т.н. «Blue Light Hazard»). Опасность фотоповреждения структур глаза насекомых имеет свои особенности. Во-первых, в условиях длительной световой экспозиции в ретинулярных клетках глаза насекомых, в отличие от позвоночных животных, могут накапливаться фагосомы [13], содержащие большое количество ненасыщенных жирнокислотных остатков, легко подверженных процессу пероксидации. Во-вторых, оптические среды глаза многих насекомых пропускают УФ-облучение, которое является активным экзогенным прооксидантным фактором. В таких условиях облучение УФ- и интенсивным видимым светом может приводить к появлению токсичных продуктов пероксидации, которые способны проникать в мембраны рабдома и повреждать их. Поэтому вероятность фотоповреждения в омматидии сложного глаза, по всей видимости, более высока, чем в глазах позвоночных животных. Вследствие этого наличие дополнительной защиты клеток сложного глаза от прооксидантных факторов жизненно необходимо. Роль такой защиты в глазах членистоногих могут выполнять оммохромы. Известно, что те виды ракообразных и насекомых, которые содержат большие количества экранирующих пигментов, крайне устойчивы к прооксидантным факторам [6, 10, 14]. Причем для ракообразных на примере креветки *M. relicta* нами было показано, что эффект этой устойчивости клеток сложного глаза к действию прооксидантных факторов не связан с более высоким содержанием в них низкомолекулярных антиоксидантов и антиоксидантных ферментов, а обусловлен именно наличием большого количества гранул, содержащих оммохромы [14].

Оммохромы могут быть как донорами, так и акцепторами электронов и функционировать как эффективные антирадикальные молекулы [15-17]. Одним из механизмов защитного действия оммохромов от фотоповреждения зрительных клеток может быть их реакция с синглетным молекулярным кислородом, чрезвычайно токсичным для клетки оксидантом. Нами ранее было показано, что оммохромы глаза креветки Pandalus latirostris тушат фотосенсибилизированную люминесценцию синглетного кислорода [18]. В то же время не исключено, что оммохромы могут быть и генераторами синглетного кислорода. Такая возможность показана, например, для кинуренина – предшественника биосинтеза оммохромов [19-21]. Однако данных по фотовозбуждению оммохромов, образованию триплета и генерации синглетного кислорода в литературе нет. Скорее всего оммохромы лишь тушители синглетного кислорода.

В настоящее время общепринято, что антиоксидантная активность оммохромов обусловлена их способностью нейтрализовать активные формы кислорода и связывать ионы металлов переменной валентности в неактивные комплексы [9, 11]. Ранее нами было показано, что оммохромы мухи черная львинка Hermetia illucens способны тушить хемилюминесценцию люминола, индуцированную пероксидом водорода в присутствии гемоглобина [12]. Величина константы тушения хемилюминесценции оммохромами мухи черная львинка ($> 10^4 \text{ M}^{-1}$) [22] сопоставима с аналогичными константами для синтетических антиоксидантов, таких как мексидол и призводные гидрокси(алкокси)-2-аминобензотиазола [23].

Различные членистоногие, такие как ракообразные и насекомые, являются хорошим источником природных биологически активных пигментов оммохромов. Эти природные антиоксиданты могут быть использованы в практических целях, например, в фармакологии. Цель настоящей работы — получение оммохромов из различных кормовых насекомых и исследование их физико-химических характеристик и антиоксидантных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение оммохромов из голов насекомых. Оммохромы были получены из пяти видов насекомых. Муха «черная львинка» (Hermetia illucens, семейство Strationyidae) и ее личинки широко используются для питания сельскохозяйственных животных и конвертации биологических отходов в доступный источник пищевого белка, жиров, хитина и меланина. Чистая культура этих мух содержится в Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцева (ИПЭЭ РАН). Технология культивирования мух включает следующие стадии: содержание взрослых мух в инсектарии в контролируемых условиях; инкубация яиц и получение личинок в инкубаторе; выращивание личинок в контейнере с питательным субстратом; получение предкуколок, затем куколок и имаго. Взрослые мухи живут 5-8 дней. Нуклеотидная последовательность Hermetia illucens зарегистрирована в Генном банке (*Hermetia illucens*, sample H-il 1 No. KY817115). После окончания жизненного цикла подмор мух замораживали и хранили при температуре −180 °C.

Жук чернотелка (большой мучной хрущак) (*Tenebrio molitor*, семейство Tenebrionidae) в настоящее время является одним из самых популярных видов кормовых насекомых, которых используют для кормления различных экзотических животных. Существуют крупные производства в Европе, Китае, США. Культура содержится в лабораторных условиях ИПЭЭ РАН.

Таракан мраморный (*Nauphoeta cinerea*, семейство Blaberidae) — также популярный вид кормовых насекомых для насекомоядных животных. Культура содержится в лабораторных условиях ИПЭЭ РАН.

Бабочка табачный бражник (*Manduca sexta*, семейство Sphingidae). Гусеницы этой бабочки служат популярным кормом для насекомоядных экзотических животных. Культура содержится в энтомологическом отделе Московского зоопарка.

Саранча пустынная (*Schistocerca gregaria*, семейство Acrididae) — вид кормовых насекомых для насекомоядных животных. Пользуется популярностью как живой корм для насекомоядных животных. Культура содержится в энтомологическом отделе Московского зоопарка.

Экстракция оммохромов из голов насекомых была выполнена без их предварительной гомогенизации. Головы взрослых умерших насе-

комых были отделены вручную и хранились при температуре -180 °С. При необходимости головы насекомых были предварительно проинкубированы в нейтральном метаноле в соотношении ~10 г голов на 300 мл метанола в течение суток (в темноте), при комнатной температуре и периодическом перемешивании. После фильтрации 500 мл абсолютного метанола, содержащего 1% по объему хлористого водорода (MeOH-HCl смесь), был добавлен к массе голов, и смесь инкубировали при 6 °С в темноте, в течение 48 ч при периодическом встряхивании. После этого экстракт фильтровали через бумажный фильтр (Ватман, Grade 6). Полученный супернатант вишневого цвета нейтрализовали 20%-ным раствором аммиака и центрифугировали при 5000 g в течение 15 мин. Супернатант удаляли, к осадку добавляли свежий раствор МеОН-НСІ до его полного растворения. Процедуру осаждения оммохромов раствором аммиака повторяли дважды. Окончательно осадок оммохромов высушивали в эксикаторе в темноте, в присутствии безводного хлорида кальция.

Выделение липофусциновых гранул. Липофусциновые гранулы выделяли из клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) кадаверных глаз доноров разных возрастов с помощью модифицированной методики, предложенной Boulton и Marshall [24]. Кадаверные глаза человека были получены по договору из Глазного тканевого банка ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Изолированные липофусциновые гранулы промывали 0,1 М К-фосфатным буфером, рН 7,6, после чего ресуспендировали в фосфатном буфере и хранили в морозильной камере при – 20° С. Концентрацию гранул подсчитывали, используя камеру Горяева.

Получение наружных сегментов фоторецепторов быка. Наружные сегменты фоторецепторных клеток были выделены из сетчаток глаз быка модифицированным методом, предложенным Mc Dowell [25]. Полученные наружные сегменты были суспендированы в 0,1 M К-фосфатном буфере и хранились при температуре –20 °C.

Получение кардиолипиновых липосом. Кардиолипиновые липосомы были получены путем суспендирования кардиолипина в 0,1 М К-фосфатном буфере, pH 7,4. В эксперименте использовали натриевую соль кардиолипина («Sigma-Aldrich», США) в метанольном растворе. Раствор кардиолипина (5 мг/мл) испаряли на роторном испарителе, липидную пленку солюбилизировали в фосфатном буфере и тщательно перемешивали на мешалке типа «Vortex». Суспензию липосом хранили при температуре 2–4 °С.

Анализ экстрактов оммохромов. Оммохромы анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе фирмы «Кnauer» (Германия) с колонкой «Диасфер 120 С18» (4 х 250 мм, размер частиц сорбента 5 мкм). Растворитель А – 10%ный ацетонитрил + 90% воды (+ 0,5% муравьиной кислоты). Растворитель Б – 100%-ный ацетонитрил (+ 0,5% муравьиной кислоты). Разделение осуществляли путем линейного градиентного элюирования в системе: от 100% растворителя А до 60% растворителя А и 40% растворителя Б за 60 мин, скорость потока 0,4 мл/мин. Температура колонки 24 °С. Продукты хроматографического разделения измеряли с помощью фотометрического детектора «Knauer K-2501», а также флуориметрического детектора (RF-10A-xl, «Shimadzu»). Образец оммохромов или стандарта растворяли в 100 мкл смеси метанола с 0,5%-ной НСІ. Для работы использовали готовые стандарты: трипкинуренин, 3-гидроксикинуренин, тофан. ксантуреновая кислота фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Ксантомматин был синтезирован путем автоокисления из 3-гидроксикинуренина, согласно методике, описанной в [26]. Спектры оптического поглощения измеряли на спектрофотометре «Shimadzu UV-1601PC» (Япония). Спектры флуоресценции регистрировали на флуориметре «Shimadzu RF-5301PC» (Япония). Для обработки полученных данных использовали программное обеспечение RFPC версия 2.0 («Shimadzu»).

Измерение концентрации свободно радикальных центров. Параметры парамагнитных центров в оммохромах определяли методом спектрометрии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Для этого использовали либо сухие образцы оммохромов, либо их замороженные суспензии в К-фосфатном буфере, которые готовили с помощью насадки из полиэтиленовой трубочки длиной 10-15 мм и внутренним диаметром 0,45 мм. На каждую пробу отбирали суспензию оммохромов объемом 0,3 мл и быстро замораживали в жидком азоте (-196 °C). Образцы сохраняли в замороженном виде до момента измерения. Для измерения спектров ЭПР из трубочки поршнем выдавливали замороженный столбик образца. Регистрацию спектров ЭПР образцов проводили при 77°К на радиоспектрометре ЭПР «Bruker EMX» (Германия) в цилиндрическом резонаторе. Условия записи спектров ЭПР: Δ Н развертка — 50 Гс; Н центр — 3440 Гс; амплитуда модуляции – 3 Гс, мощность СВЧ – 20 мкВт. Эталон для определения концентрации спинов – УДА №5, сертификат о калибровке № 905/910-2012.

Окисление оммохромов пероксидом водорода. Окислительная деструкция оммохромов была вызвана 1,0–1,5% пероксидом водорода. Суспензию пигментов (2–3 мг/мл) в 0,1 М К-фосфатном буфере, рН 7,4, или раствор оммохромов в MeOH-HCl (0,5–1,0 мг/мл) инкубировали в присутствии пероксида водорода не менее 2 ч. После этого сравнивали физико-химические характеристики исходного и окисленного образцов.

Определение антиоксидантной активности оммохромов. Антирадикальную активность полученных оммохромов определяли с помощью гомогенной гидрофильной хемилюминесцентной системы, состоящей из гемоглобина, пероксида водорода и люминола [27]. В качестве измеряемых параметров был взят латентный период достижения максимальной интенсивности свечения. Кинетику хемилюминесценции регистрировали на спектрофлуориметре «Shimadzu RF 5301PC» (Япония) при длине волны люминесценции 470 нм при комнатной температуре. Для количественной оценки способности оммохромов взаимодействовать с радикалами, локализованными в водной фазе данной модельной системы, результаты тушения хемилюминесценции пересчитывали в координатах зависимости латентного периода от концентрации пигмента. Среда для инкубации содержала 0,05 M К-фосфатный буфер, pH 7,4, 2,0 мкМ гемоглобина, 100 мкМ люминола, 100 мкМ ЭДТА, и различные концентрации оммохромов в 0,1 М К-фосфатном буфере, рН 7,4 или в растворе метанол-HCl. Реакцию начинали добавлением 100 мкМ пероксида водорода. В качестве контроля использовали буферный раствор без оммохромов.

Кинетику пероксидации липидов кардиолипиновых липосом или наружных сегментов фоторецепторных клеток определяли по накоплению продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты) [28]. Процесс пероксидации липидов индуцировали либо ионами двухвалентного железа, либо видимым светом в присутствии липофусциновых гранул. Для облучения полным видимым светом использовали галогенную лампу КГМ 24-150, снабженную фокусирующей системой и тепловым фильтром. Энергия облучения составляла 80 мВт/см². Спектральная область облучения 390-700 нм. Облучение проводили, как правило, при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Среднюю скорость накопления ТБК-активных продуктов рассчитывали, измеряя концентрацию продуктов, образовавшихся через 10, 25 и 40 мин после начала реакшии.

Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента (p < 0.05). Данные были выражены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Все изученные насекомые содержали высокие концентрации оммохромов, которые экстрагировали из голов насекомых с довольно высокими выходами. Выход оммохромов в % сухого веса пигмента от влажного веса исходного сырья составил 0,9, 1,4, 1,7, 4,2 и 4,8% для мраморного таракана, пустынной саранчи, бабочки бражник табачный, мухи черная львинка и жука чернотелки соответственно. Максимумы спектров поглощения оммохромов всех изученных насекомых в видимой области спектра находились в диапазоне от 430 нм до 502 нм (рис. 1).

Наиболее длинноволновые максимумы поглощения были характерны для оммохромов бабочки бражник табачный (502 нм, рис. 1, а) и мраморного таракана (497 нм, рис. 1, ∂). Оммохромы жука чернотелки имели выраженный максимум поглощения при 454 нм (рис. 1, в). Менее выраженный, но самый коротковолновый максимум поглощения имели оммохромы мухи черная львинка — 430 нм (рис. 1, δ). Оммохромы саранчи пустынной не показывали выраженного максимума поглощения в видимой области спектра, демонстрируя лишь «плечо» в области 490 нм (рис. 1, г). Характер спектров поглощения оммохромов не изменялся при независимых выделениях из одного источника (3-4 независимых выделения). Это связано, повидимому, с тем, что условия культивирования насекомых на протяжении эксперимента не изменялись. Максимумы поглощения оммохромов при 430-490 нм характерны для класса омматинов, а максимумы поглощения при 520 нм и выше характерны для омминов [1]. Абсорбционные спектры оммохромов мухи черная львинка, жука чернотелки и пустынной саранчи более характерны для спектров омматинов; абсорбционные спектры мраморного таракана и бабочки бражник табачный имеют промежуточный характер, что может быть связано с наличием у них двух типов оммохромов - омматинов и омминов.

Все изолированные оммохромы интенсивно флуоресцировали в видимой области спектра. Наблюдалось два основных пика флуоресценции — коротковолновый с максимумом эмиссии при 440 нм и длинноволновый с максимумом эмиссии при 530 нм (рис. 2, *а* и рис. 2, *б* соответственно).

Основные максимумы возбуждения коротковолновой флуоресценции оммохромов были 290 нм, 330 нм и 380 нм, а длинноволновой флуоресценции — 330 нм и 460 нм.

Исследование качественного состава оммохромов было выполнено методом ВЭЖХ. На рис. 3 приведены хроматограммы всех изученных оммохромов, измеренных по поглощению при длине волны 490 нм и по интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 460 нм и эмиссии 520 нм.

Состав оммохромов был различен для разных видов насекомых (рис. 3). Оммохромы представляли собой смесь нескольких веществ, главным образом, смесь ксантомматина и нескольких его производных. Оммохромы мраморного таракана довольно сильно отличаются по составу от остальных представителей класса насекомых (рис. 3, д). Оммохромы бабочки бражник табачный и мухи черная львинка (рис. 3, *а* и б) близки между собой по составу веществ, детектируемых как по поглощающим, так и по флуоресцирующим компонентам. Однако оммохромы бабочки табачный бражник в отличие от оммохромов мухи черная львинка, возможно, содержат в своем составе омматин D с максимумом поглощения 490 нм, что согласуется с данными работы [30], в которой омматин D в смеси с ксантомматином был найден как хромофор оммохром-связывающего белка в гемолимфе бабочки бражник табачный. Жук чернотелка по составу оммохромов скорее ближе к бабочке и мухе, чем к мраморному таракану (рис. 3, в). Важно отметить, что оммохромы большинства изученных насекомых имеют максимум поглощения близкий к максимуму поглощения омматинов. Однако полный качественный состав оммохромов в глазах изучаемых насекомых требует дальнейшего исследования, возможно, с использованием массспектрометрического анализа.

Все исследованные оммохромы имели выраженный синглетный сигнал ЭПР (рис. 4).

Параметры сигнала ЭПР оммохромов из всех пяти видов насекомых приведены в таблице. Видно, что все оммохромы имеют g факторы близкие к g фактору свободного электрона и довольно высокое содержание парамагнитных центров. Наибольшая концентрация спинов, отнесенная на грамм сухого веса, была у оммохромов мухи и бабочки (>10¹⁸).

Оммохромы остальных насекомых имели концентрацию парамагнитных центров меньше, чем 10¹⁸, причем концентрация спинов оммохромов пустынной саранчи и жука чернотелки была более чем на порядок ниже, чем у мухи черная львинка. Высокая концентрация стабильных свободно радикальных центров позволяет рас-



Рис. 1. Спектры поглощения оммохромов насекомых в метанол-HCL. *а* – Бабочка бражник табачный; *б* – муха черная львинка; *в* – жук чернотелка; *г* – саранча пустынная; *д* – таракан мраморный. Концентрация оммохромов была 0,4–0,6 мг/мл

сматривать оммохромы как сборщики («мусорщики») активных свободных радикалов. Величина *g* фактора оммохромов, находящаяся в интервале между 2,004 и 2,005 (таблица), характерна для феноксирадикалов [31]. Известно, что интермедиаты феноксазина, который входит в структуру молекулы оммохромов, проявляют стабильный сигнал ЭПР [32, 33] и могут, по-видимому, обуславливать сигнал ЭПР, обнаруженный нами у оммохромов насекомых. Более того, не исключено, что именно феноксазин и определяет антирадикальную активность оммохромов


Рис. 2. Спектры флуоресценции оммохромов пустынной саранчи (1), бабочки бражник табачный (2) и мраморного таракана (3) в метанол-HCl. Длина волны возбуждения составляла: *a* – 380 нм и *б* – 460 нм



Рис. 3. ВЭЖХ анализ экстрактов оммохромов из глаз насекомых различных видов. a – Бабочка бражник табачный; δ – муха черная львинка; e – жук чернотелка; e – саранча пустынная; ∂ – таракан мраморный; e – панель разделения стандартных веществ. Детектирование по поглощению на длине волны 490 нм (хроматограмма черного цвета). Детектирование флуоресценции на длине волны 520 нм при возбуждении флуоресценции длиной волны 460 нм (хроматограмма красного цвета). Пики: 1–3-гидроксикинуренин, 1a – кинуренин, 4 – триптофан, 5 – предположительно дигидроксантомматин [29], 6 – ксантуреновая кислота, 7 – предположительно декарбоксилированный ксантомматин [29], 8 – ксантомматин. Для хроматограмм с детектированием по поглощению (D) и по флуоресценции (I) показаны отдельные оси ординат. (С цветными вариантами рис. 3 и 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)



Рис. 4. Спектры ЭПР оммохромов мухи черная львинка (1), бабочки бражник табачный (2), мраморного таракана (3) и пустынной саранчи (4). Регистрацию спектров проводили, используя сухие образцы препаратов оммохромов при комнатной температуре

[17]. Сигнал ЭПР оммохромов был чувствителен к облучению как УФ, так и видимым светом при температуре жидкого азота (на рис. не показано). При облучении оммохромов интенсивность исходного сигнала ЭПР значительно возрастала.

Оммохромы оказались чувствительными к окислению пероксидом водорода и/или надпероксидом калия. Окисление пероксидом водорода приводило к исчезновению длинноволнового максимума поглощения в области 430–502 нм (рис. 5, *a*, кривая *I*) и появлению коротковолнового максимума в области 370–390 нм (рис. 5, *a*, кривая *2*). Это свидетельствует о том, что изолированные оммохромы находились, главным образом, в восстановленном состоянии. Действие пероксида водорода имеет, как минимум, двухфазный характер. Сначала наблюдается переход оммохромов в окисленную форму, а затем при длительной инкубации с окислителем, по-видимому, происходит постепенное разрушение пигмента, сопровождающееся дальнейшим уменьшением абсорбции пигментов в видимой области спектра (рис. 5, *a*) и значительной потерей количества парамагнитных центров.

Флуоресцентные свойства оммохромов также претерпевали изменения при окислении оммохромов пероксидом водорода. На рисунке 5, *б* видно, что при окислении происходит значительный рост интенсивности флуоресценции исследуемых образцов, главным образом, в длинноволновой области спектра (500–600 нм).

ВЭЖХ анализ оммохромов показал заметные качественные и количественные изменения в их составе после окисления пероксидом водорода (рис. 5, e-e). Видно, что пики 2–8, присутствующие в исходном не окисленном образце, после воздействия пероксидом водорода практически исчезают. Одновременно увеличивается содержание пиков 9–11, имеющих значительную флуоресценцию. Однако для окончательного выяснения причин увеличения интенсивности флуоресценции оммохромов при окислении пероксидом водорода необходимы дополнительные исследования.

Сигнал ЭПР оммохромов также оказался чувствительным к действию пероксида водорода (рис. 5, *ж*, кривые 1 и 2). Окисление оммохромов пероксидом водорода приводило к резкому падению сигнала ЭПР и, в конечном счете, к полной потере парамагнетизма, что вероятно связано с разрушением феноксазинового кольца в структуре молекул оммохромов [17], исходно проявляющего свободнорадикальные свойства. Деструкция оммохромов из глаза дрозофилы пероксидом водорода была показана ранее [34].

Оммохромы в относительно невысоких концентрациях тушат хемилюминесценцию люминола, инициируемую пероксидом водорода. На рис. 6, *а* показана кинетика хемилюминесценции люминола в присутствии различных концентраций оммохромов мраморного таракана. В присутствии оммохромов наблюдается как па-

	Оммохромы, порошок, комнатная температура				
Образец Параметры сигнала ЭПР	бабочка бражник табачный	муха черная львинка	саранча пустынная	таракан мраморный	жук чернотелка
<i>g</i> -фактор	2,0048	2,0045	2,0045	2,0046	2,0045
Полуширина линии, ΔH_{pp}	12,0	12,4	12,6	12,7	10,2
Концентрация парамагнитных центров, спин/г сухого вещества	$27,5 \times 10^{17}$	$48,0 \times 10^{17}$	4,6 × 10 ¹⁷	$9,7 \times 10^{17}$	$0,5 \times 10^{17}$

Параметры сигнала ЭПР оммохромов насекомых



Рис. 5. Действие пероксида водорода на оммохромы насекомых. a – Абсорбционный спектр оммохромов жука чернотелки при длики до (1) и после (2) окисления пероксидом водорода; δ – спектры флуоресценции оммохромов жука чернотелки при длине волны возбуждения 340 нм (1) и 460 нм (2). Исходный спектр (a) и спектр после действия пероксида водорода (δ); e-e – ВЭЖХ анализ оммохромов из глаз жука чернотелки до и после воздействия на них перексидом водорода (e – детектирование по поглощению на длине волны 380 нм; e – детектирование флуоресценции на длине волны 520 нм при возбуждении флуоресценции длиной волны 380 нм; d – детектирование по поглощению на длине волны 490 нм; e – детектирование флуоресценции на длине волны 520 нм при возбуждении флуоресценции длиной волны 490 нм; e – детектирование флуоресценции на длине волны 520 нм при возбуждении флуоресценции длиной волны 490 нм; e – детектирование флуоресценции на длине волны 520 нм при возбуждении флуоресценции длиной волны 400 нм); черная кривая – исходный образец, красная кривая – после воздействия пероксидом водорода. Для хроматограмм исходного образца ($D_{\mu cx}$ или $I_{\mu cx}$) и после воздействия пероксидом водорода ($D_{окисл}$ и $I_{окисл}$) показаны отдельные оси ординат. D – детектирование по поглощению, I – детектирование по флуоресценции; \mathcal{m} – сигнал ЭПР оммохромов бабочки бражник табачный. Исходный спектр (I); спектр после окисления пероксидом водорода (2). Измерения проведены на суспензии оммохромов в фосфатном буфере при температуре жидкого азота



Рис. 6. Тушение хемилюминесценции люминола оммохромами насекомых. a — Кинетика хемилюминесценции люминола в присутствии различных концентраций оммохромов мраморного таракана. I — контроль, 2-5 — добавлено 100 мкг/мл, 150 мкг/мл, 250 мкг/мл и 400 мкг/мл оммохромов соответственно. Контрольными образцами служили пробы, содержащие буферный раствор без оммохромов; δ — латентный период возгорания хемилюминесценции люминола в присутствии различных оммохромов в концентрации 750 мкг/мл. 1 — муха черная львинка, 2 — таракан мраморный, 3 — бабочка бражник табачный, 4 — жук чернотелка, 5 — саранча пустынная. Каждый столбик — результат 4 независимых измерений. Данные статистически значимы для p < 0.05. Среда инкубации содержала 0.05 М К-фосфатный буфер, pH 7,4, 2,0 мкМ гемоглобин, 100 мкМ люминол, 100 мкМ ЭДТА и суспензию различных оммохромов в К-фосфатном буфере. Реакцию начинали добавлением 100 мкМ пероксида водорода

дение амплитуды хемилюминесценции, так и увеличение временного периода достижения максимума свечения.

Концентрация оммохромов 400 мкг/мл (рис. 6, *a*, кривая 5) вызывала значительное ингибирование развития процесса хемилюминесценции люминола. Для сравнения антирадикальной активности различных оммохромов, были определены сравнительные величины латентного периода хемилюминесценции люминола при одинаковой концентрации всех изучаемых оммохромов (рис. 6, δ), составляющей 750 мкг/мл. Каждый столбик — среднее 4 независимых измерений латентного периода развития хемилюминесценции (рис. 6, δ). В этих условиях наибольшей антирадикальной активностью обладали оммохромы мухи черная львинка и мраморного таракана (столбики 1 и 2), а оммохромы жука чернотелки и саранчи пустынной (столбики 4 и 5) проявляли наименьшую антира-



Рис. 7. Ингибирующее действие оммохромов мухи черная львинка (1) и бабочки бражник табачный (2) на Fe^{2+} – аскорбат индуцированную пероксидацию кардиолипиновых липосом. Каждый столбик – результат трех независимых измерений. Результат статистически значим для p < 0.05. Среда инкубации содержала 0,1 М К-фосфатный буфер, рН 7,4, 265 мкг/мл кардиолипиновых липосом, 0,5 мМ аскорбат и 35 мкМ Fe^{2+} . Концентрация оммохромов была 90 мкг/мл; контроль без добавления оммохромов



Рис. 8. Ингибирующее действие оммохромов пустынной саранчи на пероксидацию наружных сегментов фоторецепторных клеток (НСФ), инициализированную облучением видимым светом в присутствии липофусциновых гранул. Каждый столбик – результат трех независимых измерений. Результат статистически значим для p < 0,05. Среда инкубации содержала 0,1 М К-фосфатный буфер, рН 7,4, 200 мкг/мл белка НСФ и 5 × 10⁶ гранул/мл липофусцина; концентрация оммохромов составляла 46 (*I*) и 77 мкг/мл (*2*), соответственно; контроль – скорость пероксидации НСФ в отсутствие оммохромов принята за 100%

дикальную активность. Этот результат коррелирует с данными по концентрации стабильных свободно радикальных центров в оммохромах. Действительно, их концентрация в оммохромах жука чернотелки и саранчи пустынной минимальна. С другой стороны, остается непонятным более высокая антирадикальная активность оммохромов мраморного таракана (столбик 2) по сравнению с таковой для оммохромов бабочки табачного бражника (столбик 3), поскольку концентрация парамагнитных центров оммохромов бабочки значительно выше, чем у мраморного таракана. Как уже упоминалось, константа тушения хемилюминесценции люминола оммохромами мухи черная львинка довольно высока, что характеризует эти пигменты как довольно сильные антиоксиданты. Из рис. 6, б следует, что эффективность тушения хемилюминесценции оммохромами мраморного таракана не уступает таковой для оммохромов черной львинки, а эффективность тушения хемилюминесценции оммохромами бабочки бражник табачный, жука чернотелки и саранчи пустынной хотя и ниже, чем у оммохромов мухи черная львинка, но сопоставима с ней. Важно отметить, что концентрация оммохромов в глазах изученных насекомых очень высока. По нашим расчетам, содержание оммохромов, например, в глазу мухи черная львинка достигает 90 мг/мл, а в глазу саранчи пустынной 45 мг/мл. Это значительно превосходит использованные нами в эксперименте концентрации оммохромов (< 1 мг/мл).

Оммохромы всех изученных насекомых ингибировали реакции пероксидации, индуцированные различными прооксидантными системами. Антиоксидантная активность оммохромов была определена для трех различных систем индукции процесса пероксидации, для: Fe²⁺-аскорбат-индуцированной пероксидации кардиолипиновых липосом (рис. 7); аскорбат индуцированной пероксидации наружных сегментов фоторецепторных клеток глаза быка (не показано); фотоиндуцированной пероксидации наружных сегментов фоторецепторных клеток, сенсибилизированной липофусциновыми гранулами из клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека (рис. 8).

В этих экспериментах использовали оммохромы мухи черная львинка, бабочки бражник табачный (рис. 7) и саранчи пустынной (рис. 8). Все они проявляли выраженную антиоксидантную активность, ингибируя процессы пероксидации и фотопероксидации уже в относительно низких концентрациях. Антиоксидантная активность оммохромов насекомых была сопоставима с таковой для природных меланинов [12] и для синтетических антиоксидантов оксипиридино-

БИОХИМИЯ том 85 вып. 6 2020

вого ряда [23]. В наших экспериментах оммохромы в концентрации 0,5 мг/мл приводили к практически 90% ингибированию свободнорадикальных процессов. Важно отметить, что оммохромы эффективно тормозили сенсибилизированную липофусцином фотопероксидацию наружных сегментов фоторецепторных клеток (рис. 8). Уже в концентрации 0,08 мг/мл (≈ 0,2 мМ) они ингибировали эту реакцию на 70%, тогда как хорошо известный синтетический антиоксидант мексидол в концентрации 0,5 мМ ингибировал эту же реакцию не более чем на 50% [35]. Поэтому, разумно предположить, что оммохромы, содержащиеся в сложных глазах насекомых в большом избытке, могут оказывать значительное антиоксидантное действие. Механизмы антиоксидантного действия оммохромов могут быть связаны с их реакцией с активными формами кислорода и со способностью утилизировать свободные радикалы [9, 11, 15, 16].

Таким образом, разработана относительно простая процедура изоляции оммохромов из голов кормовых насекомых. По своим типичным физико-химическим характеристикам эти пигменты могут быть отнесены к группе омматинов [1, 2, 8, 36]. Кормовые насекомые, широко используемые в практических целях и культивируемые в контролируемых условиях (как в лабораторных, так и промышленных масштабах), являются хорошими природными источниками большого количества оммохромов. Так, по нашим данным, из голов мухи черная львинка можно извлечь более 4% сухого веса оммохромов от влажного веса исходного сырья. Благодаря своей биологической активности эти природные пигменты могут рассматриваться как перспективные фармакологические препараты, главным образом, для предотвращения и лечения патологий, связанных с развитием окислительного стресса. Полученные нами результаты важны для понимания механизмов осуществления биологической функции оммохромов как экранирующих и антиоксидантных пигментов, в первую очередь, в омматидиях сложного глаза беспозвоночных животных.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-04-00411).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Содержание и эксперименты с животными были выполнены в соответствии с Правилами лабораторной практики Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 708н от 23-08.2010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Butenandt, A., and Schafer, W. (1962) Recent Progress in the Chemistry of Natural and Synthetic Coloring Matters and Related Fields (Gore, T. S., Joshi, B. S., Sunthankar, S. V., and Tilak, B. D., eds.) Academic Press, NY, USA, pp. 13-34, doi: 10.1177/004051756303300710.
- Figon, F., and Casas, J. (2019) Ommochromes in invertebrates: biochemistry and cell biology, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 94, 156-183, doi: 10.1111/brv.12441.
- Riou, M., and Christides, J.-P. (2010) Cryptic color change in a crab spider (*Misumena vatia*): Identification and quantification of precursors and ommochrome pigments by HPLC, *J. Chem. Ecol.*, 36, 412-423, doi: 10.1007/s10886-010-9765-7.
- Stavenga, D. G., Leertouwer, H. L., and Wilts, B. D. (2014) Coloration principles of nymphaline butterflies – thin films, melanin, ommochromes and wing scale stacking, *J. Exp. Biol.*, 217, 2171-2180, doi: 10.1242/jeb.098673.
- Panettieri, S., Gjinaj, E., John, G., and Lohman, D. J. (2018) Different ommochrome pigment mixtures enable sexually dimorphic Batesian mimicry in disjunct populations of the common palmfly butterfly, *Elymnias hypermnestra*, *PLoS One*, **13**, e0202465, doi: 10.1371/ journal.pone.0202465.
- Dontsov, A. E., Fedorovich, I. B., Lindström, M., and Ostrovsky, M. A. (1999) Comparative study of spectral and antioxidant properties of pigments from the eyes of two *Mysis relicta* (Crustacea, Mysidacea) populations, with different light damage resistance, *J. Compar. Physiol. B*, 169, 157-164, doi: 10.1007/s003600050206.
- 7. Грибакин Ф. Г. (1981) *Механизмы фоторецепции насе*комых, Наука, Л., с. 214.
- Островский М. А., Зак П. П., Донцов А. Е. (2018) Меланосомы глаза позвоночных и оммохромы глаза беспозвоночных как экранирующие клеточные органеллы, Известия РАН Сер. Биол., 6, 658-668, doi: 10.1134/ S0002332918060103.
- Ostrovsky, M. A., Sakina, N. L., and Dontsov, A. E. (1987) An antioxidative role of ocular screening pigments, *Vis. Res.*, 27, 893-899, doi: 10.1016/0042-6989(87)90005-8.
- Insausti, T. C., LeGall, M., and Lazzari, C. R. (2013) Oxidative stress, photodamage and the role of screening pigments in insect eyes, *J. Exp. Biol.*, **216**, 3200-3207, doi: 10.1242/jeb.082818.
- Островский М. А., Донцов А. Е. (2019) Меланосомы глаза позвоночных и оммохромы глаза беспозвоночных как антиоксидантные клеточные органеллы, Известия РАН Сер. Биол., 1, 95-108, doi: 10.1134/ S0002332919010089.
- 12. Ushakova, N., Dontsov, A., Sakina, N., Bastrakov, A., and Ostrovsky, M. (2019) Antioxidative properties of melanins and ommochromes from black soldier fly Hermetia illucens, *Biomolecule*, **9**, 408, doi: 10.3390/biom9090408.
- Stowe, S. (1983) Phagocytosis of rhabdomeral membrane by crab photoreceptors, *Cell Tissue Res.*, 234, 463-467, doi: 10.1007/BF00213782.
- Фельдман Т. Б., Донцов А. Е., Яковлева М. А., Федорович И. Б., Линдстрем М., Доннер К., Островский М. А. (2008) Сравнение систем антиоксидантной защиты в глазах двух популяций креветок *Mysis relicta* (Crustacea: Mysidacea), отличающихся по их устойчивости к фотоповреждению, *Сенсорные системы*, 22, 309-316.
- Romero, Y., and Martinez, A. (2015) Antiradical capacity of ommochromes, *J. Mol. Model.*, **21**, 220, doi: 10.1007/ s00894-015-2773-3.
- Zhuravlev, A. V., Zakharov, G. A., Shchegolev, B. F., and Savvateeva-Popova, E. V. (2016) Antioxidant properties of

kynurenines: density functional theory calculations, *PLoS Comput. Biol.*, **12**, e1005213, doi: 10.1371/journal.pcbi. 1005213.

