

СОДЕРЖАНИЕ

Том 85, выпуск 3, 2020

Биосинтез белка в митохондриях: простота в прошлом, совершенство сейчас, неизвестность в будущем (обзор) <i>С.А. Левицкий, М.В. Балева, И.В. Чичерин, И.А. Крашенинников, П.А. Каменский</i>	299
Метаболическая регуляция дифференцировки стволовых клеток млекопитающих (обзор) <i>П.А. Тюрин-Кузьмин, А.Ю. Молчанов, В.И. Чечехин, А.М. Иванова, К.Ю. Кулебякин</i>	307
Нейропротективные эффекты пептидов в мозге: транскриптомные подходы к их исследованию (пептидная регуляция мозга) (обзор) <i>И.Б. Филиппенков, Л.В. Дергунова, С.А. Лимборская, Н.Ф. Мясоедов</i>	324
Влияние окисления белка XRCC1 человека на функциональную активность его комплексов с ключевыми ферментами эксцизионной репарации оснований ДНК <i>И.А. Васильева, Н.А. Моор, О.И. Лаврик</i>	335
Роль генов <i>LAM</i> в гибели клеток дрожжей <i>S. cerevisiae</i> , вызванной высокой концентрацией полового феромона <i>С.С. Соколов, К.В. Галкина, Е.А. Литвинова, Д.А. Кнорре, Ф.Ф. Северин</i>	348
Характеристика вирионов и реполимеров белка оболочки вируса табачной мозаики в растворе методом малоуглового рентгеновского рассеяния <i>А.Л. Ксенофонтов, М.В. Петухов, А.Н. Прусов, Н.В. Федорова, Э.В. Штыкова</i>	360
Антирестрикционный белок ArdB (R64) взаимодействует с ДНК <i>А.А. Кудрявцева, И.С. Охрименко, В.С. Дидина, Г.Б. Завильгельский, И.В. Манухов</i>	369
Влияние структурных изменений в зоне контакта субъединиц на активность и аллостерическую регуляцию пироглутаматазы из <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Р.С. Романов, С.А. Курилова, А.А. Байков, Е.В. Родина</i>	378
Интерлейкин-4 восстанавливает чувствительность к инсулину в инсулинорезистентных остеобластах, повышая экспрессию субстрата рецептора инсулина 1 <i>Ж. Чао, Д. Ли, Ц. Юэ, Ц. Хуан, Ю. Коу, Ц. Чжоу, Ю. Гао, Т. Хасэгава, Ц. Го, М. Ли</i>	387
Сравнительный анализ агрегации рибосомного белка bS1 и его стабильного фрагмента из <i>Thermus thermophilus</i> <i>С.Ю. Гришин, У.Ф. Джус, О.М. Селиванова, В.А. Балобанов, А.К. Сурин, О.В. Галзитская</i>	399
Альтернативный путь метаболизма нафталина у штамма <i>Rhodococcus opacus</i> 3D, включающий образование орто-фталевой и производных коричной кислоты <i>Т.О. Анохина, Т.З. Есикова, А.Б. Гафаров, В.Н. Полищев, Б.П. Баскунов, И.П. Соляникова</i>	412
Рамноманнаны и тейхуроновая кислота из клеточной стенки <i>Rhizobium tritici</i> ВКМ Ас-1603 ^T <i>А.С. Шашков, Е.М. Тульская, Г.М. Стрешинская, А.С. Дмитренко, Н.В. Потехина, С.Н. Сенченкова, Н.Ф. Пискунова, Л.В. Дорофеева, Л.И. Евтушенко</i>	428
Фосфатазы моно- и дифосфата тиамина в синаптических мозгах быка <i>В.А. Алешин, О.А. Меженская, Ю.М. Пархоменко, Т. Кэне, В.И. Буник</i>	438

ГИПОТЕЗА

Уникальная биполярная архитектура генов в РНК-геноме вируса гриппа А <i>О.П. Жирнов</i>	449
--	-----

ХРОНИКА

90-летие со дня рождения И.С. Кулаева	456
---------------------------------------	-----