- Farmer, L. A., Haidasz, E. A., Griesser, M., and Pratt, D. A. (2017) Phenoxazine: a privileged scaffold for radical-trapping antioxidants, *J. Org. Chem.*, **82**, 10523-10536, doi: 10.1021/acs.joc.7b02025.
- Егоров С. Ю., Красновский А. А., Донцов А. Е., Островский М. А. (1987) Тушение синглетного молекулярного кислорода экранирующими пигментами – меланинами и оммохромами, Биофизика, 32, 685-687.
- Егоров С. Ю., Бабижаев М. А., Красновский А. А., Шведова А. А. (1987) Фотосенсибилизированная генерация синглетного молекулярного кислорода эндогенными фотосенсибилизаторами хрусталика глаза человека, Биофизика, 32, 169-171.
- Снытникова О. А., Шерин П. С., Копылова Л. В., Центалович Ю. П. (2007) Кинетика и механизм реакции фотовозбужденного кинуренина с молекулами биологических соединений, Известия РАН. Сер. Хим., 4, 704-710, doi: 10.1007/s11172-007-0109-х.
- Tsentalovich, Y. P., Snytnikova, O. A., Sherin, P. S., and Forbes, M. D. (2005) Photochemistry of kynurenine, a tryptophan metabolite: properties of the triplet state, *J. Phys. Chem. A*, **109**, 3565-3568, doi: 10.1021/jp045142k.
- Донцов А. Е., Ушакова Н. А., Садыкова В. С., Бастраков А. И. (2020) Оммохромы *Hermetia illucens*: получение, исследование антиоксидантных характеристик и антимикробной активности, *Прикл. Биохим. Микробиол.*, 56, 90-95, doi: 10.31857/S0555109920010043.
- Смирнов Л. Д., Кузнецов Ю. В., Проскуряков С. Я., Скворцов В. Г., Носко Т. Н., Донцов А. Е. (2011) Антирадикальная и NO-ингибирующая активность β-гидрокси(этокси) производных азотистых гетероциклов, Биофизика, 56, 316-321, doi: 10.1134/S000635091102028X.
- 24. Донцов А. Е., Сакина Н. Л., Островский М. А. (2017) Потеря меланина клетками РПЭ глаза связана с его окислительной деструкцией в составе меланолипофусциновых гранул, *Биохимия*, 82, 8, 1188-1198, doi: 10.1134/S0006297917080065.
- 25. Mc Dowell, J. H. (1993) Preparing rod outer segment membranes, regenerating rhodopsin, and determining rhodopsin concentration, in: *Methods in Neurosciences* (Hargrave, P. A., ed) Acad. Press, New York, **15**, pp. 123-130, doi: 10.1016/B978-0-12-185279-5.50013-3.
- Li, J., Berntsen, B. T., and James, A. A. (1999) Oxidation of 3-hydroxykynurenine to produce xanthommatin for eye pigmentation: a major branch pathway of tryptophan catabolism during pupal development in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti, Bioch. Mol. Biol.*, 29, 329–338, doi: 10.1016/s0965-1748(99)00007-7.
- Теселкин Ю. О., Бабенкова И. В., Любицкий О. Б., Клебанов Г. И., Владимиров Ю. А. (1997) Измерение антиоксидантной активности плазмы крови в системе гемоглобин – пероксид водорода – люминол, *Вопросы Med. Химии*, 43, 87-92.
- Ottolenghi, A. (1959) Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids, *Arch. Biochem. Biophys.*, 7, 355–363, https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90414-X.
- Figon, F., Munsch, T., Croix, C., Viaud-Massuard, M.-C., Lanoue, F., and Casas, J. (2019) Biological identification and localization of uncyclized xanthommatin, a key intermediate in ommochrome biosynthesis: an *in vitro–in vivo* study, *bioRxiv Preprint*, doi: 10.1101/666529.
- 30. Martel, R. R., and Law, J. H. (1991) Purification and properties of an ommochrome-binding protein from the

hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *J. Biol. Chem.*, **266**, 21392-21398.

- Bolton, J. R. (1972) Experimental aspects of biological electron spin resonance studies, in *Biological Application of Electron Spin Resonance* (Swartz, H. M., Bolton, J. R., and Borg, D. C., eds.), Wiley (Interscience), NY, USA, 1972, p. 11.
- p. 11.
 32. Lhoste, J.-M., Haug, A., and Ptak, M. (1966) Electron paramagnetic resonance studies of photoselected triplet molecules. I. Phenoxazine, J. Chem. Phys., 44, 648-654, doi: 10.1063/1.1726739.
- Bolognese, A., Bonomo, R. P., Chillemi, R., and Sciuto, S. (1990) Oxidation of 3-hydroxykynurenine. An EPR investigation, *J. Heterocyclic Chem.*, 27, 2207-2208, doi: 10.1002/jhet.5570270762.
- Ephrussi, B., and Herold, J. L. (1944) Studies of eye pigments of drosophila. I. Methods of extraction and quantitative estimation of the pigment components, *Genetics*, 39, 148-175.
- 35. Донцов А. Е., Коромыслова А. Д., Кузнецов Ю. В., Сакина Н. Л., Островский М. А. (2014) Антирадикальная и фотопротекторная активность оксибиола нового водорастворимого антиоксиданта гетероароматического ряда, Известия РАН. Сер. Хим., 5, 1159-1163, doi: 10.1007/s11172-014-0565-z.
- Becker, E. (1942) On the properties, distribution and the genetic developmental physiological significance of the pigments of the ommatin and ommin group (ommochromes) in arthropods, *Mol. Gener. Genet.*, **80**, 157-204, doi: 10.1007/BF01741981.

OMMOCHROMES OF THE COMPLEX EYE OF INSECTS: PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND ANTIOXIDANT ACTIVITY*

A. E. Dontsov¹, N. L. Sakina¹, M. A. Yakovleva¹, A. I. Bastrakov², I. G. Bastrakova³, A. A. Zagorinsky⁴, N. A. Ushakova², T. B. Feldman^{1,5}, and M. A. Ostrovsky^{1,5**}

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; E-mail: ostrovsky@mail.ru

² Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

³ All-Russian Research Institute of Silviculture and Mechanization of Forestry, 141200 Pushkino, Moscow Region, Russia

⁴ Russian Forest Protection Center, 141202 Pushkino, Moscow Region, Russia
 ⁵ Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Received April 1, 2020 Revised May 5, 2020 Accepted May 8, 2020

The objective of this study was screening of ommochromes from the compound eyes of insects and comparison of their antioxidant properties. Ommochromes were isolated in preparative quantities from insects of five different families: Stratiomyidae, Sphingidae, Blaberidae, Acrididae, and Tenebrionidae. The yield of ommochromes (dry pigment weight) was 0.9-5.4% of tissue wet weight depending on the insect species. Isolated pigments were analyzed by high-performance liquid chromatography and represented a mixture of several ommochromes of the ommatin series. The isolated ommochromes displayed a pronounced fluorescence with the emission maxima at 435-450 nm and 520-535 nm; furthermore, the emission intensity increased significantly upon ommochrome oxidation with hydrogen peroxide. The ommochromes produced a stable EPR signal consisting of a singlet line with g = 2.0045-2.0048, width of 1.20-1.27 mT, and high concentration of paramagnetic centers (> 101⁷ spin/g dry weight). All the investigated ommochromes demonstrated high antiradical activity measured from the degree of chemiluminescence quenching in a model system containing luminol, hemoglobin, and hydrogen peroxide. The ommochromes strongly inhibited peroxidation of the photoreceptor cell outer segments induced by visible light in the presence of lipofuscin granules from the human retinal pigment epithelium, as well as suppressed iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. The obtained results are important for understanding the biological functions of ommochromes in invertebrates and identifying invertebrate species that could be used as efficient sources of ommochromes for pharmacological preparations to prevent and treat pathologies associated with the oxidative stress development.

Keywords: ommochromes, insects, EPR spectrometry, fluorescence, antioxidant activity

УДК 577.355.132

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СВЯЗЬ ФИКОЭРИТРИНА С ФОТОСИСТЕМОЙ II У КРИПТОФИТОВОЙ ВОДОРОСЛИ *Rhodomonas salina**

© 2020 И.Н. Стадничук^{1**}, Т.М. Новикова², Г.С. Минюк², В.А. Бойченко³, Ю.В. Болычевцева⁴, Е.С. Гусев¹, Е.П. Лукашев⁵

¹ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276 Москва, Россия; электронная почта: stadnichuk@mail.ru

² ФИЦ Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, 299011 Севастополь, Россия

³ Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук,

142290 Пущино, Московская обл., Россия

⁴ ФИЦ Биотехнологии, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,

биологический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 09.04.2020 После доработки 02.05.2020 Принята к публикации 03.05.2020

Криптофитовые водоросли занимают особую пигментную нишу среди оксигенных фотосинтетиков, обладая уникальным для пластид сочетанием фикобилипротеинов и хлорофилл *a/c*-содержащей антенны. Сведения о фотосинтезе криптофит, несмотря на успехи в изучении морфологии, экологии и геносистематики, остаются недостаточными. Неизвестно соотношение фотосистем I и II (ФС I и II) и противоречивы данные о специфике участия антенных комплексов в их функционировании. В данной работе впервые удалось показать, что у криптофитовой водоросли *Rhodomonas salina* ФС I и ФС II входят в состав тилакоидных мембран в соотношении 1 : 4, в то время как известные пропорции у цианобактерий и высших растений равняются соответственно 3 : I и 1 : 1. Кроме того, выявлено, что фикобилипротеиновая антенна, представленная у *R. salina* фикоэритрином-545 (ФЭ-545), связана, в отличие от цианобактерий, только с ФС II, что означает особую пространственную укладку этих белков-пигментов, не вступающих внутри тилакоидов в контактные взаимодействия с ФС I.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: криптофиты, фикобилипротеины, фикоэритрин, хлорофилл *a*, хлорофилл *c*, фотосистема I, фотосистема II.

DOI: 10.31857/S0320972520060056

введение

Двужгутиковые криптофитовые водоросли (криптофиты) благодаря фикобилипротеинам, поглощающим свет в «зеленом окне» хлорофилла, формируемом поверхностными водорослями других групп, могут обитать в глубоких нижних слоях фитопланктона [1–3]. Криптофиты входят в разнообразную по составу представителей группу Chromoalveolates — водорослей, чьи хлоропласты имеют четыре наружные мембраны и содержат хлорофилл с (Хл с). У оксигенных фотосинтетиков фотосинтез связан с фоторазложением воды и выделением кислорода за счет взаимодействия двух фотосистем. Пигмент-белковые комплексы фотосистемы I (ФС I) и фотосистемы II (ФС II) находятся в тилакоидах криптофит и других водорослей, как и высших растений, в виде димеров ФС II и мономеров ФС I [4, 5]. Антенные комплексы, передающие поглощенную световую энергию фотосистемам, характеризуются разнообразием. Известны три типа антенн: 1) фикобилисомная у цианобактерий и красных водорослей; 2) Хл а/b-содержащая у зеленых водорослей и высших растений; 3) Хл *а/с*-содержащая у многочисленных групп Chromophyta. Хлорофилл *с* в составе хлорофилл *а/с*-протеина является аналогом хлорофилла *b* в Хл а/b-содержащих белках. Эти мембранные

Принятые сокращения: ФБС – фикобилисома; ФЭ-545 – фикоэритрин-545; ФС II (ФС I) – фотосистема II (фотосистема I); Хл a – хлорофилл a; Хл c – хлорофилл c; Хл a/c-протеин – хлорофилл a/c-протеин.

^{*} Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio. msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-092, 01.06.2020.

^{**} Адресат для корреспонденции.

светособирающие пигмент-белковые комплексы (LHC) делятся на несколько белковых семейств. Хлорофилл a/c-комплексы криптофит входят в семейство САС-протеинов (chlorophyll a/c-proteins) [6, 7]. Общим свойством гомологичных LHC белков-пигментов является наличие до 14–15 хлорофилльных молекул. Соотношение Хл a : Хл b, как и Хл a : Хл c в LHC-семействах может быть различным, но всегда с преобладанием молекул Хл a [8]. Известно несколько хлорофиллов c: Хл c_1 , Хл c_2 , Хл c_3 и др. У большинства видов криптофит в клетках находится Хл c_2 [6, 9].

Криптофитовые водоросли уникальны добавлением к Хл а/с-протеину фикобилипротеиновой антенны. Фикобилипротеины криптофит не встречаются в цианобактериях или красных водорослях, являясь оригинальными белкамипигментами. В соответствии с окраской их делят на синие фикоцианины (ФЦ) и красные фикоэритрины (Φ Э). Семь (или, возможно, восемь) белков-пигментов двух цветовых групп обозначаются по своим длинноволновым максимумам (нм) поглощения: ФЭ-545, ФЭ-555, ФЭ-566, ФЦ-569, ФЦ-612, ФЦ-630 и ФЦ-645 [10, 11]. Окраска белков и вид спектров определяются различными сочетаниями хромофоров в составе каждого фикобилипротеина. Из шести химически идентифицированных фикобилиновых хромофоров фикоцианобилин и фикоэритробилин совпадают с установленными для красных водорослей и цианобактерий, остальные четыре – оригинальны [11]. Каждый фикобилипротеин является полипептидным гетеродимером $(\alpha_1\beta\alpha_2\beta)$, т.е. содержит две разные α -субъединицы и два идентичных β-полипептида общей массой ~60 кДа. На α-полипептидах находится по одному хромофору, на β – три хромофора, и, в итоге, в состав димера входит восемь хромофорных групп. Субъединицы β кодируются в геноме пластид, но α_1 и α_2 кодируются клеточным ядром и с помощью сигнальных пептидов транспортируются клеткой через четыре наружные мембраны внутрь хлоропласта, где собираются в димерные комплексы. При наличии лишь двух генов β-субъединицы [12] неоднократная дупликация привела к появлению большого семейства α-субъединиц, насчитывающем до 20 генов, хотя в каждый момент, зависящий условий обитания, преимущественно OT экспрессируются какие-либо две из них [13]. У цианобактерий и красных водорослей фикобилипротеины собраны в фикобилисомы – мегакомплексы массой несколько миллионов дальтон, насчитывающие несколько сот фикобилиновых хромофоров. У криптофит ($\alpha_1\beta\alpha_2\beta$)-гетеродимеры не объединяются в фикобилисомы и находятся не на стромальной поверхности тилакоидной мембраны подобно фикобилисомам, а располагаются во внутренней, люменальной части тилакоидов [14, 15].

Надмолекулярная организация фикобилипротеинов и их локализация в объеме тилакоидного люмена остаются под вопросом. Димеры заполняют все пространство люмена и, возможно, собираются в цилиндрические структуры, расположенные перпендикулярно к мембране тилакоида [14—16]. Структурные данные, полученные различными методами, не позволяют в настоящее время прийти к окончательным выводам о надмолекулярной архитектуре [17]. Различить детали самосборки в клетке относительно мелких (~60 кДа) димеров, подобную самосборке фикобилисом, или биохимически выделить возможные белковые макроструктуры не удается, это требует дальнейших исследований.

Вопрос об особенностях Хл а/с-протеинов сводится к изучению топографии этих белков в плоскости тилакоидной мембраны. Благодаря использованию одночастичной электронной микроскопии удалось выяснить, что Хл а/с-протеины в числе от четырех до восьми примыкают к боковым поверхностям димеров ФС II и мономеров ФС I [5], повторяя в значительной мере вид суперкомплексов Хл а/b-протеинов в составе ФС II и ФС I у высших растений и зеленых водорослей [7]. Эти данные вместе с различными спектральными исследованиями обоснованно привели к заключению о прямой передаче поглощенной энергии от Хл а/с-содержащей антенны к обеим фотосистемам. Тем более актуальным становится вопрос о роли фикобилипротеинов как антенны криптофит. Передача энергии от фикобилипротеинов к Хл а в клетке была выявлена спектроскопически, начиная с первых исследований на эту тему [18], но вопрос о возможности миграции только к ФС II или также к ФС I исследуется до сих пор. Из солюбилизированных пластид водоросли Cryptomonas rufescens в градиенте плотности сахарозы получен комплекс ФЭ-565 и ФС II [19], а из вида Chroomonas placoidea выделен комплекс, содержащий одновременно ФЦ-645 и Хл а/с-протеин [20]. Ограниченные возможности совместного выделения водорастворимых фикобилипротеинов и мембранных белков (ФС II или Хл a/cпротеин) не исключают возможности артефактов. Проблема усугубляется нехваткой сведений о соотношении двух фотосистем в пластидах криптофит и тем самым о доле антенного $X_{\pi} a$, приходящейся на каждую из них.

Существуют разные представления о возможной связи с фотосистемами и тем самым о передаче поглощаемой фикобилипротеинами энергии к $\Phi C I$ и $\Phi C II$. Сделаны предположения о ферстеровском механизме переноса энергии напрямую или при посредничестве Хл *a/с*-протеина [21, 22]. Проводили регистрацию стационарных спектров флуоресценции или возбуждения для клеток при комнатной и низкой температуре, когда излучение относится только к Хл *a* ΦC II или к Хл *a* обеих фотосистем [23, 24]; проводили сверхбыстрые флуоресцентные измерения и глобальный спектральный анализ флуоресценции пигментов у криптофитовых водорослей в широком спектральном диапазоне [25], допускающие возможность распределения поглощенной энергии между фотосистемами.

Для решения вопроса о роли фикобилипротеинов в клетках криптофит провели сопоставление стационарных флуоресцентных измерений, оценку влияния фикобилипротеинов на степень фотоокисления реакционного центра Р700, принадлежащего ФС I, регистрацию спектров действия двух фотосистем, а также сделаны расчеты, определяющие соотношение ФС I, ФС II и антенных комплексов. Водоросли *Rhodomonas* являются удобными моделями для изучения криптофит и их фотосинтетического аппарата. Был использован вид *R. salina*, который, как и многие другие виды данного рода, содержит ФЭ-545 наряду с Хл *a/с*-протеином.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы и условия культивирования. Морскую микроводоросль *Rhodomonas salina* (Wislouch) (Стурtomonades) из коллекции ФИЦ ИнБЮМ РАН выращивали на стандартной среде Уолна в 100 мл колбах при температуре 22 °С на постоянном белом свету 30 мкМ м⁻² с⁻¹ и перемешивании культуры магнитной мешалкой. Клетки собирали центрифугированием при 180 *g* в конце логарифмической фазы роста, на 5-й или 6-й день выращивания, сразу используя в экспериментах.

Спектры поглощения и флуоресценции. Поглощение клеток *R. salina* и выделенного из них Φ Э-545 регистрировали на спектрофотометре Varian 2300 UV Vis (США). Размер кювет для минимизации светорассеяния равнялся 2 мм. Спектры флуоресценции клеток измеряли на спектрофлуориметре Fluorolog-3 («Horiba Jobin Ivon», Япония). При комнатной температуре клеточные образцы помещали в 5 мм кюветы и при 77 К – в стеклянные капилляры с внутренним диаметром 2 мм, где их оптическая плотность при 678 нм не превышала 0,1. Полуширина спектральной щели для возбуждающего и регистрируемого излучения составляла 3 нм.

Спектр каждого образца записывали 3–5 раз, усредняли, после чего вычитали вклад рассеянного света, используя математическое обеспечение флуориметра.

Получение ФЭ-545 и тилакоидных мембран. Клетки, промытые 0,01 М К-фосфатным буферным раствором, pH 6,5, дважды подвергали замораживанию-оттаиванию при -20 °C, вызывая у криптофит, не имеющих прочных клеточных стенок, выход ФЭ-545 (и других водорастворимых белков) в буферный раствор. Водонерастворимую мембранную фракцию отделяли на настольной центрифуге, собирая белок-пигмент из надосадочной жидкости высаливанием 60%-ным сульфатом аммония. После ресуспендирования и диализа в том же буферном растворе препарат наносили на ионообменную хроматографическую колонку с носителем ДЕАЕ-52 (2 × 11 см, «Whatman», США), получая очищенный ФЭ-545. Зеленую осадочную фракцию после суспендирования в 0,1 М Tris-глициновом буферном растворе (рН 8,5) собирали и после дополнительной промывки и удаления неразрушенных клеток использовали как препарат тилакоидных мембран.

Обратимое фотоокисление Р700 фиксировали по разности поглощения клеток при 810 и 870 нм с помощью двухволнового регистратора сигнала ED-P700 DW (PAM-101, Германия) [26]. Образец после темновой адаптации (10 мин) освещали галогеновой лампой KL 1500 («Schott», Германия). Свет после интерференционных фильтров BPF 680/35 или BPF 580/35 (ООО «Фотооптик», Россия) и теплового фильтра («Balzers», Лихтенштейн) выравнивали по интенсивности (500 мкМ фотонов м⁻²с⁻¹), проводя измерения в кювете толщиной 0,3 см для образцов с концентрацией Хл *a*, равной 10 мкг мл⁻¹.

Спектры действия фотосинтеза регистрировали по фотоиндуцированному парциальному выделению O_2 (ФС II) и по светозависимому поглощению кислорода (ФС I) на специализированной установке [27], сочетающей полярографию и освещение клеток вспышками монохроматического света в области от 400 до 720 нм с равной интенсивностью $0,2 \text{ мкM см}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Темновые перерывы для восстановления исходной фотоактивности образцов составляли 40 с. Клеточную суспензию объемом 20 мкл в 50 мМ Naфосфатном буферном растворе/50 мМ КСl, pH 6,8, и с оптической плотностью 0,15 (Хл а) помещали на поверхность высокочувствительного освещаемого платинового электрода с Ag/AgClэлектродом сравнения. Для регистрации фотоактивности ФС II кислородное дыхание клеток нейтрализовали, подсвечивая образец слабым постоянным светом ≥ 700 нм. Для регистрации активности ФС I к образцу добавляли 10 мкМ

DCMU для нейтрализации активности ФС II, как подробно описано ранее [27, 28]. Спектры усредняли, проводя измерения для 3–5 независимых клеточных образцов.

Стехиометрию пигмент—белковых комплексов и соотношение ФС І/ФС ІІ рассчитывали, используя коэффициенты экстинкции ФЭ-545 Хл *а* и Хл *с* [29–31]. Соотношение ФС I и ФС II (соотношение реакционных центров ФС І/ФС ІІ) определяли, суммируя спектры действия двух фотосистем и приводя сумму к минимальному расхождению со спектром поглощения клеток *R. salina* благодаря итерациям с использованием метода наименьших квадратов в спектральной области суммирования [28, 32].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектры поглощения. Спектр поглощения клеток R. salina типичен для водорослей Rhodo*monas* (рис. 1). Полоса Соре Хл *а* находится на участке 400–440 нм, полоса Хл *с* – при 455 нм; интенсивная полоса каротиноидов, с основным из них, аллоксантином [3], расположена при 495 нм. Максимум, принадлежащий в красной области Хл с, выявляется при 635 нм, основная красная полоса Хл а – при 676 нм. Спектр поглощения ФЭ-545, выделенного из клеток *R. salina* (рис. 1), имеет характерный контур [33]. Максимум при 545 нм сопровождается близкорасположенным с ним плечом 565 нм; эти полосы характеризуют два вида («сорта») фикобилинов в составе ФЭ-545, более коротковолновый фикоэритробилин и более длинноволновый дигидробиливердин [33].



Рис. 1. Спектр поглощения клеток *R. salina* (1); спектры выделенных из клеток Φ Э-545 (2), тилакоидных мембран (3) и суммарный спектр (4) (спектр 2 + спектр 3), моделирующий спектр клеток (1)

БИОХИМИЯ том 85 вып. 6 2020



Рис. 2. Спектры флуоресценции клеток *R. salina*, измеренные при комнатной температуре (*a*) и при 77 К (*б*). Возбуждение флуоресценции при 440 нм (*1*) и при 525 нм (*2*). Спектры приравнены в наибольших максимумах излучения

В спектре целых клеток участок длинноволнового склона, принадлежащий поглощению Φ Э-545, заметно уширен за счет перекрывания с сателлитными полосами Хл *с* и Хл *а*, которые хорошо различимы также в спектре выделенного из тилакоидов Хл *a/c*-протеина [8] и в спектре действия Φ С I (см. далее). Полосы, наблюдаемые в спектре тилакоидных мембран *R. salina*, повторяют полосы в спектре поглощения целых клеток за исключением области, принадлежащей поглощению Φ Э-545 (рис. 1).

Спектры флуоресценции клеток *R. salina* (рис. 2, *a*) при комнатной температуре зарегистрированы для возбуждения при двух длинах волн: 440 нм (полосы Соре Хл *a* и Хл *c*) и 525 нм (Φ Э-545). В первом случае спектр представлен одной интенсивной полосой Φ C II при 685 нм. Более коротковолновая флуоресценция, которая могла бы теоретически принадлежать Хл *c*, не наблюдается, подобно тому, как отсутствует флуоресценция Хл *b* у высших растений. Ее отсутствие указывает на практически 100% передачу энергии от Хл *c* к Хл *a*.

Возбуждение излучения при 525 нм, в области поглощения ФЭ-545, также приводит к интенсивной флуоресценции Хл a с полным совпадением максимума 685 нм с предыдущим спектром, что означает перенос энергии от фикобилипротеиновой антенны (рис. 2, a). Наблюдаемая коротковолновая менее интенсивная полоса 588 нм принадлежит, как известно [10, 34], собственно ФЭ-545.

При понижении температуры клеток до 77 К заметного появления длинноволновой флуоресценции Φ C I в спектрах *R. salina* не происходит. Различие со спектрами, полученными при комнатной температуре, сводится к небольшому красному смещению максимума Хл *a* от 685 к 696 нм (рис. 2, δ). Изменения слишком невелики, чтобы спектрально можно было с уверенностью различить две фотосистемы. Отдельные полосы Φ C I и Φ C II неразличимы, в отличие, например, от низкотемпературной флуоресценции высших растений, поэтому возможность участия Φ Э-545 в активности Φ C I при использовании стационарных спектров флуоресценции не проясняется.

Фотоиндуцированное окисление Р700. Первичное фоторазделение заряда в реакционном центре Р700 свидетельствует о передаче поглощенной световой энергии к ФС I. Для выявления передачи необходимо сравнение степени фотоокисления Р700 для двух длин волн, при одной из которых (680 нм) свет напрямую возбуждает Хл a, и при 580 нм – преимущественно антенный комплекс ФЭ-545. Сравнение степени обратимого фотоокисления Р700 показывает, что в последнем случае сигнал уменьшается вдвое в сравнении с прямым возбуждением Хл a в составе комплекса ФС I (рис. 3). Свет 580 нм в клетках, согласно спектру поглощения (рис. 1), на 75% поглощается ФЭ-545.



Рис. 3. Фотоиндуцированные изменения поглощения реакционного центра Р700 в клетках *R. salina*, освещаемых в течение 30 с действующим светом 680 нм (*1*) или 580 нм (*2*) в отсутствие диурона. Стрелками \uparrow и \downarrow обозначены включение и выключение света

Можно допустить, что двойное падение сигнала (рис. 3) указывает на малую эффективность участия ФЭ-545 в функционировании ФС І. Падение интенсивности сопровождается замедлением кинетики фотоокисления Р700 (участки между стрелками \uparrow и \downarrow на рис. 3). Это указывает на увеличение светопоглощения со стороны ФС II при 580 нм, которое должно сопровождаться ростом линейного потока электронов от ФС II к ФС І. «Подпитка» ФС І дополнительными отрицательными зарядами выражается в снижении скорости фотоокисления Р700. В итоге при наличии признаков связи ФЭ-545 с ФС II однозначно судить, чем вызвано меньшее фотоокисление Р700 — недостаточной миграцией энергии от ФЭ-545 к ФС I, особенностями взаимодействия двух фотосистем, или иными причинами – было бы преждевременным.

Спектры действия фотосинтеза. Регистрация спектров действия соответствует условиям, в которых при поглощении клеткой света ΦC II спектральное проявление активности ΦC I не сказывается, и наоборот. Поэтому контур спектра действия каждой фотосистемы повторяет спектр ее поглощения, не искажаемый присутствием в тилакоидах другой фотосистемы [27].

Спектр действия ФС II в коротковолновой области от 400 до 470 нм представляет собой суперпозицию полос, принадлежащих Хл а, Хл с и каротиноидам. В оранжево-красной области, наряду с максимумом Хл а при 676 нм и меньшим по интенсивности максимумом Хл с при 636 нм, спектр характеризуется очень интенсивной полосой 545 нм, легко распознаваемой для Φ Э-545, к которой присоединяется длинноволновое плечо 555 – 575 нм вследствие вклада, даваемого Хл a/c-протеином (рис. 4, a). Спектр действия $\Phi C I$ (рис. 4, *a*) характеризуется всеми полосами, принадлежащими Хл а и Хл с и отмеченными как в спектре поглощения клеток, так и в спектре действия ФС II, но с двумя особенностями, отличающими его от спектра ФС II. Большая относительная интенсивность синей полосы Хл с при 460 нм в сравнении со спектром ФС II означает и бо́льшую долю Хл *а/с*-протеина в составе ФС I [31]. Главной же особенностью спектра действия ФС I служит полное отсутствие спектральных признаков ФЭ-545, что самым наглядным образом свидетельствует о связи ФЭ-545 только с ФС II. Этот вывод убедительно подтверждается разностным спектром этих двух кривых (рис. 4, а, вставка), который своим контуром повторяет спектр поглощения ФЭ-545, представленный на рис. 1.

Соотношение ФС І/ФС II. Соотношение двух фотосистем в хлоропластах является нетривиальной проблемой, в решении которой с



Рис. 4. *а* – Спектры действия фотосинтеза ФС I (*1*) и ФС II (*2*), измеренные для клеток *R. salina*. Спектры нормированы в красном максимуме поглощения Хл *а* при 676–678 нм. На вставке: *3* – разность между спектрами (*2*) и (*1*); *4* – спектр поглощения ФЭ-545; δ – спектр поглощения клеток *R. salina* (*1*) и спектр, моделируемый суммой спектров действия ФС I и ФС II, представленных на рис. 4, *a* и взятых в соотношении 40 и 60% в максимуме хлорофилла (*2*)

разной степенью достоверности используются электрофорез тилакоидных мембран, атразиновая методика выявления активности ФС II и ряд вспомогательных оценок, включая фотоокисление Р700. Мы применили наиболее точный из методов - моделирование спектра поглощения суммой спектров действия, так как сумма двух спектров, взятых в соответствующей пропорции, должна повторять его контур, тем самым устанавливая соотношение двух фотосистем. Как и в случае фикобилисом, у цианобактерий [28] значимая для расчетов суммация спектров ограничена областью 500-700 нм, так как на спектральном участке 400-500 нм некоторые каротиноиды, входящие в состав фотосистем, не способны к 100% передаче энергии к Хл а, что не позволяет получить корректные результаты. В итоге осуществленного суммирования (рис. 4, б) было получено соотношение двух фотосистем, точнее, их реакционных центров, равное 4:1 в пользу ФС II. Данный результат следует из сравнения амплитуд красных полос 676–678 нм в спектрах действия, чья интенсивность пропорциональна содержанию Хл a в коровых комплексах $\Phi C I u \Phi C II$. Соотношение реакционных центров получено с учетом того, что ФС I (96 хлорофиллов [35]) содержит в 2,6 раза большую хлорофилльную антенну, чем ФС II (36 молекул хлорофилла, [36]). Реальными структурами тилакоидной мембраны являются, как уже отмечали, димеры ФС II и мономеры ФС I. Тем самым на каждый мономер $\Phi C I$ в тилакоидах *R. salina* приходится два димера ФС II.

Стехиометрия антенных пигмент-белковых комплексов в составе ФС I и ФС II. Для выяснения особенностей молекулярной организации пигментного аппарата криптофит представлялось существенным установить размеры фикоэритриновой антенны, т.е. число димеров ФЭ-545, приходящихся на каждый реакционный центр ФС II. Моделирование спектра поглощения клеток *R. salina* суммой спектра тилакоидов и спектра ФЭ показал, что оценка вклада ФЭ в спектр и определение его соотношения с Хл а возможны (рис. 1). Расчет, однако, усложняется тем, что часть Хл а в тилакоидах входит в состав Хл а/с-протеина. Поэтому одновременно с ФЭ-545 требуются данные о стехиометрии антенного комплекса Хл а/с-протеина и коровых комплексов $\Phi C II$ и $\Phi C I$. Они могут быть получены с учетом долевого вклада каждого компонента в максимумы поглощения других пигментов и использованием молярных коэффициентов экстинкции в максимумах поглощения (ФЭ-545 при 545 нм; Хл с при 636 нм и Хл а при 676-678 нм). Общая методика расчетов подробно излагается в [28].