CONTENTS

Vol. 85, Publ. 3, 2020

Protein Biosynthesis in Mitochondria: Past Simple, Present Perfect, Future Indefinite (Review) <i>S. A. Levitskii, M. V. Baleva, I. V. Chicherin, I. A. Krashennnikov, and P. A. Kamenski</i>	299
Metabolic Regulation of Mammalian Stem Cells Differentiation (Review) <i>P. A. Tyurin-Kuzmin, A. Yu. Molchanov, V. I. Chechekhin, A. M. Ivanova, and K. Yu. Kulebyakin</i>	307
Neuroprotective Effects of Peptides in the Brain: Transcriptome Approach (Review) <i>I. B. Filippenkov, L. V. Dergunova, S. A. Limborska, and N. F. Myasoedov</i>	324
Influence of Human XRCC1 Protein Oxidation on Functional Activity of Its Complexes with Key Enzymes of DNA Base Excision Repair <i>I. A. Vasil'eva, N. A. Moor, and O. I. Lavrik</i>	335
The Role of <i>LAM</i> Genes in Sex Pheromone-Induced <i>S. cerevisiae</i> Yeast Cell Death <i>S. S. Sokolov, K. V. Galkina, E. A. Litvinova, D. A. Knorre, and F. F. Severin</i>	348
Characterization of Tobacco Mosaic Virus Virions and Repolymerized Coat Protein Aggregates in Solution by Small-Angle X-Ray Scattering <i>A. L. Ksenofontov, M. V. Petukhov, A. N. Prusov, N. V. Fedorova, and E. V. Shtykova</i>	360
Anti-Restriction Protein ArdB (R64) Binds to DNA <i>A. A. Kudryavtseva, I. S. Okhrimenko, V. S. Didina, G. B. Zavlilgelsky, and I. V. Manukhov</i>	369
Influence of Structure Variations in the Intersubunit Contacts on Activity and Allosteric Regulation of Inorganic Pyrophosphatase from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>R. S. Romanov, S. A. Kurilova, A. A. Baykov, and E. V. Rodina</i>	378
Interleukin-4 Restores Insulin Sensitivity in Insulin-Resistant Osteoblasts by Increasing the Expression of Insulin Receptor Substrate 1 <i>R. Chao, D. Li, Z. Yue, C. Huang, Y. Kou, Q. Zhou, Y. Gao, T. Hasegawa, J. Guo, and M. Li</i>	387
Comparative Analysis of the Aggregation of the bS1 Ribosomal Protein and Its Stable Fragment from <i>Thermus thermophilus</i> <i>S. Yu. Grishin, U. F. Dzhus, O. M. Selivanova, V. A. Balobanov, A. K. Surin, and O. V. Galzitskaya</i>	399
Alternative Naphthalene Metabolic Pathway Includes Formation of <i>ortho</i> -Phthalic Acid and Cinnamic Acid Derivatives in the <i>Rhodococcus opacus</i> Strain 3D <i>T. O. Anokhina, T. Z. Esikova, A. B. Gafarov, V. N. Polivtseva, B. P. Baskunov, and I. P. Solyanikova</i>	412
Rhamnomannans and Teichuronic Acid from the Cell Wall of <i>Rathayibacter tritici</i> VKM Ac-1603 ^T <i>A. S. Shashkov, E. M. Tul'skaya, G. M. Streshinskaya, A. S. Dmitrenok, N. V. Potekhina, S. N. Senchenkova, N. F. Piskunova, L. V. Dorofeeva, and L. I. Evtushenko</i>	428
Phosphatases of Thiamine Mono- and Diphosphates in Bovine Brain Synaptosomes <i>V. A. Aleshin, O. A. Mezhen'ska, Y. M. Parkhomenko, T. Kaehne, and V. I. Bunik</i>	438

HYPOTHESIS

Unique Bipolar Gene Architecture in the RNA Genome of Influenza A Virus <i>O. P. Zhirnov</i>	449
---	-----

CHRONICLE

90th Anniversary of the Birth of I. S. Kulaev	456
---	-----

УДК 577.2

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА В МИТОХОНДРИЯХ: ПРОСТОТА В ПРОШЛОМ, СОВЕРШЕНСТВО СЕЙЧАС, НЕИЗВЕСТНОСТЬ В БУДУЩЕМ

Обзор

© 2020 С.А. Левицкий, М.В. Балева, И.В. Чичерин,
И.А. Крашенинников, П.А. Каменский*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: peter@protein.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 06.11.2019

После доработки 06.12.2019

Принята к публикации 09.12.2019

Митохондрии являются облигатными органеллами большинства эукариотических клеток и выполняют большое количество разнообразных функций, имеющих ключевое значение для клеточного гомеостаза. Основной функцией митохондрий является обеспечение клеток энергией в виде АТФ, синтезируемой в результате комплекса реакций окислительного фосфорилирования, осуществляемого на внутренней митохондриальной мембране. Имеющие эндосимбиотическое происхождение, митохондрии в ходе эволюции утратили большую часть генетического материала своего предка в результате редукции генома и переноса значительной части генов в ядро. Большинство митохондриальных белков синтезируются в цитозоле и импортируются в митохондрии. Тем не менее практически все современные митохондрии обладают собственным геномом, а также системами его поддержания, транскрипции и белкового синтеза. Процесс биосинтеза белка в митохондриях – митохондриальная трансляция – существенно отличается от такового у прокариот и у эукариот, демонстрируя высокую степень специализации и специфической регуляции. В данном обзоре мы рассмотрим известные на сегодняшний день данные об общих принципах регуляции митохондриальной трансляции, уделив особое внимание молекулярным механизмам инициации биосинтеза белка у дрожжей и млекопитающих.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, трансляция, инициация, фактор трансляции, фактор инициации.

DOI: 10.31857/S032097252003001X

Митохондрии являются важнейшими органеллами практически всех эукариотических клеток, основной функций которых является обеспечение клеток энергией в виде АТФ, синтезируемой в результате реакций окислительного фосфорилирования. Помимо этого, митохондрии принимают участие в биосинтезе FeS-кластеров, метаболизме аминокислот и нуклеотидов, синтезе липидов, стероидов, регуляции программируемой смерти клеток [1]. Согласно общепринятой эндосимбиотической теории, митохондрии имеют экзогенное происхождение от прокариотического предшественника, сходного с альфа-протеобактериями [2]. При этом митохондрии являются полуавтономными органеллами – в ходе миллиардов лет эволюции митохондрии

различных групп эукариот утратили значительную часть генетического материала прокариотического предшественника, сохранив лишь отдельные части предкового генома. Протеом современных митохондрий в подавляющем большинстве составляют белки, кодируемые в ядре, синтезируемые в цитоплазме и импортируемые в митохондрии [3]. Митохондриальные геномы современных эукариот в большинстве случаев существенно меньше бактериальных и несут сравнительно небольшой набор генов. В силу значительной дивергенции число и состав митохондриальных генов у разных групп эукариот значительно разнятся. Наименьшим по размеру митохондриальным геномом (~6000 п.о.) обладает малярийный плазмодий *Plasmodium falciparum*, в то время как суммарный размер многохромосомной митохондриальной ДНК розового растения *Silene conica* превышает 10 миллионов пар оснований [4, 5].

У пекарских дрожжей в состав митохондриального генома входят гены рибосомных РНК,

Принятые сокращения: fMet-тРНК – формилметиониновая аминокислота-тРНК, mtIF2 и mtIF3 – митохондриальные второй и третий факторы инициации трансляции соответственно, 5'-НТО – 5'-нетранслируемая область мРНК.

* Адресат для корреспонденции.

полный набор тРНК, а также гены 8-ми белков, 7 из которых являются коровыми гидрофобными компонентами комплексов электрон-транспортной цепи и АТФ-синтазы, а один — Var1p — рибосомным белком [6]. В геномах митохондрий млекопитающих, помимо генов рРНК и тРНК, имеются гены 13 белков, являющихся компонентами комплексов системы окислительного фосфорилирования [7]. В то же время у простейших группы Jakobids, имеющих самое большое из известных организмов число митохондриальных генов, в митогеноме, помимо генов рРНК, тРНК и компонентов электрон-транспортной цепи, закодировано несколько рибосомных белков, четырехсубъединичная РНК-полимераза, редуцированная транспортно-матричная РНК, РНК-компонент РНКазы Р, а также несколько факторов сборки комплексов цепи окислительного фосфорилирования [8]. При этом значительную степень эволюционной дивергенции подчеркивает тот факт, что количество митохондриальных генов у разных эукариот не коррелирует с размерами митохондриальных геномов. Например, содержащий 37 генов митохондриальный геном человека имеет размер 16 569 п.о., а геном митохондрий *Saccharomyces cerevisiae*, содержащий приблизительно то же число генов, обладает размером ~80 000 п.о., аналогичным размеру митохондриального генома упоминавшихся выше Jakobids, содержащего ~70 генов [6–8]. Не меньшие различия между митохондриями различных эукариот выявлены и в системах экспрессии генов — транскрипции и трансляции.

В данном обзоре описаны последние достижения в исследованиях биосинтеза белка в митохондриях дрожжей и млекопитающих, детально останавливаясь на механизмах регуляции инициации трансляции. Наш обзор не претендует на всеобъемлющее описание известных фактов о митохондриальной трансляции, но в большей степени направлен на обсуждение имеющихся противоречий и предложение новых концепций в исследовании этого процесса.

ОСНОВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА В МИТОХОНДРИЯХ

Биосинтез белка осуществляется молекулярными машинами, рибосомами, считывающими генетическую информацию мРНК и катализирующими соединение аминокислот пептидными связями [9]. Рибосомы состоят из двух субъединиц, малой и большой. Малая субъединица осуществляет декодирование мРНК, а большая катализирует синтез полипептидной цепи.

Несмотря на общность принципа декодирования мРНК и синтеза белка, структуры и механизмы работы рибосом различаются не только между прокариотами и эукариотами, но и между бактериями и археями [10]. Аналогичным образом, несмотря на принципиальное сходство, не менее значимы отличия в структуре митохондриальных рибосом и в принципах регуляции митохондриальной трансляции различных групп организмов. Долгое время митохондриальная трансляция оставалась своего рода *terra incognita* в молекулярной биологии, поскольку с момента обнаружения этого феномена предполагалось, что биосинтез белка в митохондриях аналогичен таковому у бактерий. Однако функциональные и, в особой степени, структурные исследования последнего десятилетия существенно приумножили знания в этой области [11–13]. Сегодня очевидно, что биосинтез белка в митохондриях обладает рядом черт, принципиально отличающих его от аналогичных процессов как у бактерий, так и в цитозоле эукариотических клеток. В наибольшей степени изучены процессы митохондриальной трансляции в клетках *S. cerevisiae* и млекопитающих.

В первую очередь следует отметить, что в настоящее время не ставится под сомнение бактериальное происхождение миторибосом [14]. При этом митохондриальные рибосомы в эволюционном плане существенно отделились от бактериальных предшественников как по пространственной структуре, так и по составу рибосомных РНК и рибосомных белков. Бурное развитие методов криоэлектронной микроскопии в последние годы позволило разрешить структуры митохондриальных рибосом многих организмов (*Trypanosoma brucei* [15], *S. cerevisiae* [16], *Sus scrofa* [12], *Homo sapiens* [11], *Arabidopsis thaliana* [17] и *Brassica oleracea* var. *botrytis* [18]). Сравнение этих структур показало, что миторибосомы различных групп эукариот хоть и значительно отличаются друг от друга, но имеют общие черты. В первую очередь митохондриальные рибосомы, в сравнении с бактериальными и цитоплазматическими, характеризуются существенно более высоким содержанием белка относительно РНК, вставками и делециями в рРНК, а также целым рядом особых, специфичных для митохондриальных рибосом, белков. По всей видимости, это связано с частичным замещением функций РНК белками, а также специализацией митохондриальной трансляции к синтезу ограниченного числа гидрофобных белков, котрансляционно встраивающихся во внутреннюю мембрану митохондрий в составе комплексов цепи окислительного фосфорилирования [19]. Системы биосинтеза белка в митохон-

дриях строго взаимосвязаны с биосинтезом митохондриальных белков в цитозоле, что является необходимым условием для корректной сборки комплексов цепи окислительного фосфорилирования [20]. Далее, мы рассмотрим известные данные о регуляции трансляции в митохондриях двух наиболее изученных систем, дрожжей и млекопитающих, на наиболее поддающийся регулированию стадии этого процесса — инициации трансляции.

PAST SIMPLE

Как уже говорилось, митохондриальная система трансляции имеет бактериальное происхождение, из чего логично предположить, что инициация биосинтеза белка в митохондриях должна быть похожа на таковую у эубактерий. Инициация бактериальной трансляции изучена в деталях. Процесс начинается с образования 30S инициаторного комплекса, в котором стартовый кодон мРНК декодируется антикодоном CAU инициаторной формилметиониновой аминоксил-тРНК (fMet-тРНК) в Р-сайте малой субъединицы рибосомы. В образовании инициаторного комплекса важнейшую роль играют три белковых фактора инициации — IF1, IF2 и IF3, каждый из которых абсолютно необходим для осуществления точной и эффективной инициации трансляции. Все три фактора взаимодействуют с участками 30S-субъединицы, выполняя специфические функции. IF2 в комплексе с ГТФ связывает fMet-тРНК, образуя тройственный комплекс, после чего взаимодействует с 30S субъединицей. IF1, связанный с 30S, препятствует вхождению аминоксил-тРНК в А-сайт, а также увеличивает аффинность тройственного комплекса IF2 : ГТФ : fMet-тРНК к 30S. IF3, будучи связанным с 30S, препятствует ассоциации малой субъединицы с 50S, а также способствует точности узнавания стартового кодона fMet-тРНК в Р-сайте. Комплексы 30S с IF1, IF3 и IF2 : ГТФ : fMet-тРНК связывают короткую полипуриновую последовательность в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) мРНК (последовательность Шайна—Дальгарно) за счет наличия в 16S рРНК частично комплементарной последовательности, после чего происходит узнавание стартового кодона антикодоном fMet-тРНК, гидролиз ГТФ до ГДФ, диссоциация факторов инициации и ассоциация большой субъединицы. В результате, образуется 70S инициаторный комплекс, представляющий собой ассоциированную рибосому, в Р-сайте которой на стартовом AUG-кодоне мРНК позиционирована fMet-тРНК, а в А-сайте располагается