На длинноволновом склоне спектра поглощения ФЭ-545 вследствие быстрого падения интенсивности доля пигмента в суммарном поглощении клеток *R. salina* в используемом масштабе сравнения для области \geq 600 нм практически равна нулю (рис. 1). Поэтому, если принять поглощение в максимуме ФЭ₅₄₅ в относительных величинах равным 1, можно записать, что для ФЭ-545: ФЭ₅₄₅ = 1,00; ФЭ₆₃₆ = 0,00 и ФЭ₆₇₆₋₈ = 0,00 (1). Для Хл a относительные доли поглощения, полученные из данных для пигмента в растворе и в составе корового комплекса ФС II, также известны [28]:

Хл $a_{676-8} = 1,00$; Хл $a_{636} = 0,26$ и Хл $a_{545} = 0,1$ (2);

аналогичные доли для Хл с составляют [31]:

Хл $c_{636} = 1,00$; Хл $c_{676-8} = 0,00$ и Хл $c_{545} = 0,14$ (3).

Нас интересует переход от соотношений полос (1) – (3) к молярным соотношениям пигментов и возможность контроля проводимых расчетов. Коэффициент экстинкции ФЭ-545 с учетом мол. массы ($\alpha_1\beta\alpha_2\beta$)-димера, равной 58 кДа, составляет { $\Phi \Theta_{545}$ = 730 мМ⁻¹см⁻¹ [29]. Для Хл а молярный коэффициент экстинкции *in vivo* составляет { Хл a_{676} } = 64 мМ⁻¹ см⁻¹ [30], отличаясь меньшей величиной в сравнении с экстинкцией Хл а в различных растворителях [31]. Для Хл с коэффициент экстинкции в красной полосе отличается от коэффициента Хл а вдвое меньшим значением [31], что дает для пигмента величину { Хл c_{636} } = 32 мМ⁻¹ см⁻¹. Очевидно, вклад ФЭ-545 в поглощение при 636 нм, где находится максимум полосы X_{J} а/*c*протеина, и тем более при 676-678 нм (красный максимум Хл а), согласно (1), может не учитываться; также не учитывается, согласно (3), и вклад Хл с в поглощение Хл а в его красном максимуме, что минимизирует стехиометрические расчеты.

Наиболее простым является определение молярных соотношений комплекса Хл a/c-протеина и коровых комплексов фотосистем. Принимая во внимание, как указывалось, вдвое меньший коэффициент экстинкции Хл c в сравнении с Хл a и соотношения амплитуд (2) и (3), молярная доля { Хл c} по отношению к доле { Хл a} для спектра поглощения D, измеряемого в единицах оптической плотности или сопоставляемого с ним спектра действия определяется формулой:

$$\{ X\pi c \} / \{ X\pi a \} = 2(D_{636} - 0, 26D_{676-8}) / 64 =$$

= 0,16(D₆₃₆ - 0,26D₆₇₆₋₈) (4).

Для тилакоидов исследуемого вида *R. salina* (рис. 1) соотношение { Хл a} /{ Хл с} , согласно (4), составило величину, равную 4,1. После проведения (дополнительно к расчету) клеточной экстракции Хл a и Хл c в 80%-ном ацетоне [8] было получено то же самое соотношение для пигментов в экстракте (данные не представлены). Результат расчета полностью совпадает с

соотношением 4: 1, найденным для близкородственного вида *R. lens* после экстракции и хроматографического разделения пигментов [8]. Полученный контрольный результат служит хорошим подтверждением возможности расчетов соотношения Хл a/Хл с в клетках *R. salina*, *R. lens* и других видов криптофитовых водорослей, содержащих ФЭ-545, не мешающий подобным спектральным оценкам.

Опираясь на полученные данные и регистрацию спектров действия, можно перейти к стехиометрии пигмент-белковых комплексов для обеих фотосистем. Состав Хл а/с-протеина [8] соответствует, по аналогии с составом Хл а/b-протеина [37], суммарному наличию 14 молекул двух пигментов, 6 молекул Хл с и 8 молекул Хл а, связанных с каждой молекулой апопротеина. Амплитуда красного максимума Хл а при 676-678 нм в спектрах действия, как и в спектре поглощения, складывается из вклада двух компонент: поглощения собственного Хл а в коровом комплексе ФС I или ФС II и поглощения молекул Хл а в составе Хл а/с-протеинов, примыкающих [5] в тилакоидной мембране к каждому коровому комплексу. С учетом упомянутого соотношения пигментов в Хл а/с-протеине, равном 6:8, после вычета из амплитуды красного максимума Хл а той доли, которая принадлежит хлорофилльным молекулам Хл а/с-протеина, нами было получено соотношение, равное 25 молекулам Хл с на каждые 72 молекулы Хл а, составляющих димер ФС II. Аналогично, согласно расчетам, выполненным для спектра действия ФС I, на каждые 96 молекул Хл a (состав мономера ФС I) приходится 35-36 молекулы Хл с. Эти соотношения, с округлением до десятых долей, позволили заключить, что каждый димер ФС II, наиболее вероятно, связан с чепигмент-белковыми комплексами тырьмя Хл a/c-протеина, а в контакте с мономерами ΦC I в тилакоидной мембране в среднем находится шесть Хл а/с-антенных комплексов. Эти расчетные результаты полностью согласуются с данными электронной микроскопии [5].

Полученный спектр действия Φ С II (рис. 4, *a*) позволил провести аналогичные расчеты молярного соотношения между хлорофилльными димерами Φ С II и Φ Э-545. Поскольку каждый димер Φ С II (72 молекулы Хл *a*), в среднем, связан с четырьмя Хл *a*/с-протеинами (32 молекулы Хл *a*), измеренная амплитуда полосы Хл *a* при 676 нм в спектре действия Φ С II должна быть уменьшена для расчетов на 40%. Одновременно вследствие вклада контура полос Хл *c* и Хл *a* в полосу 545 нм ее интенсивность, согласно (2) и (3), должна быть уменьшена на ~20%. С учетом этих спектральных поправок и молярных коэф-

фициентов экстинкции каждый димер ФС II в клетках *R. salina* получает энергию в среднем от 9 димеров ФЭ-545. В сравнении с цианобактериями эта величина представляется не слишком большой. Действительно, в составе типичной фикобилисомы, контактирующей с димером ФС II, у цианобактерий находится 250–300 фикобилиновых хромофоров [28]. Наличие до 9 димеров в нашем случае означает связь с димером ФС II лишь $8 \times 9 = 72$ хромофоров, что в 4 раза уступает «фикобилисомному» варианту. Часть этой разницы в размере фикобилипротеиной антенны для криптофит компенсируется другой антенной, Хл *а/с*-протеином [38].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Миграция поглощенной световой энергии от фикобилипротеинов к ФС II у криптофит, как и от фикобилисом у цианобактерий и красных водорослей, никогда не вызывала сомнений. В итоге многолетних исследований было выяснено, что фикобилисомы передают энергию наряду с ФС II и к ФС I [28]. Возможная аналогия с фикобилисомами наводила на мысль о подобной возможности и для криптофитовых водорослей [39]. Стационарные спектры флуоресценции и ее возбуждения указывали на преимущественное [23] или исключительное [24] взаимодействие фикобилипротеинов с ФС II. Импульсная техника и глобальный спектральный анализ при множестве измеряемых временных кинетик и построении теоретически возможных моделей переноса возбуждения указывали на наиболее вероятную возможность миграции к обеим фотосистемам [25]. Крайняя чувствительность криптофитовых водорослей как жгутиковых микроорганизмов к нарушению условий культивирования и подготовки образцов создает высокую вероятность артефактов. В работах [25, 34] на это указывает высокая интенсивность собственной флуоресценции фикобилипротеинов, значительно превышающая излучение Хл а в составе клетки, в то время как в норме ([23, 24] и данная работа, рис. 2) преобладает флуоресценция хлорофилла. Среди кинетических компонент возбуждения появляются компоненты с временами жизни, характерные для фикобилипротеинов в растворе [25, 34], но не в клетке, где энергия от антенны передается к фотосистемам. Эти данные служат индикатором нарушения контактов фикобилипротеинов с тилакоидной мембраной и потери нативности хлоропластов, что ведет в случае [25, 34] к появлению дополнительных спектральных компонент и возможным некорректным выводам. Биохимические возможности препаративного выделения фикобилипротеинов совместно с мембранными пигментными комплексами оказались ограниченными их разной гидрофобностью [19, 20]. В этих условиях было важно найти неинвазивный спектральный подход к вопросу о связи фикобилипротеинов с фотосистемами, что и было осуществлено в нашей работе. Использовали три метода: 1) низкотемпературные спектры флуоресценции клеток; 2) фотоокисление реакционного центра Р700; 3) спектры действия двух фотосистем. Первый из них из-за отсутствия длинноволновой флуоресценции у *R. salina* не дал никакого ответа. Второй из-за перекрывания спектров поглощения ФЭ-545 и Хл а/с-протеина указал лишь на ограничения в миграции к ФС I. Лишь третий из подходов, ранее не применявшийся к исследованию пигментного аппарата у криптофит, – регистрация спектров действия фотосинтетической активности – предоставил однозначный результат, указывающий на отсутствие связи ФЭ-545 с ФС I.

Спектр действия ФС II у водоросли *R. salina* содержит высокоинтенсивный максимум ФЭ-545, подобный полосам фикобилисом в спектрах ФС II у цианобактерий и красных водорослей [28]. В спектре действия ФС I полоса ФЭ-545, однако, не обнаруживается (рис. 4, a), и поэтому сродство фикобилипротеиновой антенны к ФС II является избирательным. Если бы в тилакоидной мембране R. salina существовал контакт между пигмент-белковыми комплексами двух фотосистем, то часть энергии от ФЭ-545 достигала бы ФС I благодаря посредничеству ФС II. Такой контакт, приводящий к «спилловеру» энергии между фотосистемами, не исключен для хлоропластов высших растений [40]. Поскольку у криптофит подобное не наблюдается, взаимодействие ФС I и ФС II происходит на уровне электрон-транспортной цепи, но не на уровне миграции энергии. Подводя итог, можно заключить, что фикобилипротеины у криптофитовых водорослей, находясь, в отличие от фикобилисом, в мелкодисперсном состоянии $(\alpha_1\beta\alpha_2\beta)$ -димеров, контактируют лишь с ФС II.

Коэффициенты диффузии фикобилипротеинов в люмене хлоропластов у криптофит указывают, что их подвижность снижена в сравнении с той, которую можно было бы ожидать при отсутствии ограничений [41]. Габариты димеров, согласно рентгеноструктурным данным, составляют $4 \times 6 \times 7$ нм [41], что почти на два порядка меньше средних размеров фикобилисом у цианобактерий, но с внесением размерной поправки коэффициенты диффузии становятся сравнимыми [41]. По аналогии с фикобилисомами, заякоренными на наружной стороне ти-

лакоидной мембраны цианобактерий, это сравнение может указывать на связь ФЭ-545 с определенными сайтами на люменальной поверхности мембран. Ограничения диффузии димеров хорошо согласуются с полученными в нашей работе данными об избирательной связи ФЭ-545 с ФС II.

Значительная часть люменальной мембранной поверхности комплексов ФС II занята не содержащим хлорофилла водоокисляющим комплексом [36], что ограничивает у криптофит площадь пигментного контакта с димерами фикобилипротеинов. Поэтому такой контакт априорно возможен как напрямую, так и с участием Хл а/с-протеинов, находящихся в латеральном соприкосновении с димерами ФС II и увеличивающих общую поверхность контакта. Однако нефотохимическое тушение, реализуемое у криптофит с помощью Хл а/с-протеина без участия фикобилипротеинов, указывает на пространственную разобщенность двух антенных комплексов в тилакоидах [42]. Полученные данные оставляют проблему открытой для дальнейших исследований. Не менее интересным представляется противоположный по смыслу вопрос о механизмах или структурах, которые препятствуют присоединению, в данном случае ФЭ-545, к поверхности ФС І. Так как Хл а/спротеины находятся и в ее составе, это, скорее, добавляет сходства с ФС II, чем способствует выяснению проблемы. Можно высказать предположение, что препятствием служит положительный поверхностный заряд ФС I, необходимый для взаимодействия с пластохиноном как участником циклического транспорта электрона.

Избирательность фикобилипротеинов по отношению к ФС II указывает на их самосборку с созданием надмолекулярной архитектуры во внутреннем пространстве тилакоида. Самосборка фикобилисом обеспечивается так называемыми линкерными, или связующими, белками, но наличие линкеров для ($\alpha_1\beta\alpha_2\beta$)-димеров не выявлено ни при их выделении, ни при анализе генома. Они могут остаться неопознанными, не имея гомологии с линкерами фикобилисом и оставляя вопрос открытым. По своей форме ($\alpha_1\beta\alpha_2\beta$)-димеры несколько напоминают блюдечко. В перспективе существует возможность виртуальной укладки подобных «блюдечек» в цилиндрические структуры, упоминаемые в электронно-микроскопической литературе [14—16]. Поперечные размеры люмена позволяют разместить в нем архитектурные блоки-цилиндры, сложенные, вероятно, из четырех, максимум, пяти «блюдечек». Тогда с каждым димерным комплексом ФС II должны состыковаться изнутри люмена по два цилиндра, собранных из димеров ФЭ-545, что не противоречит нашим расчетным данным.

Вопросы о передаче энергии от антенных комплексов к комплексам ФС I и ФС II и доля каждой из фотосистем в тилакоидах тесно связаны. У высших растений соотношение двух фотосистем близко к 1 : 1. У цианобактерий содержание ФС I в 2-3 раза превышает содержание ФС II [28]. Поэтому установленное нами для *R. salina* соотношение $\Phi C I/\Phi C II$, равное 4 : 1, говорит об особенностях транспорта электронов в тилакоидах криптофитовых водорослей. Благодаря линейному транспорту между фотосистемами в итоге световой стадии фотосинтеза происходит образование АТФ и НАДФН. Циклический перенос электрона в ФС I достаточен лишь для синтеза АТФ [43]. Поэтому увеличенная доля ФС II у криптофит означает больший биосинтез НАДФН в сравнении с высшими растениями и цианобактериями. Надо отметить, что у всех иных жгутиконосцев-фотосинтетиков этот вопрос совершенно не изучен, хотя подобный тип движения, без сомнения, должен иметь свои закономерности в протекании энергетических процессов. Дальнейшие исследования помогут выяснению, с какими биохимическими особенностями в клетках криптофит связаны эти различия.

Финансирование. Работу Новиковой Т.М. и Минюк Г.С. выполняли в рамках темы Госзадания ФИЦ ИнБЮМ № 0828-2020-0004 (АААА-А18-118021350003-6).

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

 Краснова Е. Д., Пантюлин А. Н., Маторин Д. Н., Тодоренко Д. А., Белевич Т. А., Милютина И. А., Воронов Д. А. (2014) Цветение криптофитовой водоросли *Rhodomonas* sp. (Стурторнута, Ругепотоdaceae) в редокс-зоне водоемов, отделяющихся от Белого моря, *Микробиология*, **83**, 346-354, doi: 10.7868/ S0026365614030100.

 Митрофанова Е. Ю. (2015) *Chroomonas acuta* Uterm. (Стурtophyta) в Телецком озере (Алтай, Россия), *Turczaninowia*, **18**, 96-104, doi: 10.14258/turczaninowia.18.2.10.

- Hoef-Emden, K., and Archibald, J. M. (2017) Cryptophyta (Cryptomonads), in *Handbook of the Protists* (Archibald, J. M. et al., eds), Springer International Publishing AG 2017, 851-891, doi: 10.1007/978-3-319-28149-0_35.
- Janssen, J., and Rhiel, E. (2008) Evidence of monomeric photosystem I complexes and phosphorylation of chlorophyll *a/c*-binding polypeptides in *Chroomonas* sp. strain LT (Cryptophyceae), *Intern. Microbiol.*, **11**, 171-178, doi: 10.2436/20.1501.01.57.
- Kereïche, S., Kouřil, R., Oostergetel, G. T., Fusetti, F., Boekema, E. J., Doust, A. B., Van der Weij-de Wit, C. D., and Dekker, J. P. (2008) Association of chlorophyll *a/c₂* complexes to photosystem I and photosystem II in the cryptophyte *Rhodomonas* CS24, *Biochim. Biophys. Acta*, 1777, 122-1128, doi: 10.1016/j.bbabio.2008.04.045.
- Hoffman, G. E., Sanchez-Puerta, M. V. S., and Delwiche, C. F. (2011) Evolution of light-harvesting complex proteins from Chl *c*-containing algae, *BMC Evol. Biol.*, **11**, 101, doi: 10.1186/1471-2148-11-101.
- Neilson, J. A. D., and Durnford, D. G. (2010) Structural and functional diversification of the light-harvesting complexes in photosynthetic eukaryotes, *Photosynth. Res.*, 106, 57-71, doi: 10.1007/s11120-010-9576-2.
- Ingram, K., and Hiller, R. G. (1983) Isolation and characterization of a major chlorophyll *a/c*₂ light-harvesting protein from a *Chroomonas* species (Cryptophyceae), *Biochim. Biophys. Acta*, **722**, 310-319, doi: 10.1016/0005-2728(83)90078-6.
- Schimek, C., Stadnichuk, I. N., Knaust, R., and Wehrmeyer, W. (1994) Detection of chlorophyll c₁ and magnesium-2,4-divinylpheoporphyrin a₅ monomethylester in cryptophytes, *J. Phycol.*, **30**, 621-627, doi: 10.1111/j.0022-3646.1994.00621.x.
- Hill, D. R., and Rowan, K. S. (1989) The biliproteins of the cryptophyceae, *Phycologia*, 28, 455-463, doi: 10.2216/i0031-8884-28-4-455.1.
- Glazer, A. N., Wedemayer, G. J. (1995) Cryptomonad biliproteins: an evolutionary perspective, *Photosynth. Res.*, 46, 93-105, doi: 10.1007/BF00020420.
- Broughton, M. J., Howe, C. J., and Hiller, R. G. (2006) Distinctive organization of genes for light-harvesting proteins in the cryptophyte alga *Rhodomonas*, *Gene*, **369**, 72-79, doi: 10.1016/j.gene.2005.10.026.
- Kieselbach, T., Cheregi, O., Green, B. R., and Funk, C. (2018) Proteomic analysis of the phycobiliprotein antenna of the cryptophyte alga *Guillardia theta* cultured under different light intensities, *Photosynth. Res.*, **135**, 149-163, doi: 10.1007/s11120-017-0400-0.
- Ludwig, M., and Gibbs, S. P. (1989) Localization of phycoerythrin at the lumenal surface of the thylakoid membrane in *Rhodomonas lens*, *J. Cell Biol.*, **108**, 875-884, doi: 10.1083/jcb.108.3.875.
- Spear-Bernstein, L., and Miller, K. R. (1989) Unique location of the phycobiliprotein light-harvesting pigment in the cryptophyceae, *J. Phycol.*, 25, 412-419, doi: 10.1111/j.1529-8817.1989.tb00245.x.
- Mörschel, E., and Wehrmeyer, W. (1979) Elektronenmikroskopische feinstrukturanalyse von nativen biliproteidaggregaten und deren räumliche ordnung, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **92**, 393-402, doi: 10.1111/j.1438-8677.1979. tb03286.x.
- Vesk, M., Dwarte, D., Fowler, S., and Hiller, R. G. (1992) Freeze fracture immunocytochemistry of light-harvesting pigment complexes in a cryptophyte, *Protoplasma*, **170**, 66-176, doi: 10.1007/BF01378791.
- Haxo, F. T., and Fork, D. C. (1959) Photosynthetically active accessory pigments of cryptomonads, *Nature*, 184, 1051-1052: doi: 10.1038/1841051a0.
- 19. Lichtlé, C., Duval, J. D., and Lemoine, Y. (1987) Comparative biochemical, functional and ultrasructural

studies of photosystem particles from a Cryptophyceae *Cryptomonas rufescens*: isolation of an active phycoerythrin particle, *Biochim. Biophys. Acta*, **894**, 76-90, doi: 10.1016/0005-2728(87)90214-3.

- Chen, M., Li, S. H., and Sun, L. (2007) A novel phycocyanin–Chl *a/c₂*–protein complex isolated from chloroplasts of *Chroomonas placoidea*, *Chinese Chem. Lett.*, 18, 1374-1378, doi: 10.1016/j.cclet.2007.09.025.
- MacColl, R., and Berns, D. S. (1978) Energy transfer studies on cryptomonad biliproteins, *Photochem. Photobiol.*, 27, 343-349, doi: 10.1111/j.1751-1097.1978.tb07610.x.
- Mimuro, M., Tamai, N., Murakami, A., Watanabe, M., Erata, M., Watanabe, M. M., Tokutomi, M., and Yamazaki, T. (1998) Multiple pathways of excitation energy flow in the photosynthetic pigment system of a cryptophyte, *Cryptomonas* sp. (CR-1), *Phycol. Res.*, 46, 155-164, doi: 10.1111/j.1440-1835.1998.tb00108.x.
- Bruce, D., Biggins, J., Steiner, T., and Thewalt, M. (1986) Excitation energy transfer in the cryptophytes. Fluorescence excitation spectra and picosecond time-resolved emission spectra of intact algae at 77 K, *Photochem. Photobiol.*, 44, 519-525, doi: 10.1111/j.1751-1097.1986.tb04702.x.
- 24. Lichtlé, C., Jupin, C. H., and Duval, I. C. (1980) Energy transfer from PS II to PS I in *Cryptomonas rufescens* (Cryptophyceae), *Biochim. Biophys. Acta*, **591**, 104-112, doi: 10.1016/0005-2728(80)90224-8.
- Van der Weij-de Wit, C. D., Doust, A. B., Van Stokkum, I. H. M., Dekker, J. P., Wilk, K. E., Curmi, P. M. G., Scholes, G. D., and Van Grondelle, R. (2006) How energy funnels from the phycoerythrin antenna complex to photosystem I and photosystem II in cryptophyte *Rhodomonas* CS24 cells, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 25066-25073, doi: 10.1021/jp061546w.
- 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, doi: 10.1515/znc-1988-9-1010.
- Boichenko, V. A. (1998) Action spectra and functional antenna sizes of photosystems I and II in relation to the thylakoid membrane organization and pigment composition, *Photosynth. Res.*, 58, 163-174, doi: 10.1023/ A:1006187425058.
- 28. Rakhimberdieva, M., Boichenko, V., Karapetyan, N., and Stadnichuk, I. (2001) Interaction of phycobilisomes with photosystem II dimers and photosystem I monomers and trimers in the cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Biochemistry*, **40**, 15780-15788, doi: 10.1021/bi010009t.
- MacColl, R., Berns, D. S., and Gibbons, O. (1976) Characterization of cryptomonad phycoerythrin and phycocyanin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 265-275, doi: 10.1016/0003-9861(76)90436-7.
- Rögner, M., Mühlenhoff, U., Boekema, E. J., and Witt, H. (1990) Mono-, di- and trimeric PS I reaction center complexes isolated from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp.: size, shape and activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1015**, 415-424, doi: 10.1016/0005-2728(90)90074-E.
- Jeffrey, S. W., and Humphrey, G. F. (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **167**, 191-194, doi: 10.1016/S0015-3796(17)30778-3.
- Boichenko, V. A., Pinevich, A. V., and Stadnichuk, I. N. (2007) Association of chlorophyll *a/b*-binding Pcb proteins with photosystems I and II in *Prochlorothrix hollandica*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 801-806, doi: 10.1016/ j.bbabio.2006.11.001.
- 33. Doust, A. B., van Stokkum, I. H. M., Larsen, D. S., Wilk, K. E., Curmi, P. M. G., van Grondelle, R., and Scholes,

G. D. (2005) Mediation of ultrafast light-harvesting by a central dimer in phycoerythrin 545 studied by transient absorption and global analysis, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 14219-14226, doi: 10.1021/jp051173j.

- Van der Weij-De Wit, C. D., Doust, A. B., Van Stokkum, I. H. M., Dekker, J. P., Wilk, K. E., Curmi, P. M. G., and Van Grondelle, R. (2008) Phycocyanin sensitizes both photosystem I and photosystem II in cryptophyte *Chroomonas* CCMP270 cells, *Biophys. J.*, 94, 2423-2433, doi: 10.1529/biophysj.107.113993.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., and Krauß, N. (2001) Three dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature*, 411, 909-917, doi: 10.1038/35082000.
- Ferreira, K. N, Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Science*, **303**, 1831-1838, doi: 10.1126/science.1093087.
- Kühlbrandt, W., Wang, D. N., and Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography, *Nature*, **367**, 614-621, doi: 10.1038/367614a0.
- 38. Cunningham, B. R., Greenwold, M. J., Lachenmyer, E. M., Heidenreich, K. M., Davis, A. C., Dudycha, J. L., and

Richardson T. L. (2019) Light capture and pigment diversity in marine and freshwater cryptophytes, *J. Phycol.*, **55**, 552-564, doi: 10.1111/jpy.12816.

- Doust, A. B., Wilk, K. E., Curmi, P. M. G., and Scholes, G. D. (2006) The photophysics of cryptophyte light-harvesting, *J. Photochem. Photobiol. A*, 184, 1-17, doi: 10.1016/j.jphotochem.2006.06.006.
- Yokono, M., and Akimoto, S. (2018) Energy transfer and distribution in photosystem super/megacomplexes of plants, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 54, 50-56, doi: 10.1016/ j.copbio.2018.01.001.
- 41. Mirkovic, T., Wilk, K. E., Curmi, P. M. G., and Scholes, G. D. (2009) Phycobiliprotein diffusion in chloroplasts of cryptophyte *Rhodomonas* CS24, *Photosynth. Res.*, **100**, 7-17, doi: 10.1007/s11120-009-9412-8.
- 42. Kuthanová Trsková, E., Bína, D., Santabarbara, S., Sobotka, R., Kana, R., and Belgio, E. (2019) Isolation and characterization of CAC antenna proteins and photosystem I supercomplex from the cryptophytic alga *Rhodomonas salina*, *Physiol. Plant.*, **166**, 309-319, doi: 10.1111/ppl.12928.
- Dann, M., and Leister, D. (2019) Evidence that cyanobacterial SIII217 functions analogously to PGRL1 in enhancing PGR5-dependent cyclic electron flow, *Nat. Commun.*, 10, 5299, doi: 10.1038/s41467-019-13223-0.

PHYCOERYTHRIN CONNECTION WITH PHOTOSYSTEM II IN THE CRYPTOPHYTE ALGA *Rhodomonas salina**

I. N. Stadnichuk^{1**}, T. M. Novikova², G. S. Miniuk², V. A. Boichenko³, Yu. V. Bolychevtseva⁴, E. S. Gusev¹, and E. P. Lukashev⁵

¹ Timiryasev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, 127726 Moscow, Russia; E-mail: stadnichuk@mail.ru

² Kovalevski Institute of Biology of the Southern Seas of the Russian Academy of Sciences, 299011 Sevastopol, Russia

³ Institute of Fundamental Problems of Biology of the Russian Academy of Sciences, 142290 Puschino, Moscow Region, Russia

⁴ Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

⁵ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia

Received April 9, 2020 Revised May 2, 2020 Accepted May 3, 2020

Cryptophyte algae belong to a special group of oxygenic photosynthetic organisms containing pigment combination unique for plastids – phycobiliproteins and chlorophyll a/c-containing antenna. Despite the progress in investigation of morphological and ecological features, as well as genome-based systematics of cryptophytes, their photosynthetic apparatus remains poorly understood. The ratio of the photosystems (PS)s I and II is unknown and information on participation of the two antennal complexes in functions of the two photosystems is inconsistent. In the present work we demonstrated for the first time that the cryptophyte alga *Rhodomonas salina* had the PSI to PSII ratio in thylakoid membranes equal to 1 : 4, whereas this ratio in cyanobacteria and higher plants was known to be 3 : 1 and 1 : 1, respectively. Furthermore, it was established that contrary to the case of cyanobacteria the phycobiliprotein antenna represented by phycoerythrin-545 (PE-545) in *R. salina* was associated only with the PSII, which indicated specific spatial organization of these protein pigments within the thylakoids that did not facilitate interaction with the PSI.

Keywords: cryptophytes, phycobiliproteins, phycoerythrin, chlorophyll a, chlorophyll c, photosystem I, photosystem II

УДК 548.73

ВЫСОКОАКТИВНАЯ РЕКОМБИНАНТНАЯ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ Staphylococcus aureus: ПОЛУЧЕНИЕ И КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ*

© 2020 А.А. Пометун^{1,2,3#}, К.М. Бойко^{2#}, Т.С. Юрченко^{1,3}, А.Ю. Николаева^{2,4}, И.С. Каргов^{2,3}, Д.Л. Атрошенко^{1,2,3}, С.С. Савин^{1,2,3}, В.О. Попов^{2,4}, В.И. Тишков^{1,2,3**}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: vitishkov@gmail.com

² Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071 Москва, Россия

³ ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559 Москва, Россия

⁴ НИЦ «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.04.2020 После доработки 02.05.2020 Принята к публикации 02.05.2020

NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа бактерий *Staphylococcus aureus* (SauFDH) является одним из ключевых ферментов, отвечающих за выживание этого патогена в условиях биопленок. Высокоселективные ингибиторы SauFDH могут быть использованы в качестве антибактериального препарата именно против биопленок *S. aureus*. Наиболее перспективным путем является поиск таких ингибиторов на основе трехмерной структуры фермента. Проведено культивирование штамма *E. coli* – суперпродуцента рекомбинантной SauFDH с выходом 1 г целевого белка с литра среды. Разработана и оптимизирована процедура выделения и очистки, позволившая получить 400 мг гомогенного фермента с выходом 61%. Показано, что SauFDH имеет самую высокую удельную активность 20 ед. на мг белка, что в два раза выше по сравнению с таковой для всех описанных формиатдегидрогеназ. Проведено два цикла поиска и оптимизации условий кристаллизации. В результате для апо- и холо-форм SauFDH получены кристаллы размером 200 и 40 мкм соответственно. Проведен сбор наборов дифракционных данных, определены пространственные группы и параметры элементарных ячеек. Кристаллы апо- и холо-форм SauFDH, которые дифрагировали до разрешения 2,2 и 2,7 Å соответственно, принадлежали к разным пространственным группам, что может свидетельствовать о связывании кофактора в случае холо-формы фермента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: формиатдегидрогеназа, *Staphylococcus aureus*, экспрессия, очистка, кристаллизация, рентгеноструктурный анализ.

DOI: 10.31857/S0320972520060068

ВВЕДЕНИЕ

NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа (FDH) найдена в бактериях, дрожжах, микроскопических грибах и растениях. Основная физиологическая роль фермента в патогенных микроорганизмах и растениях заключается в снабжении клетки энергией в виде восстановленного кофермента NADH в условиях стресса. Активное развитие методов высокопродуктивного секвенирования привело к тому, что в базах данных появились последовательности геномов большого количества патогенов. Гены формиатдегидрогеназы были аннотированы практически во всех геномах патогенных бактерий и дрожжей [1-3], включая и Staphylococcus aureus (SauFDH). S. aureus является одним из наиболее опасных патогенов человека и может вызывать широкий диапазон заболеваний, включая пневмонию, инфекционно-токсический шок, сепсис и др. Данный патоген также является одной из наиболее частых причин госпитальных инфекций. Стафилококки представляют особую опасность при росте в виде биопленок, поскольку в этом состоянии у них резко возрастает резистентность к традиционным антибактериаль-

Принятые сокращения: SauFDH, PseFDH – формиатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas* sp. 101 соответственно.

^{*} Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio. msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-094, 29.05.2020.

^{**} Адресат для корреспонденции.

[#] Авторы внесли равный вклад в работу.

ным агентам. Результаты транскриптомного анализа [4] показали, что в биопленках S. aureus по сравнению с ростом патогена в виде планктона уровень экспрессии SauFDH возрастает в 20 раз и более, а общее количество ее мРНК находится на третьем месте среди мРНК остальных белков и ферментов [4]. Таким образом, SauFDH является ключевым ферментом для выживания S. aureus в виде биопленок. В связи с этим данный фермент представляется перспективной мишенью для борьбы именно с биопленками стафилококков. Однако для целенаправленного поиска высокоспецифичных ингибиторов SauFDH необходимо установить пространственную структуру фермента (т.н. structurebased drug design).

SauFDH представляет большой интерес и с точки зрения фундаментальной энзимологии. NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа, состоящая из двух идентичных полипептидных цепей и не содержащая в своем составе других дополнительных групп, является высококонсервативным ферментом. Внутри одного семейства (бактерии, дрожжи, растения) уровень гомологии между аминокислотными последовательностями таких формиатдегидрогеназ составляет более 80%, в то время как гомология SauFDH с другими бактериальными формиатдегирогеназами (включая и другие патогеные бактерии) составляет всего 40% [2, 3]. Поэтому исследование такого фермента представляет несомненный наvчный интерес.