второй кодон, ожидающий прихода декодирующей его аминоксил-тРНК. Факторы инициации IF1 и IF2 считаются универсальными и консервативными, поскольку их функциональные и структурные гомологи обнаружены у всех изученных бактерий и архей [21].

Инициация трансляции в митохондриях изучена в существенно меньшей степени. В первую очередь это относится к роли и функциям факторов инициации. Так, в митохондриях всех исследованных организмов не обнаружен фактор IF1, абсолютно универсален IF2, и практически универсален IF3 [22]. По всей видимости, центральную роль в инициации трансляции в митохондриях выполняет митохондриальный второй фактор инициации трансляции (mtIF2), функции которого мы подробно рассмотрим.

PRESENT PERFECT

Фактор IF2 у бактерий представляет собой трансляционную ГТФазу, состоящую из шести доменов (I—VI), где домен IV осуществляет гидролиз ГТФ, а домен VI непосредственно взаимодействует с fMet-тРНК [23, 24]. Фактор IF2 осуществляет подбор инициаторной аминоксил-тРНК и способствует ассоциации субъединиц рибосомы при инициации трансляции, причем вторая функция эволюционно консервативна у архей и эукариот. В отличие от бактерий, в митохондриях млекопитающих в инициации трансляции участвует не особая инициаторная метиониновая тРНК, а та же тРНК, что используется при включении метионина в ходе элонгации [25]. Часть метиониновой аминоксил-тРНК формилируется особым ферментом, получившаяся в результате этого fMet-тРНК обладает высокой аффинностью к mtIF2 и низкой аффинностью к митохондриальному фактору элонгации EF-Tu. Такое двойное предназначение метиониновой тРНК также отмечено и в митохондриях *T. brucei*, где все тРНК, необходимые для митохондриальной трансляции не закодированы в геноме органеллы, а импортируются из цитоплазмы [26].

Сравнительно недавно было показано, что mtIF2 человека способен функционально компенсировать не только IF2, но и IF1 у *Escherichia coli*, причем было продемонстрировано, что функцию IF1 выполняет сравнительно короткий уникальный домен mtIF2 протяженностью 37 а.о., расположенный между доменами II и III [27, 28]. В недавней работе Kummer et al. [29] с помощью криоэлектронной микроскопии была разрешена структура комплекса mtIF2 с митохондриальной рибосомой свиньи. Авторам удалось

подтвердить, что упомянутый выше 37-аминокислотный домен локализован в А-сайте малой субъединицы, препятствует вхождению в него аминоацил-тРНК и предотвращает скольжение рибосомы по мРНК, фактически выполняя функции бактериального IF1. Кроме того, авторам удалось показать, что мтIF2 не имеет непосредственных контактов с мРНК и не участвует в ее привлечении к рибосоме. Для мРНК COX3 было установлено, что в ее ассоциации с миторибосомой принимает участие пентатрикопептидный (PPR) миторибосомный белок mS39, расположенный в области входного туннеля мРНК [29]. Таким образом, предполагается что во взаимодействии мРНК с митохондриальной рибосомой млекопитающих участвуют отдельные белки самих миторибосом или же специализированные факторы трансляции.

Значительно в меньшей степени исследован митохондриальный IF2 пекарских дрожжей, кодируемый геном *IFM1*. Несмотря на то что этот фактор был выявлен ~30 лет назад [30], его значимых структурно-функциональных исследований практически не проводилось. Было продемонстрировано, что делеция гена этого фактора приводит к невозможности роста дрожжей на несбраживаемых источниках углерода [30]. Кроме этого, в системе *in vitro* было показано, что соответствующий рекомбинантный белок способен образовывать тройственный комплекс с ГТФ и fMet-тРНК, и мет-тРНК, который в присутствии синтетической мРНК связывается с 30S субъединицей бактериальной рибосомы. Помимо этого, рекомбинантный дрожжевой мтIF2 способен гидролизовать ГТФ в составе такого комплекса, а также предотвращать неэнзиматический гидролиз указанных тРНК [31]. Тем не менее, строгая необходимость этого фактора для инициации трансляции в митохондриях дрожжей не показана.

Бактериальный фактор инициации трансляции IF3 осуществляет две важные функции — связывается с 30S субъединицей рибосомы после ее диссоциации в результате терминации трансляции, препятствуя ассоциации 30S и 50S, а также участвует в селекции тРНК и мРНК при инициации нового раунда синтеза белка, специфически дестабилизируя некорректно образовавшиеся кодон-антикодоновые пары [32, 33]. IF3 универсален и консервативен среди бактерий, однако в митохондриях обнаружен не во всех организмах [22]. В цитоплазме эукариот функции IF3 выполняет многосубъединичный фактор eIF3, не имеющий значимых гомологий с бактериальным IF3 [34].

Структурно бактериальный IF3 представляет собой глобулярный белок, состоящий из двух

выраженных доменов (*N*-концевого и *C*-концевого), соединенных линкерным α -спиральным участком [35]. Непосредственно с 16S рРНК малой субъединицей рибосомы взаимодействует *C*-концевой домен, в то время как *N*-концевой домен может принимать несколько конформаций и осуществляет взаимодействие с fMet-тРНК [23]. Ряд экспериментов по делециям отдельных участков IF3 показал, что изолированный *C*-концевой домен может выполнять все функции, характерные для полноразмерного IF3, в то время как *N*-концевой домен придает дополнительную прочность связыванию фактора с рибосомой и тРНК [36].

Митохондриальный третий фактор инициации трансляции (мтIF3) у млекопитающих, идентифицированный сравнительно недавно, имеет лишь незначительное сходство первичной структуры с бактериальным, однако структурно схож с ним, отличаясь лишь наличием небольших *N*- и *C*-концевых удлинений [37]. Ряд работ, проведенных *in vitro*, указывают на то, что в митохондриях млекопитающих фактор инициации IF3 обладает функциями, сходными с бактериальным аналогом. В частности, было продемонстрировано, что мтIF3 способен диссоциировать митохондриальные рибосомы и при участии мтIF2 способствовать образованию инициаторного комплекса [37]. Также было показано, что аналогично бактериальному IF3, мтIF3 млекопитающих взаимодействует с миторибосомой преимущественно *C*-концевым доменом с некоторым вкладом линкерного участка [38]. Кроме того, мтIF3 млекопитающих также обладает способностью дестабилизировать инициаторные комплексы, не содержащие мРНК или же содержащие некорректную тРНК, причем последняя активность выражена существенно ниже, чем у бактериального IF3 [39, 40]. При этом важную роль в функционировании мтIF3 играют упомянутые выше концевые удлинения: удаление *C*-концевого удлинения приводило к неспособности фактора диссоциировать некорректные инициаторные комплексы, в то время как делеция *N*-концевого удлинения существенно увеличивала аффинность мтIF3 к 30S субъединице [39, 40]. В опубликованной в 2019 году работе Koripella et al. [41] была представлена разрешенная с помощью криоэлектронной микроскопии структура комплекса мтIF3 с митохондриальной рибосомой. Оказалось, что в отличие от бактериального IF3, во взаимодействии с миторибосомой принимают участие практически все структурные участки мтIF3, за исключением *C*-концевого удлинения. Согласно данным моделирования, этот структурный элемент при взаимодействии малой субъединицы миторибо-

сомы с тройственным комплексом мтIF2 : ГТФ : fMet-тРНК в отсутствие мРНК должен занимать Р-сайт, предотвращая формирование инициаторного комплекса без матрицы [41]. В этой же работе авторы указывают на возможную роль мтIF3 в привлечении мРНК к образуемому инициаторному комплексу.

Длительное время не удавалось идентифицировать третий фактор инициации трансляции в митохондриях *S. cerevisiae*. Однако ряд работ последних лет убедительно доказал, что таким фактором является белок Aim23p. С помощью биоинформационного анализа было показано сходство его третичной структуры с мтIF3 млекопитающих, было показано, что делецию кодирующего его гена можно супрессировать с помощью экспрессии генов мтIF3 человека и *Schizosaccharomyces pombe* [22]. Кроме этого, было продемонстрировано, что этот белок способен связываться с малой субъединицей митохондриальных рибосом дрожжей [42], а также с бактериальными рибосомами и вызывать их диссоциацию. Причем, в случае бактериальных рибосом диссоциация происходила необычным образом — связываясь с ассоциированными 70S рибосомами, Aim23p взаимодействовал как с 30S, так и с 50S субъединицами, при этом способствуя формированию промежуточного состояния диссоциации с коэффициентом седиментации ~60S [43]. Кроме этого, также была показана важность N- и C-концевых удлинений Aim23p: при удалении этих участков фактор терял свою функциональность, а добавление этих удлинений к IF3 *E. coli* делало получившийся гибридный белок полностью активным в митохондриях дрожжей [44]. Однако самая интригующая особенность Aim23p — то, что он не является абсолютно необходимым для митохондриальной трансляции. Делеция кодирующего его гена приводила лишь к снижению эффективности биосинтеза митохондриально транслируемых белков COX1 и COX2, что фенотипически проявлялось в замедленной адаптации дрожжей к росту на несбраживаемых источниках углерода, но не сказывалось на трансляции других митохондриальных мРНК [45]. Этот факт крайне удивителен в контексте того, что наличие IF3 абсолютно необходимо для бактериальной трансляции.

Как уже говорилось ранее, большая часть митохондриальных генов кодирует компоненты комплексов цепи окислительного фосфорилирования. Исходя из этого, трансляция в митохондриях должна строго взаиморегулироваться с трансляцией в цитозоле остальных субъединиц этих комплексов, закодированных в ядре. Регуляция митотрансляции остается во многом не-

изученной областью, несмотря на значимые достижения последних лет. В наибольшей степени механизмы регуляции трансляции в митохондриях изучены у *S. cerevisiae*. Яркой особенностью регуляции митохондриального синтеза белка у этих организмов является уникальная система трансляционных активаторов — группы белков, определяющих эффективность трансляции той или иной митохондриальной мРНК, взаимодействуя с имеющимися в них протяженными 5'-НТО, способными формировать вторичные структуры. Эта система подробно рассмотрена в недавних обзорах [46, 47].

Гораздо менее очевидны принципы регуляции биосинтеза 13 белков, закодированных в митохондриальном геноме млекопитающих, все из которых являются компонентами комплексов цепи окислительного фосфорилирования. В первую очередь это связано со структурным отличием митохондриальных мРНК млекопитающих — у них практически отсутствуют 5'-НТО [48], что делает невозможным существование у этой группы организмов системы активаторов, сходной с дрожжевой. Тем не менее в митохондриях млекопитающих был выявлен единственный на сегодняшний момент активатор трансляции, белок TACO1, определяющий эффективность биосинтеза компонента цитохром c оксидазы COX1, однако механизм его действия до сих пор остается невыясненным [49].