В нашей лаборатории ген *saufdh* был клонирован в плазмиду pET23a, и было показано, что в клетках *E. coli* рекомбинантная SauFDH экспрессируется в активной форме [5]. В данной работе была разработана и оптимизирована методика выделения фермента, что позволило получить достаточное количество для поиска и оптимизации условий кристаллизации, и получения предварительных данных о структуре SauFDH как в свободной форме, так и в комплексе с коферментом (апо- и холо- формы соответственно).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспрессия SauFDH в клетках *E. coli*. Для получения штамма-продуцента проводили трансформацию клеток *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS плазмидой pSauFDH, полученной клонированием гена *saufdh* в плазмиду pET23a. Единичную колонию с чашки Петри помещали в пробирку с 4 мл среды 2YT (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта («Difco», США), NaCl 5 г/л, pH 7,0), содержащую антибиотики хлорамфеникол (25 мкг/мл) и ампициллин (150 мкг/мл), и культивировали на качалке при 37 °С и 180 об/мин в течение 12 ч. Ночную культуру пересевали в колбу с отбойниками (общий объем 500 мл, объем среды 60 мл), разбавляли в 1000 раз (60 мкл посевного материала, 60 мл среды 2ҮТ, с хлорамфениколом (25 мкг/мл) и ампициллином 150 мкг/мл) и культивировали на качалке при температуре 37 °C, 120 об/мин. При достижении величины поглощения среды, на 600 нм (А₆₀₀) значения 0,6-0,8, содержимое колбы делили на три равные части по 20 мл и переносили в три однолитровые колбы с отбойниками, содержащими 180 мл среды 2ҮТ без добавления антибиотиков, и культивировали при 30 °С и 120 об/мин. Далее при величине поглощения А₆₀₀ 0,6-0,8 проводили индукцию, добавляя в среду для культивирования раствор лактозы (300 г/л) до конечной концентрации индуктора (20 г/л), снижали температуру до 20 °С и продолжали культивирование до утра (20 °C, 120 об/мин). Утром клетки осаждали на центрифуге фирмы Beckman J-21 («Beckman», США) в течение 20 мин при 5000 об/мин, 4 °С (стаканы 250 мл, ротор J14).

Выделение и очистка SauFDH. Полученную биомассу ресуспендировали в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 8,0 (концентрация клеток 10 вес %) и замораживали при -20 °С. После разморозки клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Branson Ultrasonic 250 («Branson», США). Полученную суспензию без центрифугирования подвергали термообработке в течение 20 мин при 55 °C. Далее раствор оставляли при комнатной температуре на 30 мин и осаждали дебрис центрифугированием клеточный (30 мин, 18 000 об/мин, 4 °С, ротор J-20). Супернатант отделяли от осадка, к нему при постоянном перемешивании добавляли твердый сульфат аммония до концентрации 35% от насыщения и оставляли при 4 °С на 4-4,5 ч. Для удаления образовавшегося осадка проводили центрифугирование (30 мин, 18 000 об/мин, 4 °C, ротор J-20), отделяли супернатант, измеряли объем и затем к нему аккуратно при перемешивании добавляли твердый сульфат аммония до концентрации 85% от насыщения. Полученный раствор оставляли на ночь при 4 °С и центрифугировали в течение 30 мин (18 000 об/мин, 4 °С, ротор J-20). Супернатант удаляли, к осадку добавляли раствор сульфата аммония (35% от насыщения) в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0 (раствор А), аккуратно перемешивали и оставляли при 4 °C на 1,5-2 ч. Нерастворившиеся белки удаляли центрифугированием (30 мин, 16 000 об/мин, 4 °С, ротор J-20), а раствор фермента наносили на колонку 2,5 × 12 см с высо-

козамещенной фенил-сефарозой Phenyl Sepharose Fast Flow («Pharmacia Biotech», Австрия), уравновешенной раствором А. После нанесения фермента колонку промывали раствором А до исчезновения поглощения на 280 нм. Фермент элюировали с колонки нисходящим линейным градиентом сульфата аммония (35-0% от насыщения) в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,0, общий объем градиента 500 мл. Во время проведения хроматографии собирали фракции по 5 мл и измеряли поглощение на 280 нм (А280) и ферментативную активность (А). Отбирали фракции с постоянным отношением (активность/А₂₈₀). Обессоливание и перевод фермента в требуемый буфер проводили с помощью гельфильтрации через Sephadex G25 («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция).

Растворимость SauFDH в растворах сульфата аммония. Для определения зависимости растворимости SauFDH от концентрации $(NH_4)_2SO_4$ к 100 мкл раствора бесклеточного экстракта (20 ед/мл) добавляли 0,6–1,8 мл насыщенного раствора сульфата аммония в 0,1 M Na- фосфатном буфере, pH 7,0, и буфер до общего объема 2 мл. Пробы оставляли на 5 ч при комнатной температуре, центрифугировали в течение 15 мин при 14 000 об/мин и 4 °C на центрифуге Ерреndorf 5415D («Ерреndorf», Германия). Затем отбирали пробы по 25 мкл и измеряли остаточную активность фермента в растворе.

Связывание SauFDH на гидрофобном носителе. Для определения оптимальной концентрации сульфата аммония для нанесения на колонку с Phenyl Sepharose Fast Flow использовали раствор фермента (раствор Б), полученный после перерастворения в растворе А (сульфат аммония 35% от насыщения в 0,1 М Na-фосфатном буфере, рН 7,0) осадка, образовавшегося после стадии осаждения в 85% от насыщения сульфате аммония. Растворы SauFDH с заданной концентрацией сульфата аммония (5-35% от насыщения) готовили добавлением к 200 мкл раствора Б необходимых объемов растворов сульфата аммония (35% от насыщения) и фосфатного буфера до общего объема 1,6 мл. К полученным пробам добавляли по 400 мкл 50%-ной суспензии Phenyl Sepharose Fast Flow в растворе сульфата аммония требуемой концентрации. Пробирки с пробами перемешивали и оставляли на столе на 15 мин для осаждения носителя. Затем отбирали пробы по 25 мкл и измеряли остаточную активность фермента в растворе.

Измерение активности. Активность SauFDH определяли спектрофотометрически по накоплению NADH на длине волны 340 нм ($\varepsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{сm}^{-1}$) на спектрофотометре «Schimadzu UV 1800» при 30 °C в 0,1 М натрий-фосфатном

буфере, pH 7,0. Концентрация формиата натрия и NAD⁺ в кювете составляла 0,6 М и 1,5 мг/мл соответственно.

Анализ чистоты препаратов SauFDH. Чистоту препаратов SauFDH на разных стадиях очистки определяли с помощью аналитического электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии 0,1%-ного додецилсульфата натрия на приборе Mini Protean II фирмы «Bio-Rad» (США) по протоколам фирмы производителя.

Определение концентрации SauFDH. При подготовке экспериментов по кристаллизации концентрацию исходного раствора очищенной ФДГ определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм на спектрофотометре «Schimadzu UV 1800» (Германия), используя коэффициент молярного поглощения, для димерной SauFDH $\varepsilon_{280} = 57180 \text{ M}^{-1}\text{сm}^{-1}$, рассчитанный по формуле, предложенной в работе [6]: $\varepsilon_{280} = 5690 \cdot N_{Trp} + 1280 \cdot N_{Tyr}$, где N_{Trp} и N_{Tyr} – количество остатков Trp и Tyr в молекуле фермента (для SauFDH шесть и девять остатков соответственно).

Для пересчета концентрации SauFDH в мг/мл молярную концентрацию фермента делили на мол. массу (М_г) димера 75 973,28 Da.

На разных стадиях очистки для определения общей концентрации белков использовали метод Бредфорда по протоколу фирмы «Bio-Rad». Однако вместо бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта использовали рекомбинантную FDH из бактерий *Pseudomonas* sp. 101. Разница между определением концентрации очищенной SauFDH с помощью спектрофотометрии и методом Бредфорда составляла менее 10%.

Анализ препаратов SauFDH с помощью МАLDI-масс-спектрометрии. При проведении данных исследований использовали оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Для подготовки образца на анализ проводили триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле. Из геля, окрашенного с помощью Соотassie Brilliant Blue (рис. 1), вырезали кусочек размером 3–4 мм³ с полосой фермента, который для удаления красителя дважды промывали в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0,1М NH₄HCO₃ в течение 20 мин при 37 °С. После удаления раствора для дегидратации к гелю добавляли 100 мкл ацетонитрила. Для удаления ацетонитрила кусочек геля высушивали и затем к нему прибавляли 3,5 мкл раствора (15 мкг/мл) модифицированного трипсина («Promega») в 0,05М NH₄HCO₃. Гидролиз проводили в течение 20 ч при 37 °С, затем к раствору добавляли 5,25 мкл 0,5%-ной трифторуксусной кислоты (ТФУ) в 50%-ном растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали в качестве исходного раствора для получения MALDI-массспектров.

Для масс-спектрометрического анализа на мишени смешивали по 1,5 мкл раствора образца и 0,5 мкл раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (10 мг/мл, «Aldrich», США) в 20%-ном водном ацетонитриле, 0,5%-ной ТФУ («Merk», Германия). Полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре Ultraflextreme BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,002– 0,011% (20–110 ррм). Спектры получали в диапазоне масс 500–6500 m/z, выбирая мощность лазера, оптимальную для достижения наилучшего разрешения.

Идентификацию белков осуществляли с помощью программы Mascot (www.matrixscience. com). Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 («Bruker Daltonics», Германия). Используя программу Mascot (опция «пептидный фингерпринт»), провели поиск в локальной базе данных с указанной выше точностью, с учетом возможных модификаций: Acetyl (Protein *N*-term), Gln—pyro-Glu (*N*-term Q), Oxidation (M), Propionamide (C). Кандидатные белки, имеющие параметры достоверности score >42 в базе данных NCBI, считали определенными надежно (p < 0.05).

Кристаллизация. Первичный подбор условий кристаллизации SauFDH осуществляли методом диффузии в парах (вариант «сидячая капля») с помощью роботизированной системы кристаллизации фирмы «Rigaku» (США) [7] с использованием белкового препарата с концентрацией 10 мг/мл в буфере состава: 0,1 М Tris-HCl, pH 8,0, и стандартных наборов для кристаллизации глобулярных белков компании «Hampton Research» (США): Crystal Screen HT, Crystal Screen Cryo HT, Index HT, PEG/Ion HT, PEGRx HT и SaltRx HT. Для кристаллизации использовали кристаллизационные планшеты на 96 лунок («ArtRobbins»).

Для получения холо-формы фермента к раствору белка перед кристаллизацией добавляли NAD⁺ и конкурентный по формиату ингибитор SauFDH азид натрия до финальной концентрации 7,0 и 0,11 мМ соответственно. Оптимизацию найденных условий проводили при температуре 15 °С методом диффузии в парах (вариант «висячая капля») в 24-х луночных планшетах фирмы «VDX» (США). В каждую лунку планшета добавляли по 400 мкл осаждающего раствора. 1,5 мкл раствора белка и эквивалентное количество противораствора, смешивали и наносили на силиконизированное стекло диаметром 22 мм фирмы «Hampton Research» (США).

Сбор и обработка дифракционных данных. Перед сбором дифракционных данных кристаллы вылавливали петлёй и переносили в криораствор, содержащий, кроме компонентов, входящих в противораствор, 25%-ный глицерин, после чего кристалл в петле замораживали в парах азота. Дифракционные наборы собирали при температуре 100 К на синхротронных источниках Spring8 (станция BL41XU) и European synchrotron radiation facilities (станция ID29 [8]). Для расчета стратегии сбора данных использовали программы HKL2000 [9] и BEST [10]. Наборы были обработаны с помощью программ Mosflm [11] и XDS [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантной SauFDH. Получение кристаллов целевого фермента является критической стадией экспериментов по определению структуры белка с помощью метода рентгеноструктурного анализа. В свою очередь, успех кристаллизации зависит от чистоты и качества препарата фермента. Для получения высокоочищенных препаратов целевого белка часто используют аффинную металл-хелатную хроматографию путем введения последовательности из 6-12 остатков гистидина (His-tag) на N- или С-конец фермента. Однако наличие такой последовательности часто приводит к изменению свойств фермента. В случае формиатдегидрогеназ это было показано на примере ферментов из Ogataea parapolymorpha DL-1 [5, 13], Candida methylica [14], Chaetomium thermophilum [15] и Pseudomonas sp. 101 (PseFDH) [16]. Изменения в каталитических свойствах и стабильности, повидимому, связаны с влиянием His-tag на структуру фермента. Поскольку в дальнейшем структуру SauFDH планируется использовать для поиска селективных ингибиторов нативного фермента, то было решено для кристаллизации получить фермент без аффинных меток.

Культивирование штамма-продуцента рекомбинантной SauFDH. В нашей лаборатории отработана технология получения рекомбинантных

формиатдегидрогеназ как из прокариот, так и эукариот с использованием системы экспрессии на основе плазмид серии pET и штамма E. coli BL21(DE3) [2, 5]. В этой системе уровень экспрессии формиатдегидрогеназ составляет до 40% от общего растворимого белка клетки. Такое высокое содержание целевого фермента позволяет получить практически гомогенный препарат с минимальным количеством стадий очистки без введения в последовательность белка дополнительной аффинной метки. Эта система и была использована для получения SauFDH дикого типа. Как и в случае других формиатдегидрогеназ, при культивировании штамма-продуцента для SauFDH также происходит суперэкспрессия целевого белка. На рис. 1, дорожка 1 представлены данные аналитического электрофореза бесклеточного экс-тракта клеток E. coli после экспрессии в них SauFDH. Из рисунка хорошо видно, что содержание фермента составляет не менее 35-40% от растворимых белков клетки. Выход SauFDH на стадии культивирования составил ~600 мг фермента из 600 мл культуральной среды, т.е. 1 г с литра среды, что является очень высоким показателем при культивировании клеток в качалочных колбах.

Очистка рекомбинантной SauFDH. Для получения высокоочищенных препаратов формиатдегидрогеназ, экспрессированных в клетках E. coli, используется унифицированная методика, основанная на фракционировании бесклеточного экстракта сульфатом аммония с последующей гидрофобной хроматографией на Phenyl Sepharose Fast Flow [17]. Для формиатдегирогеназ с высокой термостабильностью перед фракционированием $(NH_4)_2SO_4$ проводится термообработка бесклеточного экстракта при 55 °С в течение 15-25 мин [2]. Данные дифференциальной сканирующей калориметрии показали, что SauFDH по термостабильности очень близка к таковой для PseFDH [18], которая до сих пор остается чемпионом по этому параметру среди всех описанных формиатдегидрогеназ. Поэтому в процедуру очистки SauFDH также была введена стадия термообработки бесклеточного экстракта в течение 20 мин при 55 °С. Такая обработка приводит к денатурации части белков E. coli, обеспечивает формирование крупнодисперсного осадка и упрощает последующее фракционирование сульфатом аммония

Фракционирование сульфатом аммония потребовало проведения отдельных экспериментов для нахождения оптимальных концентраций $(NH_4)_2SO_4$ как для переосаждения фермента, так и для его связывания на колонке с гидрофобным носителем. На рис. 2, *а* представ-



Рис. 1. Аналитический электрофорез в ПААГ в присутствии SDS-Na препаратов SauFDH после различных стадий очистки. 1 - суспензия клеток после ультразвуковой дезинтеграции, 2 - препарат после термообработки и фракционирования сульфатом аммония; 3-7 - различные фракции на стадии гидрофобной хроматографии, 8 - препарат SauFDH после обессоливания, M - маркер мол. массы, кДа. (С цветными вариантами рис. 1, 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: sciencejournals.ru/journal/biokhsm)

лена зависимость растворимости SauFDH в растворах сульфата аммония различной концентрации. На основании полученной зависимости для удаления части примесных белков и последующего осаждения фермента были выбраны концентрации $(NH_4)_2SO_4$ 35 и 85% от насыщения соответственно. На рис. 1 представлены результаты анализа препаратов SauFDH на разных стадиях очистки с помощью аналитического электрофореза в денатурирующих условиях. Данные дорожки 2 показывают, что в результате термообработки и фракционирования сульфатом аммония чистота фермента повышается до величины не менее 80%.

Финальная очистка SauFDH от примесных белков была выполнена с помощью гидрофобной хроматографии на Phenyl Sepharose Fast Flow. Было необходимо определить оптимальные концентрации сульфата аммония как для связывания фермента на носителе, так и для промывки колонки от примесных белков перед десорбцией SauFDH в нисходящем градиенте соли. На рис. 2, б представлена зависимость эффективности сорбции SauFDH на Phenyl Sepharose Fast Flow от концентрации сульфата аммония. Из рисунка видно, что полное связывание SauFDH на носителе происходит только при концентрации (NH₄)₂SO₄ 35% от насыщения. Данные рис. 2, а и б свидетельствуют, что при очистке SauFDH необходимо использовать концентрацию сульфата аммония 35% от насыщения. Эти результаты отличаются от данных по другим формиатдегидрогеназам. Например,



Рис. 2. Влияние концентрации сульфата аммония на растворимость SauFDH (*a*) и связывание фермента на Phenyl Sepharose Fast Flow (δ); 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,0, 25 °C

в случае PseFDH на стадии фракционирования используются концентрации сульфата аммония 40 и 80% от насыщения, а при нанесении фермента на колонку с гидрофобным носителем и последующей промывки носителя оптимальной будет концентрация $(NH_4)_2SO_4$ 30% от насыщения [17]. Такая разница в поведении ферментов в присутствии сульфата аммония, по-видимому, связана с существенным различием аминокислотных последовательностей этих формиатдегидрогеназ (гомология менее 40% [5]).

На рисунке 3 представлены результаты очистки SauFDH с помощью гидрофобной хроматографии. Для экспресс-анализа чистоты препаратов фермента в отдельных фракциях использовали величину отношения активность/поглощение на 280 нм. Как следует из рис. 3, для фракций 7—13 эта величина практически постоянная, что свидетельствует об одинаковой чистоте препаратов SauFDH в этих фракциях. Результаты анализа препаратов фермента в различных фракциях (рис. 1, дорожки 3-7) с помощью аналитического электрофореза в денатурирующих условиях свидетельствуют, что после стадии гидрофобной хроматографии получается практически гомогенная SauFDH. Всего было получено 400 мг высокоочищенного фермента с выходом по активности 61%.

Расчет величины удельной активности для полученной SauFDH дал неожиданный результат. Она оказалась равной 20 ед/мг белка. Для всех ранее описанных формиатдегидрогеназ наибольшей активностью обладали ферменты из бактерий – 10 ед/мг белка. Максимальная удельная активность для известных ФДГ из дрожжей и растений составляет 6,5 ед/мг белка [2, 3, 5, 19, 20]. Инженерия каталитических свойств формиатдегидрогеназ методом рационального дизайна в случае бактерий позволила улучшить значения К_М по формиату и коферменту NAD⁺, но не каталитическую константу [20, 21]. В случае ФДГ из дрожжей Candida boidinii методом направленной эволюции, а для ФДГ из сои методом рационального дизайна, удельная активность ферментов была повышена в 1,7 раза [22, 23]. Таким образом, по своей активности SauFDH минимум в два раза превосходит все другие известные ФДГ. Формиатдегидрогеназы активно используются для регене-



Рис. 3. Очистка формиатдегидрогеназы *S. aureus* гидрофобной хроматографией на Phenyl Sepharose Fast Flow в нисходящем градиенте концентрации сульфата аммония (35–0% от насыщения). 1 – Активность SauFDH в отдельной фракции, ед/мл; 2 – поглощение фермента на 280 нм A_{280} ; 3 – относительная активность ед/ A_{280} . Стрелками указаны оси, соответствующие данной кривой. 0,1 M Na-фосфатный буфер, pH 7,0



Рис. 4. Кристаллы апо- (a) и холо-форм (б) SauFDH, выросшие в оптимизированных условиях

рации NAD(P)H в процессах хирального синтеза с помощью оксидоредуктаз [2, 5]. Поэтому SauFDH является очень перспективным кандидатом для применения на практике. Кроме того, определение структуры этого фермента позволит исследовать причины такой высокой каталитической активности.

Анализ препарата SauFDH с помощью тандемной MALDI масс-спектрометрии показал идентичность аминокислотной последовательности белка, кодируемой геном *saufdh2* в плазмиде pET23a, т.е при экспрессии и очистке фермент не претерпевает посттрансляционной модификации.

Получение гомогенных препаратов SauFDH в препаративных количествах позволило перейти к экспериментам по кристаллизации. SauFDH является высокостабильным ферментом [18]. Он не терял активности при хранении при 4 °C в течение 12 месяцев. Поэтому одной партии полученного препарата SauFDH было достаточно для проведения всего цикла экспериментов по кристаллизации.

Кристаллизация. Скрининг условий кристаллизации свободной формы SauFDH и комплекса с кофактором проводился в кристаллизационных планшетах на 96 лунок (ArtRobbins), при этом каждая лунка содержала три подлунки, которые использовались для варьирования концентрации белка в рамках одного условия кристаллизации. Таким образом, один кристаллизационный планшет позволял провести скрининг $96 \times 3 = 288$ кристаллизационных условий. Всего было подготовлено 6 таких планшетов при двух значениях температуры 15 и 4 °С (итого 1728 вариантов). Соотношения белка и противораствора в каждой лунке были следующими: 1:1, 2:1 и 1:2, при этом суммарный объем белка в лунке был 0,1 мкл для соотношений 1:1 и 2:1 или 0,2 мкл для соотношения 1:2 соответственно. Объем противораствора составлял 50 мкл.

Первые кристаллы для апо-формы белка были получены в следующих условиях: 0,1М НЕРЕЅ, pH 7,5, 2% -ный PEG 400, 2 М сульфат аммония. Кристаллы росли при температуре 15 °С в течение 7 дней, имели ромбическую форму и достигали размеров порядка 30 мкм по наибольшей из граней. К сожалению, полученные на данном этапе кристаллы имели слишком малые размеры. Поэтому найденные условия кристаллизации нуждались в дальнейшей оптимизации.

Для получения кристаллов холо-формы фермента к раствору белка перед кристаллизацией добавляли NAD⁺ и азид натрия. Раствор затем центрифугировали для удаления примесей и возможных агрегатов, и проводился первичный скрининг по методике, описанной выше. В результате первичного скрининга для холо-формы SauFDH были найдены следующие условия. Вариант 1 – 0,2 M CaCl₂, 0,1 M ацетат натрия pH 4,6, 30%-ный 2-метипентадиол-2,4 и вариант 2 – 0,1 M HEPES-Na, pH 7,5, 1,4 M трехзамещенный цитрат натрия. В обоих условиях были обнаружены микрокристаллические осадки,

ПОМЕТУН и др.

Параметр	Апо-форма	Холо-форма*	
Пространственная группа	P4 ₃ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
a, b, c, Å	116,91; 116,91; 186,77	69,73; 87,09; 117,57	
$\alpha = \beta = \gamma$, град	90,0	90,0	
Т, К	100	100	
λ, Å	1,0	0,96770	
Разрешение, Å	99,1-2,2 (2,26-2,20)*	87,1-2,7 (2,87-2,72)	
Число независимых рефлексов	66 243 (14959)	19 763 (2838)	
Повторяемость	9,6 (7,5)	4,3 (4,1)	
Полнота набора, %	99,9 (99,9)	99,5 (99,7)	
Ι/σ (Ι)	20,15 (3,3)	6,5 (2,5)	
R _{meas} , %	8,9 (59,5)	24,7 (80,7)	
CC _{1/2}	99,9 (88,1)	96,8 (45,2)	

Кристаллографические данные и параметры съемки кристаллов апо- и холо-форм NAD⁺-зависимой формиатдегидрогеназы из *S. maureus*

* Кристаллизация в присутствии 7,0 мМ NAD⁺ и 0,11 мМ азида натрия.

** Данные в скобках приведены для последнего слоя.

которые ввиду малого размера (~10 мкм) и плохой морфологии нельзя было использовать для рентгеноструктурного исследования.

Поскольку для обеих форм фермента были получены кристаллы, непригодные для РСА, то был проведен дополнительный этап оптимизация найденных условий, заключавшийся в варьировании параметров кристаллизации в узких пределах относительно таковых, найденных на первом этапе. Кристаллы апо-формы, пригодные для рентгеноструктурного эксперимента, были получены в следующих условиях – 0,1 М HEPES, pH 7,0, 2%-ный PEG 400, 0,1 М хлорид натрия и 1,9 М сульфат аммония (рис. 4, *a*). Для холо-формы SauFDH кристаллы были получены в течение 30 дней при 15 °C (0,1М HEPES, pH 7,5, 1,4 М трехосновный цитрат натрия и 10% трегалоза) (рис. 4, б). Из рис. 4, а и б видно, что визуально качество кристаллов для апоформы выше, чем для холо-SauFDH. Для удобства на рис. 4 кристаллы для апо- и холо-форм представлены в сравнимом виде, однако их реальные размеры составляют 200 и 40 мкм соответственно. Тем не менее, качество кристаллов было достаточно для их исследования с помощью рентгеноструктурного анализа.

Сбор и обработка дифракционных данных. Дифракционные наборы собирали при температуре 100 К на синхротронных источниках Spring8 (станция BL41XU) и European synchrotron radiation facilities (станция ID29). Статистика наборов данных приведена в таблице.

Полученные кристаллы апо- и холо-форм SauFDH дифрагировали до разрешения 2,2 и 2,7 Å соответственно, и принадлежали к разным пространственным группам (таблица), что может свидетельствовать о связывании кофактора в случае холо-формы. Оценка содержания растворителя в элементарной ячейке по методу Мэттьюса [24], проведенная с помощью пакета ССР4і [25], показала, что в независимой части как апо-, так и холо-формы находятся по две субъединицы белка, что типично для данного класса ферментов, функционирующих в виде стабильных гомодимеров.

Таким образом, в результате выполненных экспериментов получена новая рекомбинантная формиатдегидрогеназы из патогена *S. aureus*, которая имеет самую высокую удельную активность среди всех ранее описанные в литературе аналогичных ферментов. Также получены кристаллы и собраны дифракционные данные, необходимые для определения структур апо- и холоформ SauFDH, которые будут использованы в последующих исследованиях по поиску высокоэффективных ингибиторов фермента.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (соглашения 17-04-01662 и 20-04-00915 – получение и кристаллизации фермента), Федерального космического агентства (эксперимент «Кристаллизатор» – кристаллизация и сбор данных рентгеноструктурного эксперимента) и Министерства науки и высшего образования РФ (предварительный анализ данных РСА).

Благодарности. При проведении исследований было использовано оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные

814

биотехнологии» ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН».

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tishkov, V. I., and Popov, V. O. (2004) Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase, *Biochemistry* (*Moscow*), 69, 1252-1267, doi: 10.1007/s10541-005-0071-x.
- Tishkov, V. I., and Popov, V. O. (2006) Protein engineering of formate dehydrogenase, *Biomol. Eng.*, 23, 89-110, doi: 10.1016/j.bioeng.2006.02.003.
- 3. Alekseeva, A. A., Savin, S. S., and Tishkov, V. I. (2011) NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from plants, *Acta Naturae*, **3**, 38-54, PMID: 22649703.
- 4. Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., and Gotz, F. (2005) Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2663-2676.
- Tishkov, V. I., Pometun, A. A., Stepashkina, A. V., Fedorchuk, V. V., Zarubina, S. A., Kargov, I. S., Atroshenko, D. L., Parshin, P. D., Kovalevski, R. P., Boiko, K. M., Eldarov, M. A., D'Oronzo, E., Facheris, S., Secundo, F., and Savin, S. S. (2018) Rational design of practically important enzymes, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, 73, 1-6, doi: 10.3103/S0027131418020153.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci.*, 4, 2411-2423, doi: 10.1002/pro.5560041120.
- Boyko, K. M., Lipkin, A. V., Popov, V. O., and Kovalchuk, M. V. (2013) From gene to structure: the protein factory of the NBICS centre of Kurchatov institute, *Crystallogr. Rep.*, 58, 442-449, doi: 10.1134/S106377451105004x.
- De Sanctis, D., Beteva, A., Caserotto, H., Dobias, F., Gabadinho, J., Giraud, T., Gobbo, A., Guijarro, M., Lentini, M., Lavault, B., Mairs, T., McSweeney, S., Petitdemange, S., Rey-Bakaikoa, V., Surr, J., Theveneau, P., Leonard, G. A., and Mueller-Dieckmann, C. (2012) ID29: a high-intensity highly automated ESRF beamline for macromolecular crystallography experiments exploiting anomalous scattering, J. Synchrotron Radiat., 19, 455-461, doi: 10.1107/S0909049512009715.
- 9. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.*, **276**, 307-326.
- Bourenkov, G. P., and Popov, A. N. (2006) A quantitative approach to data-collection strategies, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 62, 58-64, doi: 10.1107/S0907444905033998.
- Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R., and Leslie, A. G. W. (2011) iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 67, 271-281, doi: 10.1107/S0907444910048675.
- 12. Kabsch, W. (2010) XDS, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 66, 125-132, doi: 10.1107/S0907444909047337.
- Yu, S., Zhu, L., Zhou, C., An, T., Zhang, T., Jiang, B., and Mu, W. (2014) Promising properties of a formate dehydrogenase from a methanol-assimilating yeast *Ogataea parapolymorpha* DL-1 in His-tagged form, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 1621-1630, doi: 10.1007/s00253-013-4996-5.
- Ordu, E. B., and Karagüler, N. G. (2007) Improving the purification of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from *Candida methylica*, *Prepar. Biochem. Biotechnol.*, 37, 333-341, doi: 10.1080/10826060701593233.

- Esen, H., Alpdağtaş, S., Mervan Çakar, M., and Binay, B. (2019) Tailoring of recombinant FDH: effect of histidine tag location on solubility and catalytic properties of *Chaetomium thermophilum* formate dehydrogenase (CtFDH), *Prepar. Biochem. Biotechnol.*, **49**, 529-534, doi: 10.1080/10826068.2019.1599394.
- Пометун А. А., Паршин П. Д., Галаничева Н. П., Упоров И. В., Атрошенко Д. Л., Савин С. С., Тишков В. И. (2020) Влияние последовательности His₆ на свойства формиатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101, *Вестник МГУ, Сер. 2 Химия*, **61**, 317-325.
- Rojkova, A. M., Galkin, A. G., Kulakova, L. B., Serov, A. E., Savitsky, P. A., Fedorchuk, V. V., and Tishkov, V. I. (1999) Bacterial formate dehydrogenase. Increasing the enzyme thermal stability by hydrophobization of alpha helices, *FEBS Lett.*, 445, 183-188, doi: 10.1016/S0014-5793(99)00127-1.
- Pometun, A. A., Kleymenov, S. Yu, Zarubina, S. A., Kargov, I. S., Parshin, P. D., Sadykhov, E. G., Savin, S. S., and Tishkov, V. I. (2018) Comparison of thermal stability of new formate dehydrogenases with differential scanning calorimetry, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **73**, 80-84, doi: 10.3103/S002713141802013X.
- Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M. R., and Pohl, M. (2000) Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues, *Eur. J. Biochem.*, 267, 1280-1289, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01123.x.
- Tishkov, V. I., Goncharenko, K. V., Alekseeva, A. A., Kleymenov, S. Yu., and Savin, S. S. (2015) Role of a structurally equivalent phenylalanine residue in catalysis and thermal stability of formate dehydrogenases from different sources, *Biochemistry* (*Moscow*), **80**, 1690-1700, doi: 10.1134/S0006297915130052.
- Alekseeva, A. A., Fedorchuk, V. V., Zarubina, S. A., Sadykhov, E. G., Matorin, A. D., Savin, S. S., and Tishkov, V. I. (2015) Role of Ala198 in stability and coenzyme specificity of bacterial formate dehydrogenases, *Acta Naturae*, 7, 60-69, PMID: 25927002.
- Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M.-R., and Pohl, M. (2003) Novel mutants of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*, US Patent Application Publication US2003/0157664, 21.09.2003.
- Kargov, I. S., Kleymenov, S. Y., Savin, S. S., Tishkov, V. I., and Alekseeva, A. A. (2015) Improvement of the soy formate dehydrogenase properties by rational design, *Prot. Eng. Des. Select.*, 28, 171-178, doi: 10.1093/protein/ gzv007.
- Matthews, B. W. (1968) Solvent content of protein crystals, J. Mol. Biol., 33, 491-497, doi 10.1016/0022-2836(68)90205-2.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., and Wilson, K. S. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 67, 235-242, doi: 10.1107/ S0907444910045749.

HIGHLY ACTIVE RECOMBINANT FORMATE DEHYDROGENASE FROM PATHOGENIC BACTERIUM Staphylococcus aureus: PREPARATION AND CRYSTALLIZATION*

A. A. Pometun^{1,2,3#}, K. M. Boyko^{2#}, T. S. Yurchenko^{1,2}, A. Yu. Nikolaeva^{2,4}, I. S. Kargov^{2,3}, D. L. Atroshenko^{1,2,3}, S. S. Savin^{1,2,3}, V. O. Popov^{2,4}, and V. I. Tishkov^{1,2,3**}

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119991 Moscow, Russia; E-mail: vitishkov@gmail.com
² Bach Institute of Biochemistry, Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia
³ Innovations and High Technologies MSU Ltd. 109559 Moscow, Russia

⁴ National Research Center "Kurchatov institute", 123182 Moscow, Russia

Received April 16, 2020 Revised May 2, 2020 Accepted May 2, 2020

NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from *Staphylococcus aureus* (SauFDH) is one of the key enzymes responsible for the survival of this pathogen in the form of biofilms. 3D structure of the enzyme might be helpful in the search for highly specific SauFDH inhibitors that can be used as antibacterial agents exactly against *S. aureus* biofilms. Here, we prepared a recombinant SauFDH in *Escherichia coli* cells with a yield of 1 g target protein per liter medium. The developed procedure for the enzyme purification allowed to obtain 400 mg of homogenous enzyme with 61% yield. The specific activity of the purified recombinant SauFDH was 20 U per mg protein, which was 2 times higher than the previously reported activities of formate dehydrogenases. We also found crystallization conditions in the course of two rounds of optimization and obtained 200- and 40-µm crystals for the SauFDH apo- and holoenzymes, respectively. X-ray analysis using synchrotron X-ray sources produced diffraction data sufficient for solving the three-dimensional structures of the apo- and holoenzymes with the resolution of 2.2 and 2.7 Å, respectively. Crystals of the apo- and holoforms of SauFDH had different crystal space groups, which suggest coenzyme binding in the SauFDH holoenzyme.