Последние структурные исследования внесли некоторую ясность в механизмы узнавания таких «безлидерных» мРНК митохондриальными рибосомами [29]. С помощью криоэлектронной микроскопии была разрешена структура собранного *in vitro* инициаторного комплекса митохондриальной рибосомы млекопитающих с мРНК COX3. Было установлено, что инициация трансляции этой мРНК во многом обусловлена взаимодействием уже упоминавшегося PPR-белка mS39 с U-богатой областью, расположенной за седьмым кодоном мРНК и консервативной для всех 11 мРНК митохондрий млекопитающих [29]. Эти данные тем не менее не объясняют, каким образом определяется эффективность инициации трансляции той или иной мРНК.

FUTURE INDEFINITE

Переходя к заключительной дискуссионной части нашего обзора, мы обобщим изложенные выше данные. Итак, ранее считалось, что в силу не ставящегося под сомнение происхождения митохондрий от бактериального предшественника трансляция в этих органеллах организована сходным с прокариотами образом. Однако

исследования последних 10–15 лет показали, что, несмотря на общность происхождения, отличия в системах биосинтеза белка в современных прокариотах и митохондриях весьма значительны, причем не менее значимо различаются и системы митохондриальной трансляции разных групп эукариот. В первую очередь, указанные различия выражены в структуре митохондриальных рибосом и заключаются в специализации рибосом митохондрий к биосинтезу в основном гидрофобных белков, закодированных в митохондриальном геноме. Последним же, по всей видимости, обусловлены и возникшие в ходе эволюции системы регуляции митохондриальной трансляции, наиболее изученной из которых является система трансляционных активаторов митохондрий пекарских дрожжей. В митохондриях млекопитающих отсутствие подобной системы обусловлено принципиальным отличием в структуре мРНК — отсутствием 5'-НТО. Тем не менее, существование системы регуляции трансляции в митохондриях млекопитающих не ставится под сомнение, поскольку эффективность биосинтеза митохондриально закодированных белков должна быть строго координирована с трансляцией других компонентов комплексов электрон-транспортной цепи в цитозоле. Вероятно, одним из способов регуляции митотрансляции является ее тесная связь с процессом сборки комплексов на внутренней мембране митохондрий, однако такое объяснение в большей степени относится к регуляции скорости элонгации, нежели инициации.

В связи с этим весьма интересными выглядят данные, полученные в результате исследования митохондриальной трансляции дрожжей в отсутствие третьего фактора инициации, который оказывает весьма слабое влияние на биосинтез большинства транслируемых в митохондриях белков [45]. Фактически, профиль митотрансляции при делеции *Aim23p* сходен с наблюдаемым при отсутствии трансляционных активаторов соответствующих мРНК, например активатора мРНК COX2, белка Pet111p [50]. В связи с этим, вполне возможно предположить, что в ходе эволюции митохондрий, приведшей к утрате подавляющего большинства предковых генов, специализации митотрансляции на син-

тезе крайне ограниченного круга гидрофобных белков, а также необходимости строгой регуляции трансляции, факторы инициации утратили свою универсальность и, фактически, стали регуляторами биосинтеза отдельных белков. Конечно подобное предположение требует тщательной проверки, например путем изучения митохондриальной трансляции в клетках с делетированными генами факторов инициации трансляции в митохондриях, однако оно не противоречит имеющимся на настоящий момент данным, поскольку все структурные и функциональные исследования факторов инициации проведены *in vitro*, а единственная модель *in vivo* — делеция белка Aim23p, показала отсутствие необходимости в третьем факторе инициации для биосинтеза белка в митохондриях. Безусловно, это наблюдение может оказаться исключительным случаем, характерным лишь для дрожжевой системы и именно этого фактора, но мы считаем важным и актуальным экспериментально ответить на вопросы о необходимости факторов инициации трансляции для биосинтеза митохондриальных белков, и в настоящее время проводим соответствующие эксперименты. Нашу гипотезу отчасти подтверждает опубликованная совсем недавно работа Rudler et al [51], в которой было показано, что делеция гена ортолога Aim23p — mtIF3 — у мыши также приводит не к остановке белкового синтеза в митохондриях, а лишь к его количественной разбалансировке.

Финансирование. Написание данного обзора стало возможным благодаря поддержке Российского научного фонда (грант № 17-14-01005), в рамках которого мы проверили некоторые свои гипотезы на тему эволюции аппарата митохондриальной трансляции. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-14-50206.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spinelli, J.B., and Haigis, M.C. (2018) The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism, *Nat. Cell Biol.*, **20**, 745–754.
2. Gray, M.W. (2012) Mitochondrial evolution, *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, **4**, a011403, doi: 10.1101/cshperspect.a011403.
3. Gray, M.W. (2015) Mosaic nature of the mitochondrial proteome: Implications for the origin and evolution of mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 10133–10138, doi: 10.1073/pnas.1421379112.
4. Feagin, J.E., Harrell, M.I., Lee, J.C., Coe, K.J., Sands, B.H., Cannone, J.J., Tami, G., Schnare, M.N., and Gutell, R.R.

- (2012) The fragmented mitochondrial ribosomal RNAs of *Plasmodium falciparum*, *PLoS One*, **7**, e38320, doi: 10.1371/journal.pone.0038320.
5. Sloan, D.B., Alverson, A.J., Chuckalovcak, J.P., Wu, M., McCauley, D.E., Palmer, J.D., and Taylor, D.R. (2012) Rapid evolution of enormous, multichromosomal genomes in flowering plant mitochondria with exceptionally high mutation rates, *PLoS Biol.*, **10**, e1001241, doi: 10.1371/journal.pbio.1001241.
 6. Freel, K.C., Friedrich, A., and Schacherer, J. (2015) Mitochondrial genome evolution in yeasts: an all-encompassing view, *FEMS Yeast Res.*, **15**, foy023, doi: 10.1093/femsyr/fov023.
 7. Taanman, J.W. (1999) The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication, *Biochim. Biophys. Acta*, **1410**, 103–123.
 8. Burger, G., Gray, M.W., Forget, L., and Lang, B.F. (2013) Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout jakobid protists, *Genome Biol. Evol.*, **5**, 418–438, doi: 10.1093/gbe/evt008.
 9. Finkelstein, A.V., Razin, S.V., and Spirin, A.S. (2018) Intersubunit mobility of the ribosome, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **52**, 921–934.
 10. Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C.W., and Ettema, T.J.G. (2017) Archaea and the origin of eukaryotes, *Nat. Rev. Microbiol.*, **15**, 711–723.
 11. Amunts, A., Brown, A., Toots, J., Scheres, S.H.W., and Ramakrishnan, V. (2015) The structure of the human mitochondrial ribosome, *Science*, **348**, 95–98, doi: 10.1126/science.aaa1193.
 12. Greber, B.J., Bieri, P., Leibundgut, M., Leitner, A., Aebersold, R., Boehringer, D., and Ban, N. (2015) The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome, *Science*, **348**, 303–308, doi: 10.1126/science.aaa3872.
 13. Englmeier, R., Pfeffer, S., and Förster, F. (2017) Structure of the human mitochondrial ribosome studied in situ by cryoelectron tomography, *Structure*, **25**, 1574–1581.e2, doi: 10.1016/j.str.2017.07.011.
 14. Bieri, P., Greber, B.J., and Ban, N. (2018) High-resolution structures of mitochondrial ribosomes and their functional implications, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **49**, 44–53.
 15. Ramrath, D.J.F., Niemann, M., Leibundgut, M., Bieri, P., Prange, C., Horn, E.K., Leitner, A., Boehringer, D., Schneider, A., and Ban, N. (2018) Evolutionary shift toward protein-based architecture in trypanosomal mitochondrial ribosomes, *Science*, **362**, doi: 10.1126/science.aau7735.
 16. Desai, N., Brown, A., Amunts, A., and Ramakrishnan, V. (2017) The structure of the yeast mitochondrial ribosome, *Science*, **355**, 528–531, doi: 10.1126/science.aal2415.
 17. Waltz, F., Nguyen, T.T., Arrivé, M., Bochler, A., Chicher, J., Hammann, P., Kuhn, L., Quadrado, M., Mireau, H., Hashem, Y., and Giegé, P. (2019) Small is big in *Arabidopsis* mitochondrial ribosome, *Nat. Plants*, **5**, 106–117, doi: 10.1038/s41477-018-0339-y.
 18. Waltz, F., Soufari, H., Bochler, A., Giegé, P., and Hashem, Y. (2019) Cryo-EM structure of the RNA-rich plant mitochondrial ribosome, bioRxiv 777342, Cold Spring Harbor Laboratory, doi: 10.1101/777342.
 19. Waltz, F., and Giegé, P. (2019) Striking diversity of mitochondria-specific translation processes across eukaryotes, *Trends Biochem. Sci.*, doi: 10.1016/j.tibs.2019.10.004.
 20. Ott, M., Amunts, A., and Brown, A. (2016) Organization and regulation of mitochondrial protein synthesis, *Annu. Rev. Biochem.*, **85**, 77–101, doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014334.
 21. Roll-Mecak, A., Shin, B.S., Dever, T.E., and Burley, S.K. (2001) Engaging the ribosome: Universal IFs of translation, *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 705–709.
 22. Atkinson, G.C., Kuzmenko, A., Kamenski, P., Vysokikh, M.Y., Lakunina, V., Tankov, S., Smirnova, E., Soosaar, A., Tenson, T., and Hauryliuk, V. (2012) Evolutionary and genetic analyses of mitochondrial translation initiation factors identify the missing mitochondrial IF3 in *S. cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 6122–6134, doi: 10.1093/nar/gks272.
 23. Julián, P., Milon, P., Agirrezabala, X., Lasso, G., Gil, D., Rodnina, M.V., and Valle, M. (2011) The cryo-EM structure of a complete 30S translation initiation complex from *Escherichia coli*, *PLoS Biol.*, **9**, doi: 10.1371/journal.pbio.1001095.
 24. Myasnikov, A.G., Simonetti, A., Marzi, S., and Klaholz, B.P. (2009) Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 300–309.
 25. Suzuki, T., Nagao, A., and Suzuki, T. (2011) Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases, *Annu. Rev. Genet.*, **45**, 299–329, doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132531.
 26. Tan, T.H.P., Bochud-Allemann, N., Horn, E.K., and Schneider, A. (2002) Eukaryotic-type elongator tRNA^{Met} of *Trypanosoma brucei* becomes formylated after import into mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1152–1157, doi: 10.1073/pnas.022522999.
 27. Gaur, R., Grasso, D., Datta, P.P., Krishna, P.D., Das, G., Spencer, A., Agrawal, R.K., Spemulli, L., and Varshney, U. (2008) A single mammalian mitochondrial translation initiation factor functionally replaces two bacterial factors, *Mol. Cell*, **29**, 180–190, doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.021.
 28. Yassin, A.S., Haque, M.E., Datta, P.P., Elmore, K., Banavali, N.K., Spemulli, L.L., and Agrawal, R.K. (2011) Insertion domain within mammalian mitochondrial translation initiation factor 2 serves the role of eubacterial initiation factor 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 3918–3923, doi: 10.1073/pnas.1017425108.
 29. Kummer, E., Leibundgut, M., Rackham, O., Lee, R.G., Boehringer, D., Filipovska, A., and Ban, N. (2018) Unique features of mammalian mitochondrial translation initiation revealed by cryo-EM, *Nature*, **560**, 263–267.
 30. Vambutas, A., Ackerman, S.H., and Tzagoloff, A. (1991) Mitochondrial translational initiation and elongation factors in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.*, **201**, 643–652, doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16325.x.
 31. Garofalo, C., Trinko, R., Kramer, G., Appling, D.R., and Hardesty, B. (2003) Purification and characterization of yeast mitochondrial initiation factor 2, *Arch. Biochem. Biophys.*, **413**, 243–252, doi: 10.1016/s0003-9861(03)00119-x.
 32. Peske, F., Rodnina, M.V., and Wintermeyer, W. (2005) Sequence of steps in ribosome recycling as defined by kinetic analysis, *Mol. Cell*, **18**, 403–412, doi: 10.1016/j.molcel.2005.04.009.
 33. Elvekrog, M.M., and Gonzalez, R.L. (2013) Conformational selection of translation initiation factor 3 signals proper substrate selection, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 628–633, doi: 10.1038/nsmb.2554.
 34. Valásek, L.S. (2012) “Ribozoomin” – translation initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs), *Curr. Protein Pept. Sci.*, **13**, 305–330.
 35. Biou, V., Shu, F., and Ramakrishnan, V. (1995) X-ray crystallography shows that translational initiation factor IF3 consists of two compact alpha/beta domains linked by an alpha-helix, *EMBO J.*, **14**, 4056–4064, doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00077.x.
 36. Petrelli, D., La Teana, A., Garofalo, C., Spurio, R., Pon, C.L., and Gualerzi, C.O. (2001) Translation initiation factor IF3: Two domains, five functions, one mechanism? *EMBO J.*, **20**, 4560–4569, doi: 10.1093/emboj/20.16.4560.