Keywords: formate dehydrogenase, Staphylococcus aureus, expression, purification, crystallization, X-ray diffraction analysis

УДК 577.125.3

ЭВОЛЮЦИОННАЯ УТРАТА СПОСОБНОСТИ ПЕРВИЧНОГО ДОНОРА ЭЛЕКТРОНА ФОТОСИСТЕМЫ 1 К РЕДОКС-ВЗАИМОДЕЙСТВИЮ С Mn-БИКАРБОНАТНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ

© 2020 В.В. Терентьев*, С.К. Жармухамедов

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

> Поступила в редакцию 14.10.2019 После доработки 21.02.2020 Принята к публикации 03.04.2020

Структурно-функциональная организация донорной стороны реакционного центра (РЦ) фотосистемы 1 (ФС1) проявляет значительное сходство с РЦ пурпурных бактерий (бРЦ), хотя они относятся к разным типам. Более того, значения редокс-потенциалов их первичных доноров электрона идентичны и составляют ~0,5 В. Ранее в наших работах (Khorobrykh et al. (2008) *Pilos. Trans. R. Soc. B.*, **363**, 1245-1251; Terentyev et al. (2011) *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1360-1366; Khorobrykh et al. (2018) *Chem. Bio. Chem.*, **14**, 1725-1731) была показана возможность редокс-взаимодействия «низкопотенциальных» Mn²⁺-бикарбонатных комплексов с бРЦ, что, как предполагается, могло быть одним из начальных этапов эволюционного возникновения Mnкластера водоокисляющего комплекса фотосистемы 2 в Архее (> 3 млрд лет назад). В данной работе исследовали редокс-взаимодействие между Mn²⁺-бикарбонатными комплексами и ФС1. Было выявлено, что подобное взаимодействие практически отсутствует на исходных препаратах ФС1 и проявляется лишь на предварительно окисленных препаратах, содержащих ~50% окисленных РЦ. При этом редокс-взаимодействие между Mn²⁺-бикарбонатными комплексами и ФС1 требовало повышенного содержания Mn²⁺, а концентрационная зависимость от HCO₃ указывала на участие электронейтрального «низкопотенциального» комплекса [Mn(HCO₃)₂] в данном процессе. Анализ известной кристаллографической структуры ФС1 показал стерические затруднения на донорной стороне РЦ, которые могут препятствовать непосредственному редокс-взаимодействию между Mn²⁺-бикарбонатными комплексами и окисленным первичным донором электрона. Сравнение структур РЦ ФС1 и более древнего РЦ из гелиобактерий, относящихся к одному типу РЦ, позволило предположить отсутствие у примитивной ФС1 в Архее подобных стерических затруднений на донорной стороне, а их эволюционное возникновение объяснить как следствие вовлечения РЦ ФС1 в функционирование в единой электрон-транспортной цепи фотосинтетической мембраны, что сопровождалось эволюционной утратой у ФС1 способности к редокс-взаимодействию с Mn²⁺-бикарбонатными комплексами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосинтез, эволюция фотосинтеза, фотосистема 1, фотосинтетические реакционные центры, Мп-бикарбонатные комплексы.

DOI: 10.31857/S032097252006007X

Памяти Козлова Юрия Николаевича

введение

Фотосинтез является одним из важнейших глобальных биохимических процессов, в результате которого за счет энергии солнечного излучения происходит ассимиляция CO_2 , синтез органического вещества и, как следствие, накопление его в биосфере земли. Оксигенный (кислородный) фотосинтез является также источником практически всего молекулярного кислорода современной атмосферы.

Фотоиндуцированные реакции оксигенного фотосинтеза протекают в тилакоидных мембранах цианобактерий, зеленых водорослей и высших растений. В мембрану погружены крупные пигмент-белковые комплексы двух фотосис-

* Адресат для корреспонденции.

Принятые сокращения: ФС2 – фотосистема 2; ФС1 – фотосистема 1; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; РЦ – реакционный центр; бРЦ – бактериальный реакционный центр; гбРЦ – бактериальный реакционный центр из гелиобактерий; Хл – хлорофилл; бХЛ – бактериохлорофилл; Пц – пластоцианин; ДХФИФ – восстановленный 2,6-дихлорфенолиндофенол; БК – бикарбонат.

тем — фотосистемы 2 (ФС2) и фотосистемы 1 (ФС1), объединённые в единую электрон-транспортную цепь (ЭТЦ) [1—3]. Основу обеих фотосистем образуют гетеродимерные фотохимические реакционные центры (РЦ), в которых при участии кофакторов цепи переноса электрона происходят реакции фотоиндуцированного первичного разделения зарядов. В ФС2 этому сопутствует перенос электронов от молекул воды на акцепторы хиноновой природы, Q_A и Q_B , а в ФС1 от небольших водорастворимых белков пластоцианина (Пц) или цитохрома c_6 , восстановленных в результате транспорта электронов от ФС2, на Fe-S-кластеры и далее на ферредоксин [1—3].

Аноксигенный (бескислородный) фотосинтез, протекающий в фотосинтезирующих бактериях, является эволюционно более древним [4]. На впячиваниях цитоплазматической мембраны бактерий, в отличие от тилакоидной мембраны оксигенных организмов, функционирует лишь один РЦ (бРЦ), который, как считается, структурно-функционально гомологичен либо РЦ Φ C2, либо РЦ Φ C1 [4, 5]. Все известные РЦ, соответственно, относят либо к типу II, либо к типу І РЦ [4, 6]. Фотосинтетический аппарат бактерий также содержит пигмент бактериохлорофилл (бХл) вместо хлорофилла (Хл), который характерен для фотосистем тилакоидной мембраны [6]. Стоит отметить, что бРЦ типа II (пурпурные и зеленые нитчатые бактерии) являются гетеродимерными белковыми комплексами, так же, как и РЦ ФС2 и ФС1. В то же время бРЦ типа I (зеленые серные, гелиобактерии и ацидобактерии) имеют гомодимерную структуру [2, 6, 7], что может указывать на более раннее ответвление бРЦ типа I от общего эволюционного пути развития фотосинтетических РЦ.

Разделение всех РЦ на два типа, описанное выше, в основном зависит от химической природы их конечных акцепторов электрона. Так, РЦ типа II содержат акцепторы электрона хиноновой природы, а РЦ типа I в качестве акцепторов электрона содержат Fe-S-кластеры [5-8]. Подобное разделение полностью игнорирует структурно-функциональные различия и сходства РЦ на их донорных сторонах. Согласно им, как описано ниже, бРЦ типа II и РЦ ФС1 (тип I РЦ) очень похожи и значительно отличаются от РЦ ФС2 (тип II РЦ). Так, значения редокс-потенциала (Е_m) первичных доноров электрона в РЦ пурпурных бактерий, P₈₇₀, и РЦ ФС1, P₇₀₀, составляют ~0,5 В [3, 9, 10]. Вторичными донорами электрона для бРЦ типа II и РЦ ФС1 служат небольшие водорастворимые белки, соответственно цитохром c_2 и цитохром *c*₆ или Пц, обладающие близкими значениями E_m [6, 8]. Также бРЦ типа II и РЦ ФС1 характеризуются сравнимыми расстояниями между вторичными и первичными донорами электрона, и значениями диэлектрической проницаемости этого участка [11]. В отличие от бРЦ типа II и РЦ Φ C1, E_m первичного донора электрона в РЦ Φ C2, P₆₈₀, гораздо выше и может достигать значения 1,12-1,20 В [12, 13], что делает его одним из наиболее сильных окислителей в природе. Вторичным донором электрона в РЦ ФС2 является редокс-активный тирозин Y_z белка D1, восстанавливающийся от Мп-кластера [3, 6, 8], а значение диэлектрической проницаемости участка между Мп-кластером, Yz и P680 в РЦ ФС2 значительно ниже по сравнению с таковым между вторичным и первичным донором электрона в бРЦ типа II и РЦ ФС1 [11].

Наиболее вероятно, что отличия в структурно-функциональной организации донорной стороны РЦ ФС2 от бРЦ типа II и РЦ ФС1 были вызваны возникновением у его непосредственного эволюционного предшественника (наиболее вероятно, что это были бРЦ типа II) способности к использованию молекул воды в качестве донора электронов. Для протекания подобной реакции требуется накопление четырех окислительных эквивалентов, необходимых для одновременного окисления двух молекул воды, а также, чтобы первичный донор электрона РЦ обладал достаточно высоким значением E_m.

В ФС2 современных организмов сопряжение четырехэлектронного окисления двух молекул воды с одноэлектронным фотоиндуцированным переносом электрона в РЦ осуществляется благодаря уникальному Мп-содержащему кластеру (Mn_4CaO_5) [14], расположенному на донорной стороне.

Несмотря на основополагающее значение Mn-кластера для оксигенного фотосинтеза, вопрос о его эволюционном возникновении не решен до сих пор. Mn-кластер отсутствует у бРЦ типа II, которые эволюционно наиболее близки к РЦ ФС2. Также не обнаружено ни «переходных», ни содержащих «примитивный» Mn-кластер фотосинтезирующих организмов.

Мы предполагаем, что в эволюционном возникновении Мп-кластера в Архее (более 2,5 млрд лет назад) ключевую роль могли сыграть Mn^{2+} -бикарбонатные комплексы [15–19]. Одни из них, [Mn(HCO₃)₂], согласно данным электрохимии, являются электронейтральными и характеризуются по сравнению с аква-катионом Mn^{2+} довольно низким потенциалом окисления Mn^{2+} , равным ~0,52 В [20–23]. Это значение довольно близко к E_m первичного донора электрона в РЦ пурпурных бактерий [9] и, как было показано [16–18], бРЦ типа II действительно способны использовать такие комплексы в качестве доноров

электрона. Основываясь на данных геохимии, в Архее концентрация CO_2 была высокой [15], Mn^{2+} -бикарбонатные комплексы могли быть достаточно широко представлены и, соответственно, использоваться бРЦ типа II в качестве доноров электронов. Впоследствии в результате эволюционных изменений в структуре РЦ на донорной стороне мог возникнуть специальный сайт связывания Mn^{2+} -бикарбонатных комплексов, способствующий более эффективному редокс-взаимодействию этих комплексов с первичным донором электрона. Это, в свою очередь, могло стать предпосылкой для формирования примитивного тетра-марганец-бикарбонатного кластера.

В отличие от донорной стороны РЦ ФС2, донорная сторона РЦ ФС1 не подвергалась подобным масштабным эволюционным изменениям, и ее структурно-функциональная организация до сих пор проявляет сходство с донорной стороной бРЦ типа II [11]. Более того, значение E_m первичных доноров электрона обоих РЦ практически идентичны (~0,5 В) [3, 9, 10]. Исходя из этого, можно ожидать, что редокс-взаимодействие между Mn²⁺-бикарбонатными комплексами и бРЦ типа II, показанное нами ранее [16-18], возможно и в случае с РЦ ФС1. Это могло бы свидетельствовать о сходной направленности в эволюционной приспосабливаемости фотосинтезирующих организмов к условиям высокого содержания бикарбоната (БК) в окружающей среде Архея (до 200 мМ [15]) и, как следствие, к использованию широко представленных Mn²⁺-бикарбонатных комплексов в качестве доноров электронов разными типами РЦ.

В данной работе исследовали редокс-взаи-Mn²⁺-бикарбонатными модействие между комплексами и первичным донором электрона РЦ ФС1, Р₇₀₀. Полученные результаты свидетельствуют о возможности подобного взаимодействия, но только на предварительно окисленных препаратах ФС1. Это может рассматриваться как подтверждение предположения о возможном использовании Mn²⁺-бикарбонатных комплексов в Архее непосредственно перед возникновением оксигенного фотосинтеза в качестве доноров электрона примитивными РЦ ФС2 (бРЦ) и ФС1 и дальнейшей потерей этой способности у РЦ ФС1 в результате адаптации ее структурной организации для функционирования в единой фотосинтетической ЭТЦ оксигенной тилакоидной мембраны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения фотохимически активных фрагментов тилакоидных мембран, обогащен-

БИОХИМИЯ том 85 вып. 6 2020

ных ФС1 (далее ФС1), использовали 2-3-недельные листья гороха (Pisum sativum). Из суспензии солюбилизированных в присутствии Triton X-100 тилакоидных мембран с помощью центрифугирования осаждали кислород-выделяющие фрагменты мембран, обогащенные ФС2 [24]. Используемое соотношение Triton X-100 к Хл составляло 20:1. Легкие фрагменты, обогащенные Φ C1, оставшиеся в супернатанте, осаждали ультрацентрифугированием: сначала при 80 000 g, 30 мин (осадок отбрасывали), затем при 180 000 g, 3 ч. Осадок, содержащий ФС1, ресуспендировали в среде, содержащей 25 мМ MES-NaOH, pH 6,5, 15 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ и 300 мМ сахарозы до концентрации по Хл 1,5-2 мг/мл. Препараты хранили в присутствии 10%-ного глицерина при -70 °С. Все этапы работы по изолированию ФС1 проводили при 4 °С и слабом освещении зеленым светом.

Общую концентрацию Хл в препаратах ФС1 определяли спектрофотометрически после экстракции пигментов 80 %-ным ацетоном [25].

Кинетику фотоиндуцированных изменений поглощения, связанных с обратимым фотоокислением P_{700} , измеряли в 10 мм кювете при комнатной температуре на фосфороскопической установке, позволяющей разделять действующий и измерительный свет [16]. Интенсивность действующего света (660 < λ < 800 нм) составляла ~1000 мкмолей фотонов м⁻² c⁻¹.

Измерения проводили в среде, содержащей 50 мМ Нерез (pH 8,3) и обедненной по CO₂/HCO₃. Удаление CO₂/HCO₃ достигали благодаря продуванию среды воздухом без CO₂, для чего его пропускали через 20 см слой аскарита и 50 %-ный раствор NaOH [26].

Визуализация взаимного расположения P_{700} и аминокислотных остатков в ФС1 была выполнена с помощью программы VMD (Иллинойс-кий университет, США) [27] с использованием данных о кристаллической структуре ФС1 из высших растений (2WSE [28]), взятых с сайта PBD (https://www.rcsb.org).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пигмент-белковые комплексы ФС2 и ФС1 у современных организмов строго разделены в тилакоидной мембране: ФС2 преимущественно находится в стэкированных мембранах гран, в то время как ФС1 локализуется в мембранах ламелл и поверхностных (нестэкированных) мембранах гран [1, 3]. Это позволяет легко получать мембранные препараты, обогащенные либо ФС2, либо ФС1. Спектральные характеристики обеих фотосистем в подобных препаратах хорошо известны и служат надежным способом как для проверки степени чистоты той или другой фотосистемы, так и их фотоиндуцированной активности.

Дифференциальный спектр поглощения «свет минус темнота» выделенных нами препаратов ФС1 из гороха представлен на рис. 1. По своим спектральным характеристикам он полностью соответствует опубликованным ранее данным для высших растений [29–31]. Известно [31], что полосы выцветания при 700 нм и 430 нм отражают фотоиндуцированное образование и накопление P_{700}^+ , а максимум при 682 нм и, соответственно, минимум при 689 нм являются электрохромным сдвигом полосы поглощения Хл при 680 нм, вызванным электростатическим полем образовавшегося Р⁺₇₀₀. Таким образом, амплитуда изменения поглощения в области 700 нм (ΔA_{700}) при освещении препаратов $\Phi C1$ действующим светом отражает непосредственное фотонакопление Р₇₀₀, а темновая релаксация, соответственно, восстановление до Р₇₀₀.

Как показано на рис. 2 в препаратах Φ C1 в ответ на включение действующего света наблюдалось быстрое (неразрешаемое) нарастание ΔA_{700} до максимального значения (ΔA_{700}^{MAX}), которое не изменялось со временем. На величину ΔA_{700}^{MAX} практически не оказывали влияния известные доноры электронов — аскорбат Na или восстановленный 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ). Это свидетельствовало о том, что изначально препараты не содержали окисленных



Рис. 1. Дифференциальный спектр поглощения «свет минус темнота» препаратов ФС1, выделенных из листьев гороха. Измерения проводили в присутствии 0,2 мМ аскорбата Na и 0,1 мМ 2,6-дихлорфенолиндофенола (режим фотонакопления P_{700}^+). Содержание хлорофилла 10 мкг/мл. Действующий свет 660 < λ < 800 нм, 1000 мкмолей фотонов $M^{-2} c^{-1}$



Рис. 2. Кинетика фотоиндуцированных изменений поглощения при 700 нм, связанных с фотоокислением и последующим темновым восстановлением первичного донора электрона, P_{700} , в препаратах ФС1. Кривые: 1 - в отсутствии добавок (контроль), 2 - в присутствии 1 мМ аскорбата Na, 3 - в присутствии 1 мМ аскорбата Na и 0,1 мМ 2,6-дихлорфенолиндофенола. Стрелками ($\uparrow \downarrow$) обозначены, соответственно, включение и выключение действующего света. Условия измерений см. в подписи к рис. 1. Для удобства представления шкала поглощения здесь и далее дана в обратных значениях

первичных доноров электрона, и при включении действующего света в окисленное состояние переходило 100% P_{700} . То есть ΔA_{700}^{MAX} эквивалентно переходу всех первичных доноров электрона в окисленное состояние.

Тем не менее доноры электрона значительно ускоряли кинетику темнового восстановления P_{700}^+ (рис. 2). В отсутствие добавок практически полное темновое восстановление P_{700}^+ происходило ~ за 150 с (τ ~ 35 с) и значительно ускорялось в присутствии доноров электронов – аскорбата Na (τ ~ 7 с) или ДХФИФ.

Известно, что значение E_m первичного донора электрона в РЦ ФС1 составляет ~0,5 В [3, 10], что эквивалентно E_m первичного донора электрона в РЦ пурпурных бактерий [9]. Как было показано в предыдущих работах [16–18], РЦ из пурпурных бактерий в отсутствие на донорной стороне цитохромной С-субъединицы способны к редокс-взаимодействию с Mn²⁺, но только в присутствии ионов БК (HCO₃), т.е., когда Mn²⁺ находится в составе Mn²⁺-бикарбонатных комплексов. Причем согласно ЭПР-данным, полученным при криогенных температурах (5K), бРЦ под действием света окисляют Mn²⁺ в присутствии БК до Mn³⁺ [18].

Ранее экспериментально было установлено, что значение E_m первичного донора электрона РЦ является одним из условий осуществления

подобного редокс-взаимодействия, которое полностью исчезало в случае бРЦ типа II изолированных из зеленой нитчатой бактерии Chloroflexus aurantiacus, характеризующихся более низким значением E_m первичного донора электрона по сравнению с РЦ пурпурных бактерий [17]. Другими необходимыми условиями редокс-взаимодействия между Mn²⁺-бикарбонатными комплексами и первичным донором электрона бРЦ являются значение рН среды и концентрация растворенного в ней БК. Так, стимулирование восстановления Р₈₇₀ в бРЦ в присутствии Mn²⁺ и HCO₃ наблюдалось только при pH ~ 8,3 и концентрации БК > 30 мМ [16, 17]. Как было позднее показано с помощью электрохимии, формирование и доминирование в растворе «низкопотенциальных» (по сравнению с аква-катионом Mn^{2+}) комплексов $[Mn(HCO_3)_2]$ с потенциалом окисления Mn²⁺, равным 0,52 В, помимо высокой концентрации ионов НСО₃ [21–23], также требуется pH ~ 8,3 [32]. Исходя из полных констант устойчивости для разных типов Mn^{2+} -бикарбонатных комплексов [22, 23], было рассчитано распределение Mn²⁺ между ними в растворе при рН 8,3 в зависимости от концентрации ионов HCO_{3}^{-} [19], которое показало, что при 30 мМ БК только ~25% Mn²⁺ находится в комплексе $[Mn(HCO_3)_2]$, а при 50 мМ БК на долю этого комплекса приходится уже более 40%.

РЦ ФС1, помимо «подходящего» для редоксвзаимодействия с «низкопотенциальными» Mn²⁺-бикарбонатными комплексами значения Е_т первичного донора электрона, также характеризуются оптимумом своей фотосинтетической активности в области рН 8,5–9,0 [33, 34], что совпадает с указанным выше необходимым значением рН для формирования комплексов [Mn(HCO₃)₂]. С одной стороны, это может служить косвенным указанием на то, что эволюционный предшественник современной ФС1 мог функционировать при значениях рН благоприятных для формирования в среде комплексов $[Mn(HCO_3)_2]$. С другой стороны, интересно отметить, что рН оптимум фотосинтетической активности ФС2, с которой ФС1 параллельно функционирует в тилакоидной мембране, находится в более кислой области 6,2-6,5 [26], а pH люмена тилакоидов современных оксигенных фотосинтезирующих организмов колеблется в диапазоне от 7,0 до 6,0 (возможно до 5,5) (см. подробнее в [26]). Тем не менее в результате серии проведенных нами экспериментов на препаратах ФС1 было обнаружено, что при рН 8,3 присутствие 0,5 мМ Mn^{2+} вместе с 50 мМ HCO_3^- (т.е. в условиях формирования и доминирования в среде «низкопотенциальных» Mn²⁺-би-



Рис. 3. Фотоокисление P_{700} и его темновое восстановление. Кривые: 1 - в отсутствие добавок (контроль), 2 - в присутствии 0,5 мМ MnCl₂ и 50 мМ NaHCO₃. Стрелками ($\uparrow \downarrow$) обозначены соответственно включение и выключение действующего света. Условия измерений см. в подписи к рис. 1

карбонатных комплексов, способных к редоксвзаимодействию с P_{870}^+ в бРЦ) не оказывает влияния ни на величину ΔA_{700} , ни на кинетику темнового восстановления P_{700}^+ (рис. 3), что свидетельствовало об отсутствии редокс-взаимодействия между комплексами [Mn(HCO₃)₂] и P_{700}^+ .

Кристаллографические структуры РЦ из пурпурных бактерий и ФС1 (https://www.rcsb.org) характеризуются схожим расстоянием между первичным донором электрона и поверхностью донорной стороны. Кроме того, оба РЦ имеют близкие значения диэлектрической проницаемости этого участка, а перенос электрона от вторичного к первичному донору электрона на протеолипосомах, содержащих РЦ из пурпурных бактерий или ФС1, сопровождается генерацией сравнимой разности электрических потенциалов $\Delta \psi$ (~20% от трансмембранного значения $\Delta \psi$) [11, 35]. Исходя из вышесказанного, наиболее логичным объяснением наблюдаемого отсутствия редокс-взаимодействия между Mn²⁺бикарбонатными комплексами и Р₇₀₀ могло быть наличие некого стерического затруднения для осуществления переноса электрона на донорной стороне РЦ Φ C1 от Mn²⁺ (в составе бикарбонатного комплекса) на Р₇₀₀.

В ходе изучения данного предположения мы искусственно переводили P_{700} в препаратах Φ C1 в «долгоживущее» окисленное состояние. Для этого адаптированные к темноте Φ C1 инкубировали в присутствии 1 мМ K_3 [Fe(CN)₆] в течение 1 мин с последующим переосаждением препаратов в исходном буфере, не содержащем K_3 [Fe(CN)₆]. В результате такой обработки у

~40-45% ФС1 первичный донор электрона находился в «долгоживущем» окисленном состоянии («окисленные» ФС1), о чем свидетельствовало снижение величины ∆А₇₀₀ на 40-45% (рис. 4, кинетика I) по сравнению с таковой, наблюдаемой в присутствии экзогенных доноров электрона (0,1 мМ аскорбата Na и 0,1 мМ ДХФИФ), способных к быстрому и полному восстановлению Р⁺₇₀₀ в темноте (рис. 4, кинетика 4). Учитывая, что ΔA_{700} в присутствии доноров электрона соответствует ΔA_{700}^{MAX} (рис. 2), детекти-руемые 55–60% от ΔA_{700}^{MAX} , соответственно, отражали количество РЦ с восстановленными Р₇₀₀, способными к фотоокислению, от общего количества РЦ. Темновая инкубация «окисленных» ФС1 в течение 20-30 мин не изменяла долю ΔA_{700} относительно ΔA_{700}^{MAX} , что свидетельствовало об отсутствии спонтанного темнового восстановления Р₇₀₀ в условиях эксперимента.

При добавлении к таким «окисленным» Φ C1 0,5 мМ Mn^{2+} вместе с 50 мМ HCO_3^- нам удалось обнаружить возрастание амплитуды ΔA_{700} до, примерно, 80% от ΔA_{700}^{MAX} (рис. 4, кинетика 2). Это свидетельствовало о том, что в ходе эксперимента количество восстановленных в темноте



Рис. 4. Кинетики фотоиндуцированных изменений поглощения при 700 нм препаратов «окисленных» ФС1 (прединкубированных с K₃[Fe(CN)₆]). Кривые: I – в отсутствие добавок, в присутствии 0,5 мМ MnCl₂ и 50 мМ NaHCO₃: инкубирование перед измерением 3 мин (2) и 10 мин (3); 4 – в присутствии 0,1 мМ аскорбата Na и 0,1 мМ 2,6-дихлорфенолиндофенола. Концентрация препаратов по хлорофиллу 30 мкг/мл. Действующий свет 660 < λ < 800 нм, 1000 мкмолей фотонов м⁻² с⁻¹. Стрелками ($\uparrow \downarrow$) обозначены, соответственно, включение и выключение действующего света.

Р₇₀₀ в препаратах «окисленных» ФС1 возрастало на 20-25%. Более того, было выявлено, что последующее дополнительное темновое инкубирование «окисленных» ФС1 в присутствии Mn²⁺бикарбонатных комплексов приводит к увеличению доли восстановленных P_{700} в препаратах. Через 10 мин темновой инкубации удавалось достичь максимального эффекта, так что ΔA_{700} составляла ~90% от ΔA_{700}^{MAX} (рис. 4, кинетика 3). Тем не менее, в проведенных экспериментах не было обнаружено очевидного влияния присутствия 0,5 мМ Мп²⁺ вместе с 50 мМ НСО₃⁻ на кинетику темнового восстановления P_{700}^+ в отличие от того, как это наблюдалось в присутствии аскорбата Na или ДХФИФ (рис. 4, кинетика 4). Важно отметить, что наблюдаемый эффект показывал специфичность по отношению к Mn²⁺бикарбонатным комплексам. Как следует из рис. 5, добавление к «окисленным» ФС1 0,5 мМ Mn^{2+} или 50 м $M HCO_3^-$ отдельно друг от друга не оказывало влияния ни на ΔA_{700} , ни на кинетику темнового восстановления Р₇₀₀ даже после инкубации в темноте в течение 10 мин (рис. 5, a). Также эффект отсутствовал при добавлении других двухвалентных катионов металлов (Mg²⁺ и Ca²⁺) в присутствии 50 мМ HCO_3^- (рис. 5, δ , кинетики 3 и 4) или ионов ацетата и формиата в присутствии 0,5 мМ Мп²⁺ после 10 мин инкубации в темноте (рис. 5, б, кинетики 5 и 6).

Как было сказано выше, одним из необходимых условий для доминирования «низкопотенциальных» комплексов [Mn(HCO₃)₂] среди других комплексов в растворе является повышенная концентрация БК [21-23]. В то же время, как было показано с помощью ЭПР-спектроскопии, от концентрации катионов Mn²⁺ зависит лишь количество этих комплексов, но не их тип [22]. В предыдущих работах на бРЦ мы наблюдали зависимость эффективности редокс-взаимодействия Mn^{2+} -бикарбонатных комплексов с P_{870}^+ от концентраций HCO_3^- и Mn^{2+} [16]. Так, в присутствии 0,5 мМ Мп²⁺ и при добавлении БК до 10-15 мМ не наблюдалось ускорения темнового восстановления P_{870}^+ , которое начинало проявляться при увеличении концентрации БК до 30 мМ и достигало максимального эффекта при 50 мМ БК [16]. В то же время в присутствии 50 мМ НСО₃ ускорение темнового восстановления P_{870}^+ наблюдалось уже при 0,01 мМ Mn^{2+} и достигало максимума при 0,5 мМ Mn²⁺ [16], что, по-видимому, отражало насыщение раствора комплексами [Mn(HCO₃)₂], способными к редокс-взаимодействию с Р₈₇₀ в бРЦ.

На рис. 6, *а* показано влияние увеличивающейся концентрации Mn^{2+} на ΔA_{700} в «окисленных» $\Phi C1$ в присутствии 50 мМ HCO_3^- . Явное увеличение ΔA_{700} , по сравнению с исходным





Рис. 5. Кинетики фотоиндуцированных изменений поглощения при 700 нм препаратов «окисленных» ФС1 (прединкубированных с K₃[Fe(CN)₆]). *a*) Кривые: *1* – в присутствии 0,1 мМ аскорбата Na и 0,1 мМ 2,6-дихлорфенолиндофенола; *2* – в отсутствие добавок; *3* – в присутствии 0,5 мМ MnCl₂; *4* – в присутствии 50 мМ NaHCO₃; *6*) кривые: *1* – в присутствии 0,1 мМ аскорбата Na и 0,1 мМ 2,6-дихлорфенолиндофенола; *2* – в отсутствие добавок; *3* – в присутствии 0,5 мМ MgCl₂ и 50 мМ NaHCO₃; *4* – в присутствии 0,5 мМ CaCl₂ и 50 мМ NaHCO₃; *4* – в присутствии 0,5 мМ CaCl₂ и 50 мМ NaHCO₃; *5* – 0,5 мМ MnCl₂ и 50 мМ формиата; *6* – 0,5 мМ MnCl₂ и 50 мМ ацетата. Стрелками (↑↓) обозначены, соответственно, включение и выключение действующего света. Условия измерений см. в подписи к рис. 4

Гис. 0. Зависимость стимулирующего эффекта или -оикарбонатных комплексов на амплитуду ΔA_{700} в «окисленных» ФС1 от концентрации Mn²⁺ (*a*) или HCO₃ (*б*). Измерения проводили соответственно в присутствии 50 мМ NaHCO₃ или 0,5 мМ MnCl₂. Черным треугольником обозначено максимальное значение ΔA_{700} в присутствии 1 мМ аскорбата Na и 0,1 мМ 2,6-дихлорфенолиндофенола (ΔA_{700}^{MAX}). На врезке показан тот же график, что и (*a*), но в области концентраций Mn²⁺ от 0 до 50 мкМ.

значением в «окисленных» Φ C1, наблюдалось при 0,05 мМ Mn²⁺ и достигало максимума при 0,2–0,3 мМ Mn²⁺. В то же время в присутствии 0,5 мМ Mn²⁺ влияние HCO₃⁻ на Δ A₇₀₀ в «окисленных» Φ C1 начинало явно проявляться при концентрациях выше 20 мМ, достигая максимума при 40 мМ HCO₃⁻ (рис. 6, δ). Полученные результаты хорошо коррелируют с зависимостью доминирования в растворе комплексов [Mn(HCO₃)₂] от концентрации БК. Кроме того, они практически совпали с данными, полученными нами ранее на δ PЦ [16].

Интересно отметить, что зависимость эффекта от концентрации Mn^{2+} отличалась от полученной нами ранее на бРЦ [16]. В случае с Φ C1 эффект полностью отсутствовал при 0,01 мМ Mn^{2+} (в отличие от бРЦ), начиная проявляться только при 0,05 мМ Mn^{2+} (рис. 6, *a*). Учитывая, что Mn^{2+} влияет на концентрацию содержащихся в среде комплексов [$Mn(HCO_3)_2$], можно предположить, что для инициирования редокс-взаимодействия Mn^{2+} -бикарбонатных комплексов с P_{700}^+ требуется более высокое содержание в растворе комплексов [$Mn(HCO_3)_2$], чем в случае с бРЦ, даже на предварительно окисленных препаратах Φ C1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В предыдущих работах мы впервые экспериментально показали способность бРЦ типа II к редокс-взаимодействию с Mn^{2+} в присутствии БК [16–18]. Учитывая, что бРЦ типа II считаются наиболее вероятными эволюционными предшественниками РЦ ФС2, полученные в тех работах результаты рассматривались как подтверждение гипотезы о возможном участии Mn^{2+} -бикарбонатных комплексов в эволюционном возникновении Mn-кластера водоокисляющего комплекса ФС2 в Архее (> 2,5 млрд лет назад) [15–18].

Учитывая сходство структурно-функциональных характеристик донорных сторон [11] и значений редокс-потенциалов первичных доноров электрона в бРЦ типа II и ФС1 [3, 9, 10] (см. Введение), было предположено, что редокс-взаимодействие между комплексами [Mn(HCO₃)₂] и первичным донором электрона должно быть характерно и для РЦ ФС1. Однако, как показали проведенные нами эксперименты, присутствие «низкопотенциальных» Mn²⁺-бикарбонатных комплексов не оказывало влияния ни на фотоокисление P₇₀₀, ни на его восстановление в темноте (рис. 3).

Одной из наиболее вероятных причин подобного результата могло быть стерическое затруднение на донорной стороне ФС1, препятствующее возможному редокс-взаимодействию Мп²⁺-бикарбонатных комплексов с P_{700}^+ . Действительно, как следует из кристаллографических структур ФС1, изолированных из цианобактерий, зеленых водорослей и высших растений, их РЦ имеют консервативный гидрофобный мотив на донорной стороне, расположенный прямо перед Р₇₀₀. Он сформирован аминокислотными остатками двух триптофанов, принадлежащих параллельным люменальным петлям разных субъединиц РЦ (соответственно PsaA-Trp₆₅₅/Trp₆₅₁ и PsaB-Trp₆₃₁/Trp₆₂₇ в цианобактериях/водорослях и высших растениях) (рис. 7, а). Считается, что эти триптофаны образуют своеобразный сэндвич с объединенной электронной системой в непосредственной близости от Р₇₀₀ [36, 37]. Согласно современным представлениям, такая структура играет важную роль в корректном докинге молекул цитохрома *с*₆ и Пц для быстрого донирования электрона на первичный донор электрона [36-38]. Дополнительно белковая поверхность около Р₇₀₀ окружена отрицательно заряженными (PsaA-Asp₆₄₈ и PsaB-Asp₆₂₄) и положительно заряженными (PsaA-Arg₆₄₇ и PsaB-Arg₆₂₃) аминокислотными остатками, играющими роль в правильном ориентировании гема в цитохроме c_6 или меди в Пц относительно гидрофобного сэндвича и Р⁺₇₀₀ [36, 37]. Более того, вокруг триптофанового сэндвича легко прослеживается своеобразное кольцо, сформированное гидрофобными аминокислотами, которое вместе с ним практически полностью отделяет Р₇₀₀ от люмена (рис. 7, б и в). В настоящее время в литературе отсутствуют данные о каком-либо функциональном значении данного гидрофобного кольца на донорной стороне **Ф**С1.

Подобное окружение Р₇₀₀ может сильно затруднять редокс-взаимодействие Mn²⁺-бикарбонатных комплексов с Р₇₀₀. Гидратная оболочка Mn²⁺ в комплексах с БК сохраняет 5 или 4 молекул воды в зависимости от типа комплекса (из 6 возможных в аква-катионе Mn^{2+}) [20, 21]. Соответственно, гидрофобный сэндвич из двух триптофанов, находящийся непосредственно перед Р₇₀₀, совместно с гидрофобным кольцом не позволяют комплексам подходить достаточно близко к Р₇₀₀ для осуществления прямого редоксвзаимодействия. Как показано на рис. 7, а расстояние между внешним кольцом триптофана, обращенным в люмен, и ближайшим к нему циклом в молекуле Хл в Р₇₀₀ составляет ~9,6-9,7 Å, а расстояние до центра молекулы Хл составляет уже 13,6-13,8 А. При этом, для Mn²⁺бикарбонатных комплексов эти значения могут быть еще больше вследствие гидрофобного воз-


Рис. 7. Взаимное расположение P_{700} и гидрофобных и заряженных аминокислот в его окружении. Гидрофобный сэндвич перед P_{700} (зелёный цвет), образованный парой A-Trp₆₅₁/B-Trp₆₂₇ (желтый цвет), отрицательно заряженные A-Asp₆₄₈ и B-Asp₆₂₄ (красный цвет) и положительно заряженные A-Arg₆₄₇ и B-Arg₆₂₃ (синий цвет), участвующие в корректном докинге цитохрома c_6 или Пц. А- и B-, соответственно, субъединицы PsaA и PsaB в РЦ ФС1. a – Стрелками указаны расстояния между внешним кольцом Trp и ближайшим к нему кольцом и центром молекулы хлорофилла P_{700} ; δ – указано гидрофобное кольцо, образованное A-Ala_{654/652} (темно-серый цвет), A-Val₆₅₇ (серый цвет), A-Ile₆₅₈ и B-Ile₆₃₄ (темно-желтый), A-Leu_{646/650} и B-Leu_{628/626/622} (коричневый); вид со стороны тилакоидной мембраны; s – то же самое, что δ , но вид со стороны люмена. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/ journal/biokhsm/)

действия сэндвича (рис. 7, *a*). Заряженные аминокислотные остатки, в свою очередь, могут оказывать влияние на электрохимические свойства Mn²⁺ в комплексе с БК. Согласно имеющимся данным [20-23], «низкопотенциальные» Mn²⁺-бикарбонатные комплексы формируются с участием двух ионов НСО₃, которые, помимо снижения потенциала окисления Mn²⁺ до ~0,52 В, также нейтрализуют и общий заряд комплекса [Mn(HCO₃)₂]. Отрицательно заряженные PsaA-Asp₆₄₈ и PsaB-Asp₆₂₄, находящиеся вблизи P₇₀₀, могут притягивать к себе Mn²⁺ в комплексах, одновременно выталкивая НСО₃ из их оболочки. При этом удаление даже одного из двух ионов HCO_3^- , т.е. изменение стехиометрии комплекса $[Mn(HCO_3)_2] \rightarrow [Mn(HCO_3)]^+$ (как показано ранее [20, 21, 23]) приводит к повышению потенциала окисления Mn²⁺ до ~0,61 В, делая термодинамически затруднительего редокс-взаимодействие с P_{700}^+ ным $(E_m \sim 0.5 \text{ B})$. Удаление обоих ионов HCO₃ повы-

Агg₆₄₇ и PsaB-Arg₆₂₃, наоборот, могут оттягивать на себя ионы HCO₃⁻ из комплексов, отталкивая положительно заряженные [Mn(HCO₃)]⁺ или даже Mn²⁺, также повышая потенциал окисления Mn²⁺ по описанному выше принципу. Учитывая, что аминокислотные остатки в разнозаряженных парах PsaA-Asp₆₄₈/Arg₆₄₇ и PsaB-Asp₆₂₄/Arg₆₂₃ находятся параллельно друг другу на довольно близком расстоянии, соответственно ~4,0 и ~3,3 Å (рис. 7, *в*), можно предположить их совместное влияние на электрохимические свойства Mn²⁺ в комплексе с БК. В результате это может значительно затруднять редокс-взаимодействие Mn²⁺ с P₇₀₀ даже в присутствии высоких концентраций БК.

шает потенциал окисления Mn²⁺ уже до ~0,67 В

[20, 21, 23]. Положительно заряженные PsaA-

Тем не менее редокс-взаимодействие Mn^{2+} бикарбонатных комплексов с P_{700}^+ возможно, хотя и сильно затруднено. Для этого первичный донор электрона было необходимо перевести в

окисленное состояние и инкубировать в присутствии Mn^{2+} и БК несколько минут (рис. 4). Но даже в этом случае, по сравнению с экспериментами на бРЦ типа II [16–18], требовалось в 5 раз больше Mn^{2+} (т.е. Mn^{2+} -бикарбонатных комплексов) для наблюдения эффекта (рис. 6, *a*). Зависимость эффекта от присутствия Mn^{2+} и HCO_3^- (рис. 5), а также от высокой концентрации БК (рис. 6, δ), указывали на участие именно «низкопотенциальных» комплексов [$Mn(HCO_3)_2$] в редокс-взаимодействии с окисленным первичным донором электрона $\PhiC1$.

Недавно полученный кристалл бРЦ типа I из гелиобактерии (гбРЦ) [39] позволяет провести сравнительный анализ структурной организации между РЦ ФС1 и его наиболее возможного эволюционного предшественника (бРЦ типа I). Интересно, что, как указывают сами авторы работы, несмотря на то, что в структуре гбРЦ, так же, как и в РЦ ФС1, на донорной стороне присутствуют поверхностные параллельные спирали двух белков РЦ, в гбРЦ они короче и не несут гидрофобных триптофанов. Более того, поверхность гбРЦ около первичного донора в основном содержит нейтральные и гидрофильные аминокислотные остатки [39], хотя вторичным донором электрона выступает цитохром c_{553} , который имеет очень схожую структуру с цитохромом с₆ [39].

Таким образом, можно предположить, что эволюционный предшественник РЦ ФС1 (бРЦ типа I) или даже РЦ примитивной ФС1 могли не иметь описанных выше стерических затруднений на донорной стороне и его РЦ был доступен для редокс-взаимодействия с Mn²⁺-бикарбонатными комплексами, подобно бРЦ типа II.

Согласно данным геохимии, содержание CO_2 в древней бескислородной атмосфере Архея (> 3 млрд лет назад) было гораздо выше современного уровня [40, 41], вследствие чего концентрация растворенного в воде БК могла достигать 200 мМ [15]. Очевидно, что это благоприятствовало нахождению большей части растворенного Mn^{2+} в виде «низкопотенциальных» Mn^{2+} -бикарбонатных комплексов [20, 21, 23], которые, вероятно, могли использоваться в качестве доноров электронов РЦ обоих типов.

В подтверждение предположения о широко распространенной в Архее Mn²⁺-фототрофии у фотосинтезирующих организмов можно рассматривать данные, полученные при изучении осадочных пород в глубоких скважинах Южной Африки [42]. Согласно им, в слоях карбонатов, относящихся ко времени >2,4 млрд лет назад, детектируется аномально высокое содержание Mn (до 16,6% по весу). Вторичное диагенетическое формирование подобных карбонатов хорошо известно [43] и, согласно предположению авторов, могло произойти в результате восстановления оксидов Mn (IV) углеродом органического происхождения (уравнения 1 и 2) [42].

$$2 \operatorname{MnO}_{2} + \operatorname{CH}_{2}O + 2 \operatorname{H}^{+} \longrightarrow 2 \operatorname{Mn}^{2+} + \operatorname{CO}_{3}^{2-} + 2 \operatorname{H}_{2}O, (1)$$
$$\operatorname{Mn}^{2+} + \operatorname{CO}_{3}^{2-} \longrightarrow \operatorname{MnCO}_{3}.$$
(2)

Однако при этом утверждается, что в аноксигенном Архее окисление Mn^{2+} с последующим образованием его оксидов в концентрациях, необходимых для формирования обнаруженных пород, было невозможно в отсутствие сильного окислителя [42]. Если принять во внимание выдвигаемую нами гипотезу окисления Mn^{2+} фотосинтетическими РЦ, то масштабное образование и накопление MnO_2 в осадочных породах можно было бы объяснить следующими процессами (ур. 3–7):

$$Mn^{2+} - e \xrightarrow{6P \sqcup u \Phi C1} Mn^{3+}, \qquad (3)$$

$$Mn^{3+} + 3H_2O \longrightarrow Mn(OH)_3 + 3 H^+, \qquad (4)$$

$$Mn(OH)_3 - H_2O \longrightarrow Mn^{3+}OOH$$
 или (O=Mn^{3+}-OH), (5)

$$\underbrace{ \overset{O=Mn^{3+}-OH}{O=Mn^{3+}-OH} - H_2O}_{Mn_{4^{+}}} \underbrace{ \overset{O=Mn^{3+}-O-Mn^{3+}=O}{Mn^{4+}=O}}_{Mn_{4^{+}}=O} \hspace{0.1cm} \text{или} \hspace{0.1cm} (Mn_2O_3)^{a} \hspace{0.1cm}, \hspace{0.1cm} (6) \hspace{0.1cm}$$

$$Mn_2O_3^a + Mn_2O_3^6 \xrightarrow{\text{диспропор-}}{\text{плонирование}} Mn^{2+} + 3 O=Mn^{4+}=O$$
 или (MnO₂). (7)

Интересно, что авторы вышеуказанной работы тоже приходят к выводу об отсутствии абиотических механизмов в Архее, которые могли бы привести к окислению Mn²⁺ при формировании изучаемых пород. Более того, они поддерживают идею широкого присутствия Mn-окисляющих фотосинтезирующих организмов в окружающей среде Архея непосредственно перед возникновением и распространением оксигенных организмов.

Перед возникновением единой ЭТЦ оба типа РЦ должны были локализоваться в одной мембране, но при этом функционировать независимо друг от друга. Вернее всего, тип II РЦ был представлен бРЦ, которые уже обладали специальным сайтом связывания Mn^{2+} -бикарбонатных комплексов или даже содержали на донорной стороне примитивный тетра-марганец-бикарбонатный кластер (пред-ФС2). В то же время тип I РЦ, по-видимому, был представлен примитивной ФС1. Проводя аналогию со схемой электронного транспорта в РЦ пурпурных бактерий (бРЦ типа II) и зеленых серных

бактерий (бРЦ типа I) [4], можно предположить, что, соответственно, пред-ФС2 имела циклический транспорт электронов с участием цитохромного bc₁-комплекса, пронизывающего мембрану, и небольшого растворимого белка – цитохрома c_2 , а примитивная Φ C1 могла осуществлять как циклический транспорт электронов посредством цитохромного bc1-комплекса и цитохрома с, так и линейный транспорт – от донора электрона на ферредоксин и далее на НАДФ⁺. В случае линейного транспорта электронов примитивная ФС1 так же, как и бРЦ типа II в аноксигенных бактериях, могла активно использовать Mn²⁺-бикарбонатные комплексы в качестве доноров электрона. Интересно, что переключение между циклическим и нециклическим транспортом электронов характерно также для ФС1 современных организмов. Однако неизвестно, является ли это сохраненным и адаптированным свойством бРЦ типа I, которые были эволюционными предшественниками ФС1, или это все же заново приобретенный механизм. В пред-ФС2 часть электронов циклического транспорта могла акцептироваться другими молекулами, выпадая из цикла, что восполнялось электронами от Mn²⁺-бикарбонатных комплексов.

Предполагается, что молекулярный кислород начал накапливаться в атмосфере Земли ~2,5 млрд лет назад [6]. Однако резкая интенсификация формирования слоистых железных формаций (руд) (движущей силой мог быть фотосинтетический О₂) произошла гораздо раньше, ~3,1 млрд лет назад [6]. Следовательно, к этому времени уже должно было произойти объединение ФС2 и ФС1 в единую ЭТЦ и завершиться формирование Mn-кластера на донорной стороне ФС2, окисляющего воду и продуцирующего О₂ в окружающую среду. Примерно к этому же времени в атмосфере Земли произошло резкое снижение концентрации CO_2 [40, 41], поэтому ~3 млрд лет назад уровень СО₂ практически достиг современного значения. Это должно было сопровождаться значительным снижением в окружающей среде «низкопотенциальных» Mn²⁺-бикарбонатных комплексов, способных к редокс-взаимодействию с РЦ, однако требующих высокого содержания НСО₃ [15-19].

Эволюционное возникновение у пред-ФС2 Мп-кластера, и, соответственно, появление способности к окислению воды (т.е. эволюционное возникновение ФС2 и оксигенного фотосинтеза) привело к снижению роли циклического транспорта электронов у этого РЦ. В то же время снижение доступности доноров электронов в виде Mn²⁺-бикарбонатных комплексов, наоборот, могло привести к вовлечению примитивной Φ C1 в акцептирование электронов от участников циклического транспорта электронов пред- Φ C2 (т.е. трансмембранного цитохромного bc₁-комплекса и мобильного белка цитохрома *c*), находящихся в той же самой фотосинтетической мембране. Появление и последующее эволюционное закрепление единой ЭТЦ с участием обеих фотосистем, которая характерна для всех современных оксигенных фотосинтезирующих организмов, способствовали максимальному переключению Φ C2 на использование воды в качестве донора электронов и, соответственно, к повышению продуцирования O_2 .

Присутствие все большего количества О₂ в фотосинтетической мембране оказывало негативное влияние на активность ФС1, поскольку вероятность образования активных форм кислорода около ее РЦ в результате взаимодействия О₂ с кофакторами цепи переноса электронов довольно высокая [44]. Как предполагается, это могло привести к структурным изменениям в архитектуре РЦ ФС1, направленных на снижение вероятности образования активных форм кислорода. В частности, это привело к потере мобильности хиноновых акцепторов и погружению их в белковый матрикс [45], а также к изменению взаимного расположения кофакторов цепи переноса электронов [39, 45], что вполне могло повлиять и на окружение Р₇₀₀ и, как следствие, на механизм его редокс-взаимодействия со вторичными донорами электрона. Более того, в результате дальнейшего совершенствования водоокисляющего комплекса, в частности, вовлечения Ca в структуру Mn-кластера, появления дополнительных белковых субъединиц (внешние белки ФС2), BOвлечения антенных субъединиц в лигандирование Mn-кластера [14], возрастал поток электронов от ФС2 в ЭТЦ, что могло способствовать адаптации донорной стороны ФС1 к максимально эффективному редокс-взаимодействию со вторичным донором электрона, цитохромом с₆. В результате могло произойти эволюционное появление и закрепление гидрофобного сэндвича из двух триптофанов перед Р₇₀₀ и заряженных аминокислот в окружении Р₇₀₀ (см. выше) [36, 37], обеспечивающих правильную ориентацию гема в молекуле цитохрома с₆ относительно Р₇₀₀ и высокую скорость переноса электрона на Р₇₀₀. Однако одновременно с этим подобные адаптации донорной стороны ФС1 практически полностью заблокировали возможность эффективного редокс-взаимодействия между P⁺₇₀₀ и «низкопотенциальными» Mn²⁺-бикарбонатными комплексами, несмотря

на то, что термодинамически подобное взаимодействие возможно.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Госзадания (АААА-А17-117030110136-8).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nelson, N., and Yocum, C. F. (2006) Structure and function of photosystems I and II, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 521-565, doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350.
- Nelson, N. (2013) Evolution of photosystem I and the control of global enthalpy in an oxidizing world, *Photosynth. Res.*, **116**, 145-151, doi: 10.1007/s11120-013-9902-6.
- Caffarri, S., Tibiletti, T., Jennings, R., and Santabarbara, S. (2014) A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **15**, 296-331, doi: 10.2174/ 1389203715666140327102218.
- Blankenship, R. E. (2010) Early evolution of photosynthesis, *Plant Physiol.*, **154**, 434-438, doi: 10.1104/ pp.110.161687.
- Allen, J. P., and Williams, J. C. (1998) Photosynthetic reaction centers, *FEBS Lett.*, **438**, 5-9, doi: 10.1016/ S0014-5793(98)01245-9.
- Hohmann-Marriott, M. F., and Blankenship, R. E. (2011) Evolution of photosynthesis, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 62, 515-548, doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103811.
- Heathcote, P., Jones, M. R., and Fyfe, P. K. (2003) Type I photosynthetic reaction centres: structure and function, *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.*, 358, 231-243, doi: 10.1098/rstb.2002.1178.
- Blankenship, R. E. (1992) Origin and early evolution of photosynthesis, *Photosynth. Res.*, 33, 91-111, doi: 10.1007/BF00039173.
- Lin, X., Murchison, H. A., Nagarajan, V., Parson, W. W., Allen, J. P., and Williams, J. C. (1994) Specific alteration of the oxidation potential of the electron donor in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 10265-10269, doi: 10.1073/pnas.91.22.10265.
- Brettel, K., and Leibl, W. (2001) Electron transfer in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1507**, 100-114, doi: 10.1016/S0005-2728(01)00202-X.
- Semenov, A. Y., Kurashov, V. N., and Mamedov, M. D. (2011) Transmembrane charge transfer in photosynthetic reaction centers: some similarities and distinctions, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **104**, 326-332, doi: 10.1016/ j.jphotobiol.2011.02.004.
- Rappaport, F., Guergova-Kuras, M., Nixon, P. J., Diner, B. A., and Lavergne, J. (2002) Kinetics and pathways of charge recombination in photosystem II, *Biochemistry*, 41, 8518-8527, doi: 10.1021/bi025725p.
- Allakhverdiev, S. I., Tomo, T., Shimada, Y., Kindo, H., Nagao, R., Klimov, V. V., and Mimuro, M. (2010) Redox potential of pheophytin a in photosystem II of two

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.

cyanobacteria having the different special pair chlorophylls, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 3924-3929, doi: 10.1073/ pnas.0913460107.

- 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, doi: 10.1038/nature09913.
- Dismukes, G. C., Klimov, V. V., Baranov, S. V., Kozlov, Y. N., DasGupta, J., and Tyryshkin, A. (2001) The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 2170-2175, doi: 10.1073/pnas.061514798.
- Khorobrykh, A. A., Terentyev, V. V., Zharmukhamedov, S. K., and Klimov, V. V. (2008) Redox interaction of Mnbicarbonate complexes with reaction centres of purple bacteria, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 363, 1245-1251, doi: 10.1098/rstb.2007.2221.
- Terentyev, V. V., Shkuropatov, A. Y., Shkuropatova, V. A., Shuvalov, V. A., and Klimov, V. V. (2011) Investigation of the redox interaction between Mn-bicarbonate complexes and reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R-26, *Chromatium minutissimum*, and *Chloroflexus aurantiacus*, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1360-1366, doi: 10.1134/ S0006297911120091.
- Khorobrykh, A., Dasgupta, J., Kolling, D. R. J., Terentyev, V., Klimov, V. V., and Dismukes, G. C. (2013) Evolutionary origins of the photosynthetic water oxidation cluster: bicarbonate permits Mn²⁺ photo-oxidation by anoxygenic bacterial reaction centers, *Chembiochem*, 14, 1725-1731, doi: 10.1002/cbic.201300355.
- Terentyev, V. V., Khorobrykh, A. A., and Klimov, V. V. (2015) Photooxidation of Mn-bicarbonate complexes by reaction centers of purple bacteria as a possible stage in the evolutionary origin of the water-oxidizing complex of photosystem II, in: *Photosynthesis: New Approaches to the Molecular, Cellular, and Organismal Levels* (Allakhverdiev, S. I., ed.) Scrivener Publishing LLC, pp. 85-132, doi: 10.1002/9781119084150.ch2.
- Kozlov, Y. N., and Kazakova, A. A. (1997) Changes in the redox potential and catalase activity of Mn²⁺ ions during formation of Mn-bicarbonate complexes, *Membr. Cell Biol.*, **11**, 115-120.
- Kozlov, Y. N., Zharmukhamedov, S. K., Tikhonov, K. G., Dasgupta, J., Kazakova, A. A., Dismukes, G. C., and Klimov, V. V. (2004) Oxidation potentials and electron donation to photosystem II of manganese complexes containing bicarbonate and carboxylate ligands, *Phys.*

Chem. Chem. Phys., **6**, 4905-4911, doi: 10.1039/ b406569g.

- Dasgupta, J., Tyryshkin, A. M., Kozlov, Y. N., Klimov, V. V., and Dismukes, G. C. (2006) Carbonate complexation of Mn²⁺ in the aqueous phase: redox behavior and ligand binding modes by electrochemistry and EPR spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 5099-5111, doi: 10.1021/jp055213v.
- Tikhonov, K. G., Zastrizhnaya, O. M., Kozlov, Y. N., and Klimov, V. V. (2006) Composition and catalase-like activity of Mn(II)-bicarbonate complexes, *Biochemistry (Moscow)*, 71, 1270-1277, doi: 10.1134/S0006297906110137.
- Ford, R. C., and Evans, M. C. W. (1983) Isolation of a photosystem II preparation from higher plants with highly enriched oxygen evolution activity, *FEBS Lett.*, 160, 159-164, doi: 10.1016/0014-5793(83)80957-0.
- 25. 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*, **975**, 384-394, doi: 10.1016/S0005-2728(89)80347-0.
- 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*, 1860, 582-590, doi: 10.1016/j.bbabio.2019.06.003.
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: Visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, 14, 33-38, doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- Amunts, A., Toporik, H., Borovikova, A., and Nelson, N. (2010) Structure determination and improved model of plant photosystem I, *J. Biol. Chem.*, 285, 3478-3486, doi: 10.1074/jbc. M109.072645.
- 29. Melis, A. (1989) Spectroscopic methods in photosynthesis: photosystem stoichiometry and chlorophyll antenna size, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **323**, 397-409, doi: 10.1098/rstb. 1989.0019.
- Hu, Q., Miyashita, H., Iwasaki, I., Kurano, N., Miyachi, S., Iwaki, M., and Itoh, S. (1998) A photosystem I reaction center driven by chlorophyll d in oxygenic photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 13319-13323, doi: 10.1073/ pnas.95.22.13319.
- Shuvalov, V. A. (1976) The study of the primary photoprocesses in photosystem I of chloroplasts recombination luminescence, chlorophyll triplet state and triplet-triplet annihilation, *Biochim. Biophys. Acta*, **430**, 113-121, doi: 10.1016/0005-2728(76)90227-9.
- Kozlov, Y. N., Tikhonov, K. G., Zastrizhnaya, O. M., and Klimov, V. V. (2010) pH-Dependence of the composition and stability of MnIII-bicarbonate complexes and its implication for redox interaction of MnII with photosystemII, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 101, 362-366, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2010.08.009.
- Yang, X., Zhang, Y. H., Yang, Z. L., Chen, L. J., He, J. L., and Wang, R. F. (2009) pH dependence of photosynthetic

behavior of plant photosystem I particles, *Russ. J. Plant Physiol.*, **56**, 599-606, doi: 10.1134/S1021443709050033.

- Petrova, A., Mamedov, M., Ivanov, B., Semenov, A., and Kozuleva, M. (2018) Effect of artificial redox mediators on the photoinduced oxygen reduction by photosystem I complexes, *Photosynth. Res.*, **137**, 421-429, doi: 10.1007/ s11120-018-0514-z.
- Semenov, A., Cherepanov, D., and Mamedov, M. (2008) Electrogenic reactions and dielectric properties of photosystem II, *Photosynth. Res.*, **98**, 121-130, doi: 10.1007/ s11120-008-9377-z.
- Sommer, F., Drepper, F., Haehnel, W., and Hippler, M. (2004) The hydrophobic recognition site formed by residues PsaA-Trp 651 and PsaB-Trp 627 of photosystem I in chlamydomonas reinhardtii confers distinct selectivity for binding of blastocyanin and cytochrome *c*6, *J. Biol. Chem.*, **279**, 20009-20017, doi: 10.1074/jbc.M313986200.
- Busch, A., and Hippler, M. (2011) The structure and function of eukaryotic photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, 1807, 864-877, doi: 10.1016/j. bbabio. 2010.09.009.
- Hippler, M., Drepper, F., Farah, J., and Rochaix, J.-D. (1997) Fast electron transfer from cytochrome *c* 6 and plastocyanin to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* requires PsaF, *Biochemistry*, **36**, 6343-6349, doi: 10.1021/bi970082c.
- Gisriel, C., Sarrou, I., Ferlez, B., Golbeck, J. H., Redding, K. E., and Fromme, R. (2017) Structure of a symmetric photosynthetic reaction center-photosystem, *Science*, 357, 1021-1025, doi: 10.1126/science.aan5611.
- 40. Nunn, J. F. (1998) Evolution of the atmosphere, *Proc. Geol. Assoc.*, **109**, 1-13, doi: 10.1016/S0016-7878(98)80001-1.
- Royer, D. L. (2006) CO2-forced climate thresholds during the Phanerozoic, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **70**, 5665-5675, doi: 10.1016/j.gca.2005.11.031.
- Johnson, J. E., Webb, S. M., Thomas, K., Ono, S., Kirschvink, J. L., and Fischer, W. W. (2013) Manganeseoxidizing photosynthesis before the rise of cyanobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **110**, 11238-11243, doi: 10.1073/ pnas.1305530110.
- Okita, P. M., Maynard, J. B., Spiker, E. C., and Force, E. R. (1988) Isotopic evidence for organic matter oxidation by manganese reduction in the formation of stratiform manganese carbonate ore, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 52, 2679-2685, doi: 10.1016/0016-7037(88)90036-1.
- Kozuleva, M. A., and Ivanov, B. N. (2016) The mechanisms of oxygen reduction in the terminal reducing segment of the chloroplast photosynthetic electron transport chain, *Plant Cell Physiol.*, 57, 1397-1404, doi: 10.1093/pcp/pcw035.
- 45. Orf, G. S., Gisriel, C., and Redding, K. E. (2018) Evolution of photosynthetic reaction centers: insights from the structure of the heliobacterial reaction center, *Photosynth. Res.*, **138**, 11-37, doi: 10.1007/s11120-018-0503-2.

EVOLUTIONARY LOSS OF THE ABILITY OF THE PHOTOSYSTEM I PRIMARY ELECTRON DONOR FOR THE REDOX INTERACTION WITH Mn-BICARBONATE COMPLEXES

V. V. Terentyev* and S. K. Zharmukhamedov

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

> Received October 14, 2019 Revised February 21, 2020 Accepted April 3, 2020

The structure and functional organization of the photosystem I (PSI) reaction center (RC) donor side has a significant similarity to the reaction centers of purple bacteria (bRCs), despite the fact that they belong to different types of RCs. Moreover, the redox potential values of their primary electron donors are identical (~0.5 V). In our earlier reports [Khorobrykh et al. (2008) *Phylos. Trans. R. Soc. B.*, **363**, 1245-1251; Terentyev et al. (2011) *Biochemistry* (*Moscow*), **76**, 1360-1366; Khorobrykh et al. (2018) *ChemBioChem*, **14**, 1725-1731], we have demonstrated redox interaction of low-potential Mn^{2+} -bicarbonate complexes with bRCs, which might have been one of the first steps in the evolutionary origin of Mn-cluster of the photosystem II water-oxidizing complex that occurred in the Archean (over 3 billion years ago). In this study, we investigated redox interactions between Mn^{2+} -bicarbonate complexes and PSI. Such interactions were almost absent in the original PSI preparations and emerged only in preoxidized PSI preparations containing ~50% oxidized RCs. The interaction between Mn^{2+} -bicarbonate complexes and PSI required increased Mn^{2+} concentrations, while its dependence on the HCO₃⁻ concentration indicated involvement of electroneutral low-potential [Mn(HCO₃)₂] complex in the process. Analysis of the PSI crystal structure revealed steric hindrances on the RC donor side, which could block the redox interaction between Mn^{2+} -bicarbonate complexes and oxidized primary electron donor. Comparison of structures of RCs from the PSI and ancient RCs from heliobacteria belonging to the same type of RCs suggested that such hindrances should be absent in the primitive PSI in the Archean and allowed to explain their evolutionary origin as a consequence of PSI RCs into the united electron transport chain (ETC) of the photosynthetic membrane that was accompanied by the evolutionary loss of PSI capacity for the redox interaction with Mn^{2+} -bicarbonate complexes.

Keywords: photosynthesis, evolution of photosynthesis, photosystem I, photosynthetic reaction centers, Mn-bicarbonate complexes

УДК 577.151.32

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕН ОСТАТКА ЦИСТЕИНА В СОСТАВЕ МОТИВА GCSAG АКТИВНОГО ЦЕНТРА НА СВОЙСТВА ЭСТЕРАЗЫ PMGL2

© 2020 М.В. Крюкова¹, Л.Е. Петровская^{2*}, К.А. Новотоцкая-Власова³, Е.А. Крюкова², С.А. Якимов², А.Ю. Николаева¹, К.М. Бойко⁴, Д.А. Долгих^{2,5}, М.П. Кирпичников^{2,5}

¹ НИЦ «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

117997 Москва, Россия; электронная почта: lpetr65@yahoo.com

³ Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия

⁴ Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии»

Российской академии наук, 119071 Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия

> Поступила в редакцию 28.02.2020 После доработки 07.04.2020 Принята к публикации 09.04.2020

Эстераза PMGL2, ген которой был обнаружен в результате скрининга метагеномной библиотеки ДНК из вечномерзлого грунта, относится к семейству HSL (гормон-чувствительной липазы млекопитающих). Аминокислотная последовательность PMGL2 характеризуется наличием не описанного ранее варианта консервативного мотива активного центра GXSXG, включающего остаток Cys173 рядом с каталитическим остатком Ser174. С целью выяснения функциональной роли данного остатка цистеина сконструирован ряд мутантных вариантов PMGL2, содержащих в этом положении остатки треонина, аспарагиновой кислоты или серина, и определены их свойства. Удельная активность мутанта С173D по отношению к *n*-нитрофенилбутирату на 60% выше, чем для фермента дикого типа (wtPMGL2), в то время как вариант C173T/C202S продемонстрировал пониженную активность. По отношению к *n*-нитрофенилоктаноату, вариант C173D активнее wtPMGL2 на 15%, тогда как замены C173T/C202S понизили активность на 17%. Для мутанта C173D также характерна высокая активность в области пониженных температур (20-35 °C) при существенной потере термостабильности. Значение k_{cat} для данного белка на 56% выше, чем для исходного фермента, тогда как для варианта C173S, который обнаружил наиболее высокую термостабильность среди исследованных мутантов, она такая же как для фермента дикого типа. Полученные результаты демонстрируют, что замены аминокислотных остатков, соседних с каталитическим остатком серина в составе мотива GXSXG, оказывают существенное влияние на свойства эстеразы PMGL2.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эстераза PMGL2, семейство HSL, мотив GCSAG, мутагенез, термостабильность, пространственная структура.

DOI: 10.31857/S0320972520060081

введение

Липолитические ферменты (липазы и эстеразы; триацил-глицерол-ацилгидролазы) катализируют реакции гидролиза эфиров глицерина и высших карбоновых кислот и широко представлены в царствах животных и растений, а также в бактериях и археях [1, 2]. Липазы микробного происхождения находят применение в различных областях промышленности, включая фармакологическую и пищевую отрасли, производство бытовой химии и тонкий органический синтез [2, 3].

Липолитические ферменты относятся к суперсемейству α/β -гидролаз, характерной особенностью строения которых является наличие центрального (каталитического) домена, имеющего структуру α/β -сэндвича, и каталитической триады, включающей остатки серина (нуклеофил), гистидина и дикарбоновой аминокислоты (Asp/Glu) [4, 5]. Большинство подобных белков содержит также *сар*-домен, расположенный над активным центром и участвующий в связыва-

Принятые сокращения: HSL – гормон-чувствительная липаза млекопитающих, wtPMGL2 – эстераза PMGL2 дикого типа, SOE-PCR (splicing by overlapping extension PCR) – ПЦР с перекрывающимися праймерами, ПЭГ – полиэтиленгликоль.

^{*} Адресат для корреспонденции.

нии субстрата. Структура каталитического домена характеризуется наличием β-слоя, образованного 5–11 (обычно восемью) β-тяжами, фланкированного α-спиралями [2]. Консервативный участок последовательности, содержащий каталитический остаток серина, образует т.н. «нуклеофильный локоть» – γ-поворот с нуклеофилом на вершине. Каталитические остатки дикарбоновой кислоты и гистидина чаще всего расположены в петлях, следующих за тяжами β7 и β8 соответственно.

По классификации, основанной на сходстве аминокислотных последовательностей, липолитические ферменты делятся на несколько семейств, число которых непрерывно растет за счет обнаружения новых белков [6, 7]. Семейство IV (семейство гормон-чувствительных липаз, HSL) объединяет белки, аминокислотные последовательности которых обнаруживают сходство с последовательностью каталитического домена HSL липаз млекопитающих [6, 8]. Характерной особенностью этих ферментов является также наличие консервативного мотива активного центра GXSXG, который включает в себя каталитический остаток серина.

В последние десятилетия развитие метагеномных подходов открыло широкие возможности обнаружения генов новых биокатализаторов, которые ранее были ограничены доступностью геномов микроорганизмов, поддающихся культивированию в лабораторных условиях [9, 10]. В результате было выделено и охарактеризовано значительное количество липолитических ферментов, в том числе относящихся к семейству HSL, из различных местообитаний, включая морские, озерные и арктические отложения, лесные и горные почвы [7, 11].

Ранее нами были проведены конструирование и функциональный скрининг метагеном-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для конструирования генов мутантных вариантов эстеразы PMGL2

Обозначение	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'
C173Tfor	CTTCGGCACCTCGGCGG
C173Trev	CGCCGAGGTGCCGAAGATG
C202Sfor	GCACCCTGAGCGGCACC
C202Srev	GTGCCGCTCAGGGTGCC
C173Sfor	CTTCGGCTCCTCGGCGG
C173Srev	CGCCGAGGAGCCGAAGATG
C173Dfor	CTTCGGCGACTCGGCGG
C173Drev	CGCCGAGTCGCCGAAGATG

ной библиотеки ДНК из вечномерзлых грунтов, что позволило обнаружить ряд генов, кодирующих потенциальные липолитические ферменты семейства HSL [12, 13]. Установлено, что каталитический остаток серина одного из таких ферментов – эстеразы PMGL2 находится в составе последовательности GCSAG, которая является новым, ранее не описанным вариантом консервативного мотива GXSXG. Были получены рекомбинантный белок PMGL2 и определены его биохимические свойства [12] и пространственная структура [14], а также точечный мутант C173T/C202S, содержащий остаток треонина вместо остатка цистеина из мотива GCSAG [14]. В данной работе с целью получения дополнительных данных о функциональной роли остатка Cys173 был сконструирован ряд новых точечных мутантов эстеразы PMGL2 и определены их биохимические свойства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали реактивы фирм «Bio-Rad» (США), «Merck» (США), «Panreac» (Испания), субстраты для определения липолитической активности «Sigma» (США), органические растворители производства «Химмед» (Россия). Растворы готовили на деионизованной воде MilliQ.

Для множественного выравнивания аминокислотных последовательностей использовали алгоритм ClustalOmega [15].

Клонирование рекомбинантных ДНК осуществляли стандартными методами в клетках *Escherichia coli* XL-1 Blue («Stratagene»). Использовали ферменты производства «Thermo Fisher Scientific» (США). Олигонуклеотиды были синтезированы в «Евроген» (Россия). Ген мутантного варианта C173T/C202S был получен нами ранее [14]. Для конструирования мутантов использовали двухступенчатый SOE-PCR с праймерами, приведенными в табл. 1. Мутантные гены клонировали в вектор pET32a («Novagen», США), как и ген исходного белка, и подтверждали последовательность секвенированием («Евроген»).

Выделение рекомбинантных белков, определение липолитической активности и стабильности проводили как описано ранее [12]. Измерение липолитической активности осуществляли спектрофотометрическим методом после инкубации белка (1 мкг/мл) с 0,25 mM *n*-нитрофенилбутиратом (С4) в буфере 50 mM CHES-NaOH, pH 8,5, 100 mM NaCl в течение 15 мин при 45 °C. Реакцию останавливали добавлением SDS до 2%. Светопоглощение при 415 нм изме-

ряли с помощью планшетного ридера Model 680 («Bio-Rad»).

Кинетические параметры реакции определяли, варьируя концентрацию субстрата в диапазоне 0,3–2,1 мМ. Реакцию проводили в течение 1 мин, концентрация фермента в реакционной смеси составляла 3 мкг/мл. Значения $K_{\rm m}$ и $V_{\rm max}$ оценивали методом нелинейной регрессии с помощью программы Origin 8 с использованием уравнения Михаэлиса–Ментен.

Аналитическую гель-фильтрацию проводили на колонке Superdex 75 10/300 GL («GE Healthcare») при скорости потока 0,4 мл/мин в буфере 100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl. Детекцию белка осуществляли по светопоглощению при 230 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование мутантных вариантов PMGL2. В результате сравнения аминокислотных

последовательностей липолитических ферментов семейства HSL, гомологичных wtPMGL2, было установлено, что в положении N-1 по отношению к каталитическому остатку Ser174 чаще всего обнаруживается один из следующих остатков — треонин, серин или аспартат (рис. 1, a). Соответственно нами были получены и исследованы три точечных мутанта PMGL2 C173T/C202S, C173S и C173D. Мутагенез остатка Cys202 при получении первого мутанта был проведен с целью предотвращения его участия в замыкании межмолекулярных дисульфидных связей, однако в результате исследований пространственной структуры показано, что боковая цепь этого остатка направлена внутрь белковой глобулы и практически недоступна для растворителя [12, 14]. Гены мутантных вариантов PMGL2 были сконструированы с помощью ПЦР и клонированы в вектор рЕТ32а под контролем промотора T7lac аналогично гену *PMGL2* дикого типа. Экспрессию полученных генов и выделение мутантных белков проводили соглас-



Рис. 1. Получение и свойства мутантных вариантов PMGL2. *a* – Выравнивание аминокислотных последовательностей эстераз семейства HSL, содержащих различные варианты мотива GXSXG, с помощью ClustalOmega. Показан участок 152–191 (нумерация wtPMGL2), содержащий каталитический остаток серина (обозначен черным кружком). 4Q3O – эстераза MGS-MT1 [16]; 4Q05 – эстераза E25 [17]; 3K6K – эстераза EstE7; δ – электрофорез в 13%-ном SDS-ПААГ по Лэммли очищенного белка wtPMGL2 (дорожка *1*) и мутантов C173T/C202S (дорожка *2*), C173S (дорожка *3*), C173D (дорожка *4*). М – маркеры мол. массы (кДа); *в* – гель-фильтрационный анализ wtPMGL2 и мутантных вариантов на колонке Superdex 75. Расчетная мол. масса PMGL2 составляет 37,5 кДа, время выхода с колонки 23,8 мин. Штриховыми линиями обозначены время выходов бычьего сывороточного альбумина (24,3 мин, мол. масса 66,5 кДа) и овальбумина (27,4 мин, 43 кДа). Данные гель-фильтрационного анализа wtPMGL2 и мутанта C173T/C202S взяты из ранней публикации [14]. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/ journal/biokhsm/)



Рис. 2. Специфичность PMGL2 и его мутантов по отношению к субстратам. Реакцию проводили в стандартных условиях с субстратами с разной длиной углеводородной цепи (C4, C8). Активность wtPMGL2 по отношению к *n*-нитрофенилбутирату принята за 100%. Представлены средние значения из трех повторностей \pm стандартное отклонение

но протоколу, описанному для wtPMGL2 [12]. С помощью белкового электрофореза в присутствии SDS показано, что все мутантные белки демонстрируют высокую чистоту и электрофоретическую подвижность, соответствующую расчетной мол. массе (рис. 1, δ).

Монодисперсность выделенных белков была подтверждена с помощью аналитической гельфильтрации на предварительно откалиброванной колонке Superdex 75 (рис. 1, *в*). Установлено, что время выхода с колонки мутантных вариантов PMGL2 составляет 23,8 мин, что соответствует димерной форме аналогично исходному белку [14]. Липолитическая активность мутантных вариантов PMGL2. Ранее нами было установлено, что максимальный уровень липолитической активности PMGL2 наблюдается при 45 °C с использованием *n*-нитрофенилбутирата (C4) в качестве субстрата [12]. Измерения липолитической активности мутантных вариантов PMGL2 проводили в данных условиях. Удельная активность варианта C173D превысила удельную активность PMGL2 на 60% и составила 3200 ед/мг, в то время как вариант C173T/C202S продемонстрировал пониженную активность (60% от активности PMGL2, 1215 ед/мг). Белок C173S обладал удельной активностью, сопоставимой с исходным ферментом (2330 ед/мг).

Исследование субстратной специфичности полученных мутантов показало, что, как и для PMGL2, предпочтительным субстратом для них является *n*-нитрофенилбутират (C4) (рис. 2). По сравнению с PMGL2, вариант C173D продемонстрировал увеличенную на 15% активность по отношению к *n*-нитрофенилоктаноату (C8), в то же время активность мутанта C173T/C202S, напротив, была на 17% снижена. Активность исследованных белков по отношению к субстратам большей длины (C10, C12, C16) оказалась незначительной.

Для определения температурной зависимости липолитической активности мутантных вариантов PMGL2 реакцию проводили с использованием *n*-нитрофенилбутирата (C4) в качестве субстрата в диапазоне температур 5–60 °С (рис. 3, *a*). Температурный оптимум активности мутантных белков составил 45 °С, как и у дикого типа. Для всех вариантов наблюдалось резкое падение активности при повышении температу-



Рис. 3. a – Зависимость активности PMGL2 и мутантных вариантов от температуры. Ферменты инкубировали в реакционной смеси, содержавшей 50 мМ CHES-NaOH, pH 8,5, 100 мМ NaCl и 0,25 мМ C4 в течение 15 мин при указанной температуре; δ – сравнение относительной активности PMGL2 и мутантных вариантов при 20, 30, 40 и 50 °C. Активность при 45 °C принята за 100%. Представлены средние значения трех опытов ± стандартное отклонение

ры реакционной смеси до 60 °С. При температуре 55 °С активность PMGL2 и С173S оставалась достаточно высокой (75 и 78% от максимальной), в то время как активность мутантов C173T/C202S и C173D существенно снижалась и составляла 31 и 9,5% соответственно. По сравнению с белком дикого типа и другими мутантами, вариант C173D показал наибольшую активность в области пониженных температур (20-35 °C). Так, его активность при 20 °C составила 68% от максимальной, тогда как для wtPMGL2 – лишь 44% (рис. 3, б). Более высокую активность в этой области, по сравнению с исходным ферментом (52% от максимальной), имел также вариант C173S.

Термостабильность мутантных вариантов PMGL2. В предыдущей работе нами было показано, что wtPMGL2 обладает относительно высокой термостабильностью и выдерживает инкубацию в течение 1 ч при 45 °С без существенной потери активности [12]. Остаточная активность этого фермента после инкубации в течение 1 ч при 40 °С составила 85,5% от исходной, а при 50 °C - 75% (рис. 4). Аналогичные эксперименты, проведенные для мутантных вариантов, продемонстрировали, что они обладают пониженной стабильностью по сравнению с исходным ферментом. Активность мутанта С173Т/ C202S в результате инкубации при 40 °С уменьшалась до 68% от исходной, а при 50 °C – до 51%. Наиболее стабильным оказался мутант C173S, сохранявший после прогрева 67 и 66% активности соответственно. Существенное снижение термостабильности обнаружил вариант С173D. После прогрева при 40 °С он сохранил 61% активности, а после инкубации при 50 °C – всего лишь 34%.

Кинетические параметры реакции мутантных вариантов PMGL2. Как видно из табл. 2, по величине *K*_m мутантный вариант C173S похож на



Рис. 4. Анализ температурной стабильности мутантных вариантов PMGL2. Белки инкубировали в реакционной смеси без субстрата при 30, 40 и 50 °С в течение 1 ч, остаточную активность измеряли в стандартных условиях с 0,25 мМ С4. Активность до прогрева принимали за 100%. Представлены средние значения трех экспериментов \pm стандартное отклонение

фермент дикого типа, в то время как для мутанта С173D K_m выше в 1,3 раза, а для мутанта С173T/C202S – в 1,7 раза [14]. По «числу оборотов» (k_{cat}) мутант С173S похож на фермент дикого типа, а для C173T/C202S и C173D этот параметр выше в 1,3 и 1,6 раза соответственно. Увеличение K_m привело к уменьшению каталитиэффективности (k_{cat}/K_m) варианта ческой C173T/C202S на 24%, что отразилось в наблюдаемом понижении удельной активности данного белка, измеренной при ненасыщающей концентрации субстрата (0,25 мМ). Каталитическая эффективность варианта C173S примерно такая же как для wtPMGL2, а для варианта C173D она в 1,2 раза выше (табл. 2).

_	Численное значение					
Параметр	wtPMGL2	C173T/C202S	C173S	C173D		
<i>K</i> _m , мМ	$1,\!13\pm0,\!10$	$1,88\pm0,06$	$1,03\pm0,05$	$1,\!45\pm0,\!07$		
$k_{\rm cat},{ m c}^{-1}$	38 ± 1	48 ± 1	36 ± 0,6	59 ± 1		
$k_{\rm cat}/K_{\rm m},{ m c}^{-1}/{ m M}{ m M}^{-1}*$	33 (100%)	25 (76%)	35 (106%)	41 (124%)		

	Таблица 2. Кинетические пат	раметры реакции wtPMGL2	2 и мутантных вариантов
--	-----------------------------	-------------------------	-------------------------

* В скобках приведен процент по отношению к величине k_{cat}/K_m для wtPMGL2. Измерения проводили в буфере 50 мМ CHES-NaOH, pH 8,5, 100 мМ NaCl при 45 °C с использованием *n*-нитрофенилбутирата (C4) в качестве субстрата в диапазоне концентраций 0,3-2,1 мМ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сайт-направленный мутагенез аминокислотных остатков, расположенных рядом с остатками, образующими каталитическую триаду, широко используется в белковой инженерии липолитических ферментов, в том числе относящихся к семейству HSL, с целью повышения их термостабильности, изменения субстратной специфичности и энантиоселективности [18, 19]. Так, замена в молекуле эстеразы PsyEst из психрофильной бактерии Psychrobacter sp. Ant300 остатка глицина, расположенного в петле по соседству с активным центром, на остаток пролина привела к значительному увеличению времени полуинактивации фермента [20]. Мутантный вариант эстеразы E. coli R48S отличался от исходного белка повышенной каталитической эффективностью (величина k_{cat} возросла в три раза), а также более высокой термостабильностью [21]. Замены остатков Met211 и Arg215, находящихся в участке связывания субстрата термофильной эстеразы 2 Alicyclobacillus acidocaldarius, существенно увеличивали эффективность расщепления длинноцепочечных субстратов [22]. Аналогичный эффект наблюдался в результате мутагенеза эстеразы *Thermogutta terrifontis* [23], холодоактивной липазы *Salinisphaera* sp. P7-4 [24] и липазы MgMDL2 *Malassezia globosa* [25].

В настоящей работе впервые исследовано влияние замен аминокислотных остатков, являчастью консервативного юшихся мотива GXSXG, на свойства эстеразы PMGL2, относящейся к семейству HSL. Классическим вариантом данного мотива считается GDSAG, который обнаруживается в последовательностях большинства микробных липолитических ферментов данного семейства. Недавно в последовательностях ряда эстераз, полученных в результате скрининга метагеномной библиотеки ДНК из литоральных отложений, был обнаружен новый вариант этого мотива GTSAG, что послужило основанием для выделения содержащих его белков в отдельное подсемейство [26]. В результате выравнивания последовательностей липолитических ферментов, относящихся к семейству HSL, установлено, что в положении N-1, где N обозначает нуклеофил (остаток серина), могут находиться остатки Asp (Glu), Thr, Ser, Cys [17]. Для уточнения роли остатка цистеина в данном положении на свойства липолитических фер-



Рис. 5. Наложение пространственных структур wtPMGL2 (PDB 6QIN) и mPMGL2 (PDB 6QLA), выполненное с помощью программы COOT [32]. Показаны аминокислотные остатки, входящие в каталитическую триаду (подчеркнуты) и образующие участок связывания субстрата. Темно-серым цветом обозначены боковые цепи остатков, относящихся к wtPMGL2, а также молекула ПЭГ в структуре мутантной формы фермента. Для остатка Tyr208 в структуре wtPMGL2 приведены два положения боковой цепи, наблюдаемые в кристаллической структуре

ментов семейства HSL ранее мы сконструировали мутант C173T/C202S [14]. В данной работе были дополнительно получены и охарактеризованы мутанты C173S и C173D. Были определены субстратная специфичность, температурный оптимум, термостабильность мутантных вариантов, а также кинетические параметры катализируемой ими реакции.

Установлено, что мутант C173S по удельной активность, температурному профилю активности и термостабильности и кинетическим константам очень похож на исходный белок. Мутантный вариант C173D проявил повышенную на 15% активность по *п*-нитрофенилоктаноату и повышенную активность по *n*-нитрофенилбутирату в температурном диапазоне 20-35 °C, а также существенное снижение термостабильности по сравнению с диким типом и другими мутантами. График температурной зависимости эстеразной активности C173D приобрел более «сглаженный» вид (рис. 3), что ранее было продемонстрировано нами для некоторых липолитических ферментов психротрофной бактерии Psychrobacter cryohalolentis K5^т [27—29]. Для данного варианта значение k_{cat} оказалось на 56%, а значение $K_{\rm m}$ – на 30 % выше, чем соответствующие параметры wtPMGL2. Повышение каталитической константы k_{cat} ферментов является одной из адаптивных стратегий, направленных на нейтрализацию негативного воздействия низких температур у приспособленных к холодным местообитаниям организмов. Также холодоактивные ферменты достаточно часто демонстрируют более высокие значения К_т по сравнению с гомологами из мезофильных организмов [30]. Таким образом, свойства мутанта C173D оказались приближенными к свойствам холодоактивных ферментов [30, 31].

В данной работе была обнаружена пониженные удельная активность и термостабильность мутантного варианта C173T/C202S. Ранее нами

было показано, что для этого мутанта характерно более высокое значение константы Михаэлиса по сравнению с белком дикого типа [14]. Каталитическая эффективность данного мутанта оказалась сниженной на 24%. Сравнение пространственных структур активного центра wtPMGL2 и мутанта C173T/C202S не обнаружило существенных различий между ними за исключением присутствия в активном центре мутанта молекулы ПЭГ, входившей в состав кристаллизационной смеси [14]. Наблюдаемые различия в конформациях некоторых остатков, например, Phe273 и Tyr208, по-видимому, связаны с присутствием молекулы ПЭГ в участке связывания субстрата мутантной формы (рис. 5). Можно предположить, что причиной изменения каталитических характеристик варианта C173T/C202S является различная конформационная подвижность остатков, образующих субстрат-связывающий «карман» белка дикого типа и мутантной формы.

Таким образом, в результате проведенной работы показано, что замены аминокислотных остатков, входящих в состав консервативного мотива GXSXG, приводят к изменению свойств PMGL2 и, возможно, других липолитических ферментов семейства HSL. Полученные данные могут быть использованы для дальнейшей оптимизации каталитических характеристик PMGL2, а также других ферментов, относящих-ся к данному семейству.

Финансирование. Работу проводили при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-04-00491 и Программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., and Marty, A. (2012) in *Lipases and Phospholipases* (Sandoval, G. ed.), Humana Press, pp. 3-30, doi: 10.1007/ 978-1-61779-600-5 1.
- Gaur, R., Hemamalini, R., and Khare, S. (2017) in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (Pandey, A. N. S., and Soccol, C. R., eds) Elsevier, pp. 175-198, doi: 10.1016/B978-0-444-63662-1.00008-7.
- Romano, D., Bonomi, F., Mattos, M. C., Fonseca, T. D., Oliveira, M. D. F., and Molinari, F. (2015) Esterases as stereoselective biocatalysts, *Biotechnol. Adv.*, 33, 547-565, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.006.

 Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., and Schrag, J. (1992) The α/β hydrolase fold, *Protein Eng.*, 5, 197-211, doi: 10.1093/protein/5.3.197.
 Nardini, M., and Dijkstra, B. W. (1999) α/β Hydrolase fold

- Nardini, M., and Dijkstra, B. W. (1999) α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9, 732-737, doi: 10.1016/S0959-440X(99)00037-8.
- 6. Arpigny, J., and Jaeger, K. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties, *Biochem. J.*, **343**, 177-183, doi: 10.1042/bj3430177.
- 7. Ferrer, M., Bargiela, R., Martínez-Martínez, M., Mir, J., Koch, R., Golyshina, O. V., and Golyshin, P. N. (2015) Biodiversity for biocatalysis: a review of the α/β -hydrolase

fold superfamily of esterases-lipases discovered in metagenomes, *Biocat. Biotrans.*, **33**, 235-249, doi: 10.3109/10242422.2016.1151416.

- Kim, T. D. (2017) Bacterial hormone-sensitive lipases (bHSLs): Emerging enzymes for biotechnological applications, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 1907-1915, doi: 10.4014/jmb.1708.08004.
- Mirete, S., Morgante, V., and González-Pastor, J. E. (2016) Functional metagenomics of extreme environments, *Curr. Opin. Biotech.*, 38, 143-149, doi: 10.1016/ j.copbio.2016.01.017.
- Handelsman, J. (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68, 669-685, doi: 10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004.
- López-López, O., Cerdán, M. E., and Siso, M. I. G. (2014) New extremophilic lipases and esterases from metagenomics, *Curr. Prot. Pept. Sci.*, **15**, 445-455, doi: 10.2174/1389203715666140228153801.
- Petrovskaya, L. E., Novototskaya-Vlasova, K. A., Spirina, E. V., Durdenko, E. V., Lomakina, G. Y., Zavialova, M. G., Nikolaev, E. N., and Rivkina, E. M. (2016) Expression and characterization of a new esterase with GCSAG motif from a permafrost metagenomic library, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **92**, fiw046, doi: 10.1093/ femsec/fiw046.
- Petrovskaya, L. E., Novototskaya-Vlasova, K. A., Gapizov, S. S., Spirina, E. V., Durdenko, E. V., and Rivkina, E. M. (2017) New member of the hormone-sensitive lipase family from the permafrost microbial community, *Bioengineered*, 8, 420-423, doi: 10.1080/21655979.2016. 1230571.
- Boyko, K. M., Kryukova, M. V., Petrovskaya, L. E., Nikolaeva, A. Y., Korzhenevsky, D. A., Novototskaya-Vlasova, K. A., Rivkina, E. M., Dolgikh, D. A., Kirpichnikov, M. P., and Popov, V. O. (2020) Crystal structure of PMGL2 esterase from the hormone-sensitive lipase family with GCSAG motif around the catalytic serine, *PLoS One*, **15**, e0226838, doi: 10.1371/journal.pone. 0226838.
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., and Lopez, R. (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019, *Nucleic Acids Res.*, 47, W636-W641, doi: 10.1093/ nar/gkz268.
- Alcaide, M., Stogios, P. J., Lafraya, B., Tchigvintsev, A., Flick, R., Bargiela, R., Chernikova, T. N., Reva, O. N., Hai, T., Leggewie, C. C., Katzke, N., La Cono, V., Matesanz, R., Jebbar, M., Jaeger, K.-E., Yakimov, M. M., Yakunin, A. F., Golyshin, P. N., Golyshina, O. V., Savchenko, A., Ferrer, M., and Consortium, T. M. (2015) Pressure adaptation is linked to thermal adaptation in saltsaturated marine habitats, *Environ. Microbiol.*, **17**, 332-345, doi: 10.1111/1462-2920.12660.
- Li, P. Y., Ji, P., Li, C. Y., Zhang, Y., Wang, G. L., Zhang, X. Y., Xie, B. B., Qin, Q. L., Chen, X. L., Zhou, B. C., and Zhang, Y. Z. (2014) Structural basis for dimerization and catalysis of a novel esterase from the GTSAG motif subfamily of the bacterial hormone-sensitive lipase family, *J. Biol. Chem.*, 289, 19031-19041, doi: 10.1074/jbc.M114. 574913.
- Kourist, R., Brundiek, H., and Bornscheuer, U. T. (2010) Protein engineering and discovery of lipases, *Europ. J. Lipid Sci. Technol.*, **112**, 64-74, doi: 10.1002/ejlt. 200900143.

- Jochens, H., Hesseler, M., Stiba, K., Padhi, S. K., Kazlauskas, R. J., and Bornscheuer, U. T. (2011) Protein engineering of alpha/beta-hydrolase fold enzymes, *Chembiochem*, 12, 1508-1517, doi: 10.1002/cbic.201000771.
- Kulakova, L., Galkin, A., Nakayama, T., Nishino, T., and Esaki, N. (2004) Cold-active esterase from *Psychrobacter* sp. Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of Gly→Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability, *Biochim. Biophys. Acta*, 1696, 59-65, doi: 10.1016/j.bbapap.2003.09.008.
- Kobayashi, R., Hirano, N., Kanaya, S., Saito, I., and Haruki, M. (2010) Enhancement of the enzymatic activity of *Escherichia coli* acetyl esterase by random mutagenesis, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **67**, 155-161, doi: 10.1016/ j.molcatb.2010.08.003.
- Manco, G., Mandrich, L., and Rossi, M. (2001) Residues at the active site of the esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius* involved in substrate specificity and catalytic activity at high temperature, *J. Biol. Chem.*, **276**, 37482-37490, doi: 10.1074/jbc.M103017200.
- Sayer, C., Isupov, M. N., Bonch-Osmolovskaya, E., and Littlechild, J. A. (2015) Structural studies of a thermophilic esterase from a new *Planctomycetes* species, *Thermogutta terrifontis*, *FEBS J.*, **282**, 2846-2857, doi: 10.1111/ febs.13326.
- 24. Kim, B. Y., Yoo, W., Huong Luu Le, L. T., Kim, K. K., Kim, H. W., Lee, J. H., Kim, Y. O., and Kim, T. D. (2019) Characterization and mutation anaylsis of a cold-active bacterial hormone-sensitive lipase from *Salinisphaera* sp. P7-4, *Arch. Biochem. Biophys.*, 663, 132-142, doi: 10.1016/ j.abb.2019.01.010.
- Lan, D., Xu, H., Xu, J., Dubin, G., Liu, J., Khan, F. I., and Wang, Y. (2017) *Malassezia globosa* MgMDL2 lipase: Crystal structure and rational modification of substrate specificity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 488, 259-265, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.103.
- Jeon, J. H., Lee, H. S., Kim, J. T., Kim, S. J., Choi, S. H., Kang, S. G., and Lee, J. H. (2012) Identification of a new subfamily of salt-tolerant esterases from a metagenomic library of tidal flat sediment, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93, 623-631, doi: 10.1007/s00253-011-3433-x.
- Novototskaya-Vlasova, K., Petrovskaya, L., Yakimov, S., and Gilichinsky, D. (2012) Cloning, purification, and characterization of a cold adapted esterase produced by *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T from Siberian cryopeg, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 82, 367-375, doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01385. x.
- Novototskaya-Vlasova, K., Petrovskaya, L., Kryukova, E., Rivkina, E., Dolgikh, D., and Kirpichnikov, M. (2013) Expression and chaperone-assisted refolding of a new coldactive lipase from *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T, *Protein Expr. Purif.*, **91**, 96-103, doi: 10.1016/j.pep.2013.07.011.
- Novototskaya-Vlasova, K., Petrovskaya, L., Rivkina, E., Dolgikh, D., and Kirpichnikov, M. (2013) Characterization of a cold-active lipase from *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T and its deletion mutants, *Biochemistry (Moscow)*, 78, 385-394, doi: 10.1134/S000629791304007X.
- Siddiqui, K. S., and Cavicchioli, R. (2006) Cold-adapted enzymes, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 403-433, doi: 10.1146/ annurev.biochem.75.103004.142723.
- 31. Feller, G., and Gerday, C. (2003) Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation, *Nat. Rev. Microbiol.*, **1**, 200-208, doi: 10.1038/nrmicro773.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: Model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 60, 2126-2132, doi: 10.1107/S0907444904019158.

THE INFLUENCE OF SUBSTITUTIONS OF THE CYSTEINE RESIDUE IN GCSAG MOTIF OF THE ACTIVE CENTER ON THE PROPERTIES OF THE PMGL2 ESTERASE

M. V. Kryukova¹, L. E. Petrovskaya^{2*}, K. A. Novototskaya-Vlasova³, E. A. Kryukova², S. A. Yakimov², A. Y. Nikolaeva¹, K. M. Boyko⁴, D. A. Dolgikh^{2,5}, and M. P. Kirpichnikov^{2,5}

¹ Kurchatov Complex of NBICS-Technologies, National Research Centre "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia ² Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,

117997 Moscow, Russia; E-mail: lpetr65@yahoo.com

³ Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

⁴ Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

⁵ Lomonosov Moscow State University, Department of Biology, 119991 Moscow, Russia

Receive February 28, 2020 Revised April 7, 2020 Accepted April 9, 2020

The gene coding for PMGL2 esterase, which belongs to the family of mammalian hormone-sensitive lipases (HSLs), was discovered by screening a metagenomic DNA library from a permafrost soil. The active site of PMGL2 contains conserved GXSXG motif which includes Cys173 residue next to the catalytic Ser174. In order to clarify the functional role of the cysteine residue in the GCSAG motif, we constructed a number of PMGL2 mutants with Cys173 substitutions and studied their properties. The specific activity of the C173D mutant exceeded the specific activity of the wild-type enzyme (wtPMGL2) by 60%, while the C173T/C202S mutant displayed reduced catalytic activity. The activity of the C173D mutant with *p*-nitrophenyl octanoate was 15% higher, while the activity of the C173T/C202S mutant was 17% lower compared to wtPMGL2. The C173D mutant was also characterized by a high activity at low temperatures (20-35°C) and significant loss of thermal stability. The k_{cat} value for this protein was 56% higher than for the wild-type enzyme. The catalytic constants of the C173S mutant were close to those of wtPMGL2; this enzyme also demonstrated the highest thermal stability among the studied mutants. The obtained results demonstrate that substitutions of amino acid residues adjacent to the catalytic serine residue in the GXSXG motif can have a significant effect on the properties of PMGL2 esterase.

Keywords: PMGL2 esterase, HSL family, GCSAG motif, mutagenesis, thermal stability, three-dimensional structure

УДК 577.152.321:577.114.4:57.083.13

СОЗДАНИЕ ПРОДУЦЕНТА ХИТИНАЗЫ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЕЁ ПРЕПАРАТА ДЛЯ РАЗРУШЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

© 2020 О.А. Синицына^{1*}, Е.А. Рубцова², И.Г. Синельников², Д.О. Осипов², А.М. Рожкова², В.Ю. Матыс³, Т.В. Бубнова³, В.А. Немашкалов³, А.С. Середа⁴, Л.А. Щербакова⁵, А.П. Синицын^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная noчта: oasinitsyna@gmail.com

² ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия

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

> ⁴ ВНИИ пищевой биотехнологии филиала ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи, 111033 Москва, Россия

⁵ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, 143050 Большие Вязёмы Московской обл., Россия

> Поступила в редакцию 16.04.2020 После доработки 18.04.2020 Принята к публикации 18.04.2020

На основе гриба *Penicillium verruculosum* создан рекомбинантный штамм, комплекс внеклеточных ферментов которого содержит хитиназу *Myceliophtora thermophila*. Активность ферментных препаратов, полученных из культуральной жидкости штамма-продуцента, достигала 0,55, 0,53 и 0,66 ед/мг белка по хитину и хитозанам с мол. массой 200 и 1000 кДа соответственно. Оптимумы температуры и pH рекомбинантной хитиназы составили 52–65 °C и pH 4,5–6,2, что соответствует литературным данным для ферментов этого класса. Содержание гетерологичной хитиназы в исследованных ферментных препаратах составило 47% от общего содержания белка в культуральной жидкости. Показано, что новые ферментные препараты, полученные на основе рекомбинантного штамма *Penicillium verruculosum* XT403 и содержащие гетерологичную хитиназу, способны разрушать мицелий микроскопических, в том числе фитопатогенных грибов, и весьма эффективны в процессах биоконверсии отходов микробиологической промышленности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хитиназа, хитин, хитозан, *Penicillium verruculosum*, фитопатогенные грибы, биоконверсия отходов.

DOI: 10.31857/S0320972520060093

введение

Хитиназа (ХТ, эндо-1,4- β -поли-N-ацетилглюкозаминидаза) является ключевым ферментом, ответственным за деструкцию хитина и хитозана (линейных гомополимеров 1,4- β -N-ацетил-D-глюкозамина). ХТ эффективно расщепляет гликозидные связи хитина и хитозана вблизи остатков N-ацетилглюкозамина (через один углеводный остаток), поэтому её активность сильно зависит от степени деацетилирования (СД) субстрата [1].

В настоящее время в биотехнологии существует ряд направлений, в которых используются хитинолитические ферменты. В последнее время интенсивно разрабатываются подходы к применению этих ферментов для биохимической трансформации хитина в биологически активные хитоолигосахариды, обладающие противомикробной (антигрибной и антибактериальной), элиситорной, ростостимулирующей, противоопухолевой и противовоспалительной активностями [1-4]. Кроме того, сами мономеры хитина — *N*-ацетилглюкозамин и *D*-глюкозамин - также являются физиологически активными веществами [5–7]. Другое современное направление использования хитиназ - это конверсия отходов хитин-содержащего сырья в микробную и дрожжевую биомассу, белок и биотопливо [8-11]. Хитиназы играют ключевую

Принятые сокращения: XT – хитиназа, ФП – ферментный препарат, КЖ – культуральная жидкость, СД – степень деацетилирования, ЦБГІ – целлобиогидролаза I, ЭГ – эндоглюканаза, КСИЛ – ксиланаза.

^{*} Адресат для корреспонденции.

роль в комплексе гидролаз, лизирующих клеточную стенку грибов, и являются эффективным инструментом для выделения протопластов грибных клеток [12, 13].

Хитинолитические ферменты имеют фунгицидную, инсектицидную и антипаразитарную (нематицидную) активности и привлекательны с практической точки зрения для использования их в качестве биопестицидов, которые могли бы заменить химические пестициды, массово используемые как в открытом грунте, так и в парниках [4]. Во всех этих случаях функция ферментов заключается в разрушении хитина, входящего в состав клеточной стенки или структурных элементов микроорганизмов, экзоскелета насекомых и оболочки яиц паразитов. Важную роль хитинолитические ферменты играют как антимикробные агенты при борьбе с грибной и бактериальной контаминацией пищевых и сельскохозяйственных продуктов [14].

Мицелиальные грибы занимают лидирующую позицию в качестве объектов биотехнологического производства благодаря высокой продуктивности при культивировании на дешевых производственных средах и способности к синтезу широкого круга ферментов и таких метаболитов, как антибиотики, витамины и органические кислоты. Однако в процессе ферментации в качестве отхода образуется большое количество грибного мицелия - например, в результате производства лимонной кислоты с помощью штамма Aspergillus niger в мире образуется до 0,34 млн т мицелия в год [15]. Грибная биомасса не подлежит длительному хранению и служит источником загрязнения окружающей среды; наиболее распространенным способом её утилизации является сжигание [3, 16]. Хитин является структурно важным компонентом грибной клеточной стенки, его содержание различно у грибов разных таксонов и составляет в зависимости от систематического положения организма и условий культивирования от 0,2 до 26% от сухой массы [17]. Весьма перспективным представляется способ ферментативной деструкции полисахаридов клеточной стенки мицелиальных грибов, в первую очередь хитина, который позволяет осуществить экологически и экономически оправданный процесс переработки биомассы грибного мицелия как отхода микробиологической промышленности с получением биологически ценных компонентов в легкоусвояемой форме [18].

Вышесказанное делает очевидным необходимость создания высокоактивных штаммовпродуцентов, которые позволят осуществить промышленное производство хитинолитических ферментов. Целью работы является создание продуцента XT на основе реципиентного штамма *Penicillium verruculosum* 537 ($\Delta niaD$), обладающего высокой секреторной способностью (до 50–60 г/л внеклеточного белка), в котором редуцирована репрессия катаболизма глюкозы [19–21], и использование полученного ферментного препарата ($\Phi\Pi$) для разрушения клеточной стенки микроскопических грибов. В качестве кандидата на клонирование была выбрана хитиназа *Myceliophtora thermophyla* (ранее *Chrysosporium lucknowense*), поскольку известно, что ферменты этого аскомицета обладают широким pH- и температурным оптимумом активности, что существенно облегчает их практическое применение [22, 23].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Для приготовления ПААГ-гелей и буферных растворов использовали реагенты фирмы «Bio-Rad» (США), «MP Biochemicals Inc.» (Франция), «Ferak» (Германия) и «Реахим» (Россия). ПААГ-гели окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250B, а в качестве маркёров для определения мол. массы белков использовали набор MW-SDS 200 (10–200 кДа) («ThermoScientific», США). В качестве калибровочного стандарта при определении концентрации белков в растворе методом Лоури и др. использовали БСА («БелНИИЭМ», Белоруссия).

Субстраты. В качестве субстратов при определении ферментативных активностей использовали натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), берёзовый ксилан («Sigma-Aldrich», США) и микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) («МКЦ Центр», Россия). Хитозан с мол. массой 1000 кДа и СД 85%, хитозан с мол. массой 200 кДа и СД 87%, а также коллоидный хитин из краба были предоставлены проф. В.П. Варламовым (ФИЦ «Биотехнология» РАН).

Получение штамма *P. verruculosum* – продуцента хитиназы. В качестве реципиентного использовали штамм *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$), дефектный по гену *niaD*. Штамм *Escherichia coli* Mach-1 ($\Delta recA1398$ endA1 tonA $\Phi 80\Delta lacM15 \Delta lacX74 hsdR(r_K^-m_K^+))$ («Invitrogen», США) был использован для клонирования целевых генов, получения и выделения плазмид.

Плазмида. В составе использованной в работе экспрессионной плазмиды pChi403 целевой ген *chi403* (GenBank: XM_0036663496), кодирующий хитиназу *М. thermophila*, находился под контролем гомологичного промотора гена *cbh1*, кодирующего целлобиогидролазу 1 (ЦБГ1) *Р. verruculosum* [23].

Плазмида pChi403 была получена согласно методу, основанному на амплификации гена *chi403* методом ПЦР с использованием геномной ДНК штамма *M. thermophila* в качестве матрицы и пары олигонуклеотидов [24]:

(Chi403-LIC) 5'-CAAACAGAAGCAACCGA-CACAATGGGCGGCGGACCTACGGA,

(Chi403-LIC) 3'-GAGGAGAAGCCCGGTC-TAATTGTTCGGGAATCCCTCCCTCA.

Клонирование полученного ПЦР-продукта в вектор pUC-CBH обеспечивало экспрессию целевого гена *chi403* за счёт стабильного интегративного встраивания в хромосому гриба *P. verruculosum* с использованием сайтов независимого лигирования [25].

Трансформация штамма-реципиента. Рекомбинантные штаммы серии XT403 были получены в результате трансформации штамма-реципиента *P. verruculosum* B1-537 (*ΔniaD*) плазмидой pChi403 [23].

Стандартные процедуры выделения геномной ДНК, выделение ПЦР-продуктов из агарозного геля, а также выделение плазмидной ДНК осуществляли с помощью наборов фирмы «Qiagen» (США) по методикам производителя. ПЦР проводили с использованием набора Long Polimerase Mix («ThermoScientific», США) на приборе MyCycler («Bio-Rad», США) по следующей схеме: 94 °C – 3,5 мин – 1 цикл; 94 °C – 30 с, 50 °C – 2 мин, 72 °C – 1 мин – 30 циклов; 72 °C – 10 мин, 4 °C – 25 мин.

Культивирование штаммов. Штаммы *P. verruculosum* XT403 выращивали на качалках в колбах Эрленмейера ёмкостью 750 мл в 100 мл ферментационной среды следующего состава (%): $KH_2PO_4 - 1,5, (NH_4)_2SO_4 \times 7H_2O - 0,5, MgSO_4 \times$ $7H_2O - 0,03, CaCl_2 \times 2H_2O - 0,03, глюкоза - 1,0,$ дрожжевой экстракт-1,0, пшеничные отруби-1,0, МКЦ - 4,0. После культивирования втечение 6 сут на качалке при 220 об/мин и 30 °CКЖ отделяли от мицелия центрифугированиемв течение 10 мин при 10 700 g. В КЖ определяликонцентрацию белка и соответствующие активности по отношению к коллоидному хитину, хитозанам, КМЦ и ксилану.

Получение биомассы мицелиальных грибов для разрушения хитиназой. Штамм Aspergillus awamori M2002 (BKM F-3771D) культивировали в колбах в течение 6 сут при 35 °С в ферментационной среде, содержавшей 24% пшеничной муки, обработанной термостабильной α-амилазой. Штамм Penicillium canescens Pep-4 (BKM F-4677D) культивировали в колбах в течение 7 сут при 30 °С в среде, в состав которой входили (%): соевая шелуха – 4,5, кукурузный экстракт – 5,0, KH₂PO₄ – 2,5.

Биомассу мицелиальных грибов Fusarium culmorum, Fusarium sambucinum, Fusarium gram-

inearum получали путем их глубинного культивирования в среде Чапека, на картофельно-глюкозной среде (*Stagonospora nodorum*, *Septoria tritici*) или среде Пайна–Хэглера (*Aspergillus flavus*) при 220 об/мин и 25–26 °С в течение 7 сут (*Fusarium* spp., *A. flavus*) или 10–12 сут (*St. nodorum*, *S. tritici*). Все штаммы, использованные в данной части работы, были из Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов и сортов растений-идентификаторов патогенных штаммов микроорганизмов на базе ВНИИФ (Большие Вязёмы, Московская обл.).

В конце ферментации грибную биомассу отделяли фильтрованием через нетканый материал.

Получение ФП. Культивирование отобранных в качалочных колбах рекомбинантных (и реципиентного) штаммов P. verruculosum осуществляли в ферментационной установке КФ-108 на ферментёрах с рабочим объёмом 1 л в ИБФМ РАН (г. Пущино) в течение 6–7 сут, используя ферментационную среду следующего состава (%): $KH_2PO_4 - 0.7$, $(NH_4)_2SO_4 \times 7H_2O - 0.5$, $MgSO_4 \times 7H_2O - 0.03$, $CaCl_2 \times 2H_2O - 0.023$, глюкоза – 4,0, дрожжевой экстракт – 1,0, пшеничные отруби -1,0, МКЦ -4,0; рН не ниже 4,5, температура 32,0 ± 0,5 °C, аэрация 1 л/л/мин. После окончания процесса культивирования КЖ отделяли от мицелия гриба-продуцента центрифугированием и подвергали лиофильному высушиванию на распылительной сушилке Mini Spray Dryer B-290 («Висhi», Швейцария).

Определение ферментативных активностей. Активность по отношению к полисахаридным субстратам (хитозанам, КМЦ, МКЦ, ксилану) измеряли по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС) при 50 °С, рН 5,0 (0,1 M Na-ацетатный буфер) при исходной концентрации субстрата 5 г/л. ВС определяли модифицированным методом Шомоди–Нельсона [26–28] или с использованием бицинхонинатного метода (для фракций после хроматографического фракционирования [29]). За единицу активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС за 1 мин.

Активность по отношению к коллоидному хитину определяли двумя способами: модифицированным феррицианидным методом [30] или по уменьшению светопоглощения суспензии хитина при 700 нм [31]. При использовании феррицианидного метода измеряли начальную скорость образования BC (глюкозамина) при 50 °C, pH 5,0 (Na-ацетатный буфер); за единицу активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль BC (глюкозамина) за 1 мин. Согласно

второй методике, реакцию проводили при 37 °C, pH 5,0 (Na-ацетатный буфер), за единицу хитиназной активности принимали уменьшение светопоглощения суспензии на 1% от начального её значения на длине волны 700 нм.

Определение концентрации белка. Содержание белка в КЖ и ФП определяли модифицированным методом Лоури и др. [32], используя в качестве стандарта БСА. Содержание белка в хроматографических фракциях определяли по светопоглощению при 280 нм, считая средний коэффициент экстинкции белка равным 2,0.

Электрофорез в ПААГ. Электрофорез в 12%ном ПААГ с Ds-Na проводили на приборе MiniProtein («Bio-Rad», США) согласно руководству к прибору.

Хроматографическое фракционирование ФП. Анализ состава ФП проводили по схеме, включавшей три стадии: предварительную очистку ФП, анионообменную и гидрофобную хроматографию. Раствор ФП осаждали (NH₄)₂SO₄ (80% от насыщения при 25 °C), перерастворяли в 0,02 М бис-Tris-HCl буфере, pH 6,8 и обессоливали на колонке с биогелем Р-4, уравновешенной с тем же буфером. Последующие стадии проводили на жидкостном хроматографе NGC Chromatography System («Bio Rad», США). Для анионообменной хроматографии обессоленного ФП использовали колонку с носителем Source 15Q («Pharmacia», Швеция), уравновешенную со стартовым буфером 0,02 М бис-Tris-HCl, pH 6,8. Элюирование белков вели в линейном градиенте концентраций NaCl от 0 до 0,4 М. В полученных фракциях значение рН доводили до 5,0 с помощью 1,0 М Na-ацетатного буфера, рН 5,0. Фракции, содержавшие целевые ферменты, подвергали гидрофобной хроматографии на колонке с носителем Source 15 Isopropyl (объём геля 1 мл, «Pharmacia», Швеция), уравновешенной с 1,7 М раствором (NH₄)₂SO₄ в 0,05 M Na-ацетатном буфере, pH 5,0. Элюирование белков вели в линейном градиенте концентраций (NH₄)₂SO₄ от 1,7 до 0 М.

В полученных фракциях определяли содержание белка и активность ферментов по отношению к различным субстратам. Кроме того, все фракции исследовали методом электрофореза в ПААГ с Ds-Na.

Определение состава ФП. Для определения качественного состава ФП сопоставляли данные по активности хроматографических фракций по отношению к различным субстратам и результаты их электрофоретического анализа. Количественный состав исследуемого ФП был рассчитан как отношение количества фермента в гомогенной фракции к суммарному количеству белка в исследуемом образце. Кроме того, содержание индивидуальных ферментов в ФП определяли, анализируя данные электрофореза в ПААГ с Ds-Na с помощью денситометрии, используя программное обеспечение «Gel Analyser».

Деструкция грибной биомассы. Гидролиз биомассы глубинного мицелия грибов A. awamori, P. canescens, F culmorum, F. sambucinum, F. graminearum, St. nodorum, S. tritici и A. flavus (расшифровано выше, см. раздел «Получение биомассы мицелиальных грибов для разрушения хитиназой») проводили в стеклянных градуированных пробирках объемом 10 мл с притертыми пробками в течение 24, 36 или 48 ч при гидромодуле 1:10 (1 г сырого мицелия на 10 мл дистиллированной воды) при температуре 25-27 °С без перемешивания. ФП вносили в дозировке 10 мг белка на 1 г сырого мицелия, а результат их действия на грибную биомассу оценивали визуально, измеряя объем оставшегося осадка по градуированной шкале пробирки, а также с помощью микроскопирования, используя лабораторный микроскоп Eclipse Ci («Nikon Corporation», Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение продуцентов хитиназы. Ген *chi403* (GenBank AN: NC_016476), кодирующий XT *M. thermophile*, которая относится к семейству гликозил-гидролаз GH18, был клонирован в вектор pUC-CBHI, который обеспечивает экспрессию целевых генов в реципиентном штамме *P. verruculosum* B1-537 (*ΔniaD*) под контролем индуцибельного промотора *cbh1*, кодирующего ЦБГ1.

В результате клонирования была получена плазмида pChi403, экспрессионная кассета которой схематично представлена на рис. 1. Плазмида pChi403 состояла из гомологичного промотора и терминатора гена *cbh1* гриба *P. verruculosum* и гетерологичного гена *chi403*, для секреции XT был использован гомологичный сигнальный пептид ЦБГІ.

Реципиентный штамм *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$) был котрансформирован 10 мкг плазмиды pChi403 совместно с 1 мкг плазмиды pSTA10 (niaD). В результате были получены ~250 трансформантов серии XT403, что соответствует средней трансформационной частоте мицелиальных грибов [33]. Далее случайным образом выбраны 10 трансформантов, которые были перенесены на минимальную селективную среду [23], а затем проанализированы методом ПЦР на наличие целевого гена с использованием олигонуклеотидов для его амплификации. Все анализируемые трансформанты содержали гетерологичный ген *chi403*.

5' //	<i>cbh 1</i> промотор 1303 п.о.	<i>cbh 1</i> SS 75 п.о.	ген <i>chi 403</i> из <i>M. thermophila</i> 1212 п.о.	<i>cbh 1</i> терминатор 570 п.о.	3' //
----------	---------------------------------------	-------------------------------	---	--	----------

Рис. 1. Схематическое изображение экспрессионной кассеты в плазмиде pChi403 с геном *chi403*, кодирующим XT GH18 *M. thermophila*

Отобранные трансформанты культивировали в качалочных колбах. После завершения ферментации в КЖ определяли концентрацию белка и ферментативную активность по отношению к коллоидному хитину, хитозанам с мол. массой 200 и 1000 кДа, КМЦ и ксилану. В качестве контроля использовали КЖ реципиентного штамма *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$). По результатам измерений был отобран трансформант Chi403-4, обладавший максимальной активностью XT (данные не приведены). Этот трансформант далее культивировали в 1-литровых ферментёрах, и, в конечном итоге, был получен препарат ФП XT403-4, представлявший собой лиофильно высушенную КЖ.

Активность рекомбинантного ФП. В полученном ФП ХТ403-4 было определено содержание белка и активность по отношению к различным субстратам (табл. 1). В качестве контроля использовали ФП из КЖ реципиентного штамма *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$). Удельная активность ФП ХТ403-4 по отношению к хитозанам 200 и 1000 кДа составила 0,53 и 0,66 ед/мг белка соответственно, по отношению к коллоидному хитину – 0,55 ед/мг. Активность контрольного ФП по отношению к хитозанам с мол. массой 200 и 1000 кДа и хитину составила 0,04, 0,04 и 0,05 ед/мг соответственно.

Удельная активность рекомбинантного ФП XT403-4 по отношению к МКЦ, отражающая целлобиогидролазную активность, снижалась в 2,7 раза по сравнению с контролем, что, вероятно, связано с недостатком положительных факторов транскрипции в рекомбинантном штамме [34].

Удельная активность эндоглюканазы (ЭГ) по КМЦ и ксиланазы (КСИЛ) по березовому ксилану рекомбинантного ФП ХТ403-4 также снизилась — в 6,2 и 9,4 раза, соответственно, по сравнению с контролем.

Таблица 1. Удельная активность ФП по отношению к различным субстратам

Фана сахити ий	Содержание белка, мг/г	Удельная активность, уд/мг					
препарат		XT3 200 кДа*	XT3 1000 кДа**	KXT***	МКЦ	КМЦ	Ксилан
ХТ403-4 Контроль	300 ± 16 680 ± 25	$0,53 \pm 0,02$ $0,040 \pm 0,003$	$0,66 \pm 0,02$ $0,040 \pm 0,003$	$0,55 \pm 0,02$ $0,050 \pm 0,003$	$0,22 \pm 0,01$ $0,61 \pm 0,02$	$1,70 \pm 0,07$ $10,6 \pm 0,2$	$1,80 \pm 0,07$ $16,9 \pm 0,3$

* Хитозан 200 кДа.

** Хитозан 1000 кДа.

*** Коллоидный хитин.

	Содержание фермента, % общего белка				
Ферментный препарат	XT	ЦБГ	ЭГ	КСИЛ	Другие
ФП XT403-4	47	26	1	2	24
Контроль	0	60	12	3	25

Таблица 2. Компонентный состав ФП



Рис. 2. Электрофорез в ПААГ в присутствии Ds-Na. 1 – ФП XT403-4; 2 – контрольный ФП, полученный с помощью реципиентного штамма B1-537 (Δ*niaD*)

Состав рекомбинантного ФП. На рис. 2 представлены результаты анализа рекомбинантного ФП с помощью электрофореза в ПААГ с Ds-Na. Видно, что его электрофореграмма отличается от контрольного ФП наличием хорошо выраженной новой полосы в области 43 кДа, соответствующей гетерологичной ХТ, и заметным уменьшением площади полос, соответствующих ЦБГ1 (66 кДа), ЭГ2 (39 кДа) и КСИЛ (32 кДа).

Изучение компонентного состава рекомбинантного ФП XT403-4 проводили путем хроматографического фракционирования. Очищенный от низкомолекулярных веществ с помощью гель-фильтрации ФП XT403-4 подвергали анионообменной хроматографии на колонке с носителем Source 15Q при pH 6,8. Фракции, содержавшие XT, подвергали гидрофобной хроматографии на колонке с носителем Source 15 Isopropyl. Во всех случаях в элюенте определяли содержание белка и активность ферментов по отношению к хитозанам, хитину, КМЦ, МКЦ и ксилану. Кроме того, все фракции анализировали методом электрофореза в ПААГ с Ds-Na. На основании полученных данных было рассчитано содержание основных компонентов исследуемого ФП (табл. 2). Количество гетерологичной ХТ в нём составило 47% от общего содержания белка. Содержание ЦБГІ в ФП ХТ403-4 снизилось в 2,3 раза по сравнению с контролем, что согласуется со снижением удельной активности по отношению к МКЦ (табл. 1). В рекомбинантном ФП XT403-4 наблюдали также снижение содержания ЭГ и КСИЛ, что соответствовало снижению их удельной активности по отношению к соответствующим специфическим субстратам.

Термостабильность, рН и температурные оптимумы ФП ХТ. Были определены рН- и темпера-

БИОХИМИЯ том 85 вып. 6 2020

турные оптимумы хитиназной активности рекомбинантного ФП ХТ 403-4, а также стабильность ХТ при различных температурах. Полученные результаты представлены в табл. 3. Максимальную активность ХТ проявляла при 60 °С и рН 4,7-5,5; область значений температуры и рН, в которой ХТ проявляла 80% активности от максимальной, составила 52-65 °С и 4,5-6,2, что соответствует описанным в литературе для ферментов этого класса [1]. ХТ обладала достаточно высокой стабильностью в водном растворе к продолжительному воздействию повышенных температур (в растворе): за 3 ч инкубации при 40 и 50 °C (pH 5) она сохраняла 90 и 83% исходной активности соответственно (табл. 3).

Применение ФП ХТ для разрушения грибного мицелия. В качестве источника грибного мицелия использовали *А. awamori* – промышленный продуцент глюкоамилазы, а также *P. canescens* – промышленный продуцент протеаз. Для проведения деструкции мицелия использовали ФП ХТ403-4 в дозировке 10 мг белка на 1 г сырой биомассы грибов. Остаточный объём биомассы мицелия *А. awamori* после 24 ч под действием препарата ХТ403-4 уменьшался в 2,2 раза, *P. canescens* – ~ в 2 раза (рис. 3). ФП, полученный с помощью реципентного штамма B1-537 (*ΔniaD*), обладающий в основном только целлю-

Таблица 3. Биохимические характеристики ферментного препарата ФП XT 403-4 (определены при использовании коллоидного хитина в качестве субстрата)

Измеряемый параметр	Значение параметра
рН-оптимум активности	4,7–5,5
рН-диапазон активности ≥80%	4,5-6,2
рН-диапазон активности ≥50%	3,7-6,5*
Температурный оптимум активности, °С	60
Температурный диапазон активности ≥80%, °С	52-65
Температурный диапазон активности ≥50%, °С	45–75
Остаточная активность после инкубации при 40 °С (pH 5), %	90**
Остаточная активность после инкубации при 50 °С (pH 5), %	83**

* Измерение активности при значениях pH выше 6,5 для коллоидного хитина затруднительно из-за свойств субстрата.

** Активность через 3 ч инкубации.



Рис. 3. Остаточный объем мицелия после 24 ч гидролиза биомассы *A. awamori (1)* и *P. canescens (2)* ферментным препаратом хитиназы: I – контроль без ФП, II – ХТ403-4, III – ФП из реципиентного штамма B1-537 (ΔniaD)

лолитической активностью (активность XT очень низка, см. табл. 1), никак не влиял на объём биомассы мицелия обоих штаммов (рис. 3).

Результаты, полученные с помощью анализа остаточного объёма осадка мицелия, подтверждаются данными микроскопирования (рис. 4), которые свидетельствуют о деструкции клеточной стенки *A. awamori* и *P. canescens* под дейтствием ФП XT403-4.

ФП ХТ403-4 был использован для разрушения мицелия фитопатогенных грибов *F. culmorum*, *F. sambucinum*, *F. graminearum*, *St. nodorum*, *S. tritici* и *A. flavus* (условия обработки мицелия препаратом ХТ были такие же, как и использованные для обработки грибов-продуцентов ферментов). Остаточный объём биомассы мицелия перечисленных выше фитопатогенов после инкубации с ФП ХТ403-4 уменьшался в 2,3, 2,0, 2,3, 2,1, 2,2 и 2,4



Рис. 4. Результаты микроскопирования мицелия грибов *A. awamori* (*a*) и *P. canescens* (*б*) после 24 ч гидролиза препаратом хитиназы XT403-4, где: *1* – мицелий без ΦΠ; *2* – мицелий, обработанный XT403-4; *3* – мицелий, обработанный ΦΠ из реципиентного штамма B1-537 (ΔniaD)



Рис. 5. Остаточный объем мицелия после 24 ч гидролиза ФП хитиназы XT403-4 (1) и ФП из реципиентного штамма B1-537 (2) биомассы фитопатогенных грибов, где I – F. culmorum, II – F. sambucinum, III – F. graminearum, IV – St. nodorum, V - S. tritici и VI – A. flavus

846

раза, соответственно, по сравнению с контролем (рис. 5). Результаты, полученные с помощью анализа остаточного объёма осадка мицелия подтверждаются микроскопированием (данные не приведены). Контрольный ФП, полученный с помощью реципиентного штамма, никак не влиял на объём биомассы мицелия фитопатогенных штаммов.

Полученные результаты показали перспективность использования ФП ХТ, полученного с помощью экспрессионной системы на базе *P. verruculosum*, для эффективной биоконверсии отходов микробиологической промышленности, а также для разрушения мицелия фитопатогенных грибов. Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования (уникальный идентификатор проекта: RFMEFI61620X0128).

Благодарности. В работе использовали оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мелентьев А. И., Актуганов Г. Э. (2013) В кн. Ферменты деградации хитина и хитозана. Хитозан (под ред. Г. К. Скрябина, С. Н. Михайлова, В. П. Варламова), центр «Биоинженерия» РАН, Москва, с. 71-114.
- Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activity and Applications (2011) (Kim, S.-K., ed.) CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, London, N. Y., doi: 10.1201/EBK1439816035.
- Berini, F., Katz, C., Gruzdev, N., Casartelli, M., Tettamanti, G., and Marinelli, F. (2018) Microbial and viral chitinases: attractive biopesticides for integrated pest management, *Biotechnol. Adv.*, 36, 818-828, doi: 10.1016/ j.biotechadv.2018.01.002.
- 4. Vijayakumar, N., and Alagar, S. (2017) Consequence of chitinase from *Trichoderma viride* integrated feed on digestive enzymes in *Corcyra cephalonica* (Stainton) and antimicrobial potential, *Biosci. Biotech. Res. Asia*, **14**, 513-519, doi: 10.13005/bbra/2473.
- Sakai, K., Uchiyama, T., Matahira, Y., and Nanjo, F. (1991) Immobilization of chitinolytic enzymes and continuous production of *N*-acetyl *D*-glucosamine with the immobilized enzymes, *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 168-172, doi: 10.1016/0922-338X(91)90211-X.
- Saschiwa, H., Fujishima, S., and Yamano, N. (2002) Production of N-acetyl D-glucosamine from alpha-chitin by crude enzymes from Aeromonas hydrophila H-2330, Carbohydr. Res., 337, 761-763, doi: 10.1016/s0008-6215(02)00034-4.
- Jain, T., Kumar, H., and Dutta, P. K. (2016) in *Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine* (Dutta, P. K., ed.) Springer India, Bangalore, Mumbai, New Delhi, India, p. 279-295.
- Wang, S.-L., Liang, T.-W., and Yen, Y.-H. (2011) Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials, *Carbohydr. Pol.*, 84, 732-742, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.06.022.
- 9. Thadathil, N., and Velappan, S. P. (2014) Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: a review, *Food Chem.*, **150**, 392-399, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.083.
- Sakai, K., Yokota, A., Kurokawa, H., Wakayama, M., and Moriguchi, M. (1998) Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3397-3402, doi: 10.1128/ AEM.64.9.3397-3402.1998.
- 11. Revah-Moiseev, S., and Carroad, P. A. (1981) Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to

БИОХИМИЯ том 85 вып. 6 2020

single-cell protein, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1067-1078, doi: 10.1002/bit.260230514.

- Dahia, N., Tiwari, R., Tiwari, R. P., and Hoondal, G. S. (2005) Production of an antifungal chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4 and its application in protoplast production, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 1611-1615, doi: 10.1007/s11274-005-8343-6.
- Johnson, E. A., Villa, T. G., Lewis, M. J., and Phaff, H. J. (1979) Lysis of the cell wall of yeast *Phaffia rhodozyme* by lytic complex from *Bacillus circulans* WL-12, *J. Appl. Biochem.*, 1, 273-282.
- Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals (2014) (Brar, S. K., Dhillon, G. S., and Soccol, C., eds) Springer Verlag, N. Y., p. 504.
- Камзолкина О. В., Дунаевский Я. Е. (2017) Биология грибной клетки. Учебное пособие. 2-е изд., Товарищество научных изданий КМК, Москва.
- Kuranda, M. J., and Robbins, P. W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, 266, 19707-19758.
- Курченко В. П., Буга С. В., Петрашкевич Н. В., Буткевич Т. В., Ветошкин А. А., Демченков Е. Л., Лодыгин А. Д., Зуева О. Ю., Варламов В. П., Бородин О. И. (2016) Технологические основы получения хитина и хитозана из насекомых, *Труды БГУ*, **11**, 110-126.
- Середа А. С., Великорецкая И. А., Осипов Д. О., Матыс В. Ю., Бубнова Т. В., Немашкалов В. А., Синицына О. А., Рожкова А. М., Цурикова Н. В., Синицын А. П. (2018) Ферментные комплексы для разрушения клеточной стенки мицелиальных грибов продуцентов промышленных ферментов, Известия Уфимского научного центра РАН, 3, 31-35.
- 19. Патент РФ 2361918.
- 20. Патент РФ 2378372.
- Синицын А. П., Короткова О. Г., Рубцова Е. А., Синицына О. А., Кондратьева Е. Г., Середа А. С., Зоров И. Н., Рожкова А. М. (2019) Конструирование рекомбинантных продуцентов ферментных препаратов для кормопроизводства с помощью экспрессионной системы на основе гриба *Penicillium verruculosum*, *Биотехнолоеия*, **35**, 6-14, doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-6-14.
- 22. Bukhtoyarov, F. E., Ustinov, B. B., Salanovich, T. N., Antonov, A. I., Gusakov, A. V., Okunev, O. N., and Sinitsyn, A. P. (2004) Cellulase complex of the fungus *Chrysosporium lucknowense*: isolation and characteristics of endoglucanases and cellobiohydrolases, *Biochemistry* (*Moscow*), **69**, 542-551.

- 23. Merzlov, D. A., Zorov, I. N., Dotsenko, G. S., Denisenko, Y. A., Rozhkova, A. M., Satrutdinov, A. D., Rubtsova, E. A., Kondrat'eva, E. G., and Sinitsyn, A. P. (2015) Properties of Enzyme preparations and homogenous enzymes endoglucanase EG2 Penicillium verruculosum and endoglucanase LAM Myceliophtora thermophila, Biochemistry
- (*Moscow*), **80**, 473-482, doi: 10/1134/S0062979150401122
 24. Semenova, M. V., Gusakov, A. V., Volkov, P. V., Matys, V. Yu., Nemashkalov, V. A., Telitsyn, V. D., Rozhkova, A. M., and Sinitsyn, A. P. (2019) Enhancement of the enzymatic cellulose saccharification by Penicillium verruculosum multienzyme cocktails containing homologously overexpressed lytic polysaccharide monooxygenase, Mol. Biol. Rep., 46, 2363-2370, doi: 10.1007/s11033-019-04693-y.
- 25. Aslanidis, C., and de Jong, J. P. (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR), Nucleic Acids Res., 18, 6069-6075, doi: 10.1093/nar/18.20.6069.
- 26. Nelson, N. A. (1944) Photometric adoption of the Somogyi method for the determination of glucose, J. Biol. Chem., 153, 375-379.
- 27. Somogyi, M. (1952) Notes on sugar determination, J. Biol. Chem., 195, 19-23.
- Sinitsyna, O. A., Bukhtoyarov, F. E., Gusakov, A. V., Okunev, O. N., Bekarevich, A. O., Vinetsky, Y. P., and 28 Sinitsyn, A. P. (2003) Isolation and properties of major components of Penicilium canescens extracellular enzyme complex, Biochemistry (Moscow), 68, 1200-1209.

- 29. Zorov, I. N., Dubasova, M. Y., Sinitsyn, A. P., Gusakov, A. V., Mytchenko, A. A., Baraznenok, V. A., Gutierrez, B., and Popova, N. N. (1997) Application of the bicinchininic method of assay for the reducing sugars to determine carboxymethylcellulase activity of cellulases using a microplate reader, Biochemistry (Moscow), 62, 704-709, doi: 10.1134/S0006297910010062.
- 30. Синицын А. П., Черноглазов В. М., Гусаков А. В. (1993) Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов. Серия «Биотехнология», 25 (Итоги науки и техники АН СССР), ВИНИТИ, Москва.
- 31. Decleire, M., De Cat, W., and Tang, V. H. (1996) in Chitin Enzymology (Muzzarelli, R. A. A., ed.) Atec Edizioni, Glottamare, Italy, 165-169.
- 32. Peterson, G. L. (1977) Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, Anal. Biochem., 100, 201-220, doi: 10.1016/0003-2697(79)90222-7.
- 33. Aleksenko, A. Y., Makarova, N. A., Nikolaev, I. V., and Clutterbuck, A. J. (1995) Integrative and replicative transformation of Penicillium canescens with a heterologous nitrate-reductase gene, Curr. Genet., 28, 474-478, doi: 10.1007/BF00310818.
- Чулкин А. М., Кислицин В. Ю., Зоров И. Н., Сини-34 цын А. П., Рожкова А. М. (2019) Определение копийности целевых генов карбогидраз в рекомбинантных штаммах гриба Penicillium verruculosum, Биотехнология, 35, 51-57, doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-51-57.

DEVELOPMENT OF THE CHITINASE PRODUCER AND USE OF ENZYME PREPARATION FOR DISRUPTION OF MYCELIAL FUNGAL CELL WALL

O. A. Sinitsyna^{1*}, E. A. Rubtsova², I. G. Sinelnikov², D. O. Osipov², A. M. Rozhkova², V. Yu. Matys³, T. V. Bubnova³, V. A. Nemashkalov³, A. S. Sereda⁴, L. A. Tcsherbakova⁵, and A. P. Sinitsyn^{1,2}

¹ Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, 119991 Moscow, Russia; E-mail: oasinitsyna@gmail.com

² Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

³ Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

⁴ Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology, 111033 Moscow, Russia

⁵ All-Russian Research Institute of Phytopathology, 143050 Bolshye Vyazemy, Moscow Region, Russia

> Received April 16, 2020 Revised April 18, 2020 Accepted April 18, 2020

A recombinant strain producing a complex of extracellular enzymes including chitinase from Myceliophtora thermophila was created based on the fungus Penicillium verruculosum. The activity of the enzyme preparations obtained from the cultural fluid of the producer strain was 0.55, 0.53, and 0.66 U/mg protein with chitin and chitosans with the molecular weight of 200 and 1000 kDa, respectively. The temperature optimum for the recombinant chitinase was 52-65°C; the pH optimum was 4.5-6.2, which corresponded to the published data for this class of the enzymes. The content of heterologous chitinase in the obtained enzyme preparations was 47% of total protein content in the cultural fluid. Enzyme preparations produced by the recombinant P. verruculosum XT403 strain and containing heterologous chitinase were able to degrade the mycelium of micromycetes, including phytopathogenic ones, and were very efficient in the bioconversion of microbiological industry waste.

Keywords: chitinase, chitin, chitosan, Penicillium verruculosum, phytopathogenic fungi, waste bioconversion