37. Koc, E.C., and Spremulli, L.L. (2002) Identification of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 and examination of its role in initiation complex formation with natural mRNAs, *J. Biol. Chem.*, **277**, 35541–35549, doi: 10.1074/jbc.M202498200.
38. Haque, M.E., and Spremulli, L.L. (2008) Roles of the N- and C-terminal domains of mammalian mitochondrial initiation factor 3 in protein biosynthesis, *J. Mol. Biol.*, **384**, 929–940, doi: 10.1016/j.jmb.2008.09.077.
39. Bhargava, K., and Spremulli, L.L. (2005) Role of the N- and C-terminal extensions on the activity of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 7011–7018, doi: 10.1093/nar/gki1007.
40. Christian, B.E., and Spremulli, L.L. (2009) Evidence for an active role of IF3 mt in the initiation of translation in mammalian mitochondria, *Biochemistry*, **48**, 3269–3278, doi: 10.1021/bi8023493.
41. Koripella, R.K., Sharma, M.R., Haque, M.E., Risteff, P., Spremulli, L.L., and Agrawal, R.K. (2019) Structure of human mitochondrial translation initiation factor 3 bound to the small ribosomal subunit, *iScience*, **12**, 76–86, doi: 10.1016/j.isci.2018.12.030.
42. Chicherin, I.V., Zinina, V.V., Levitskiy, S.A., Serebryakova, M.V., and Kamenski, P.A. (2019) Aim23p interacts with the yeast mitochondrial ribosomal small subunit, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 40–46, doi: 10.1134/S000629791901005X.
43. Levitskii, S., Derbikova, K., Baleva, M.V., Kuzmenko, A., Golovin, A.V., Chicherin, I., Krashennnikov, I.A., and Kamenski, P. (2018) 60S dynamic state of bacterial ribosome is fixed by yeast mitochondrial initiation factor 3, *PeerJ*, **6**, e5620, doi: 10.7717/peerj.5620.
44. Derbikova, K., Kuzmenko, A., Levitskii, S., Klimontova, M., Chicherin, I., Baleva, M.V., Krashennnikov, I.A., and Kamenski, P. (2018) Biological and evolutionary significance of terminal extensions of mitochondrial translation initiation factor 3, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, doi: 10.3390/ijms19123861.
45. Kuzmenko, A., Derbikova, K., Salvatori, R., Tankov, S., Atkinson, G.C., Tenson, T., Ott, M., Kamenski, P., and Haurlyuk, V. (2016) Aim-less translation: loss of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial translation initiation factor mIF3/Aim23 leads to unbalanced protein synthesis, *Sci. Rep.*, **6**, 18749, doi: 10.1038/srep18749.
46. Herrmann, J.M., Woellhaf, M.W., and Bonnefoy, N. (2013) Control of protein synthesis in yeast mitochondria: The concept of translational activators, *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 286–294.
47. Derbikova, K.S., Levitsky, S.A., Chicherin, I.V., Vinogradova, E.N., and Kamenski, P.A. (2018) Activation of yeast mitochondrial translation: Who is in charge? *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 87–97.
48. Montoya, J., Ojala, D., and Attardi, G. (1981) Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs, *Nature*, **290**, 465–470, doi: 10.1038/290465a0.
49. Weraarpachai, W., Antonicka, H., Sasarman, F., Seeger, J., Schrank, B., Kolesar, J.E., Lochmüller, H., Chevrette, M., Kaufman, B.A., Horvath, R., and Shoubridge, E.A. (2009) Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome, *Nat. Genet.*, **41**, 833–837, doi: 10.1038/ng.390.
50. Green-Willms, N.S., Butler, C.A., Dunstan, H.M., and Fox, T.D. (2001) Pet111p, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene COX2, *J. Biol. Chem.*, **276**, 6392–6397, doi: 10.1074/jbc.M009856200.
51. Rudler, D.L., Hughes, L.A., Perks, K.L., Richman, T.R., Kuznetsova, I., Ermer, J.A., Abudulai, L.N., Shearwood, A.J., Viola, H.M., Hool, L.C., Siira, S.J., Rackham, O., and Filipovska, A. (2019) Fidelity of translation initiation is required for coordinated respiratory complex assembly, *Sci. Adv.*, **5**, doi: 10.1126/sciadv.aay2118.

PROTEIN BIOSYNTHESIS IN MITOCHONDRIA: PAST SIMPLE, PRESENT PERFECT, FUTURE INDEFINITE

Review

S. A. Levitskii, M. V. Baleva, I. V. Chicherin, I. A. Krashennnikov, and P. A. Kamenski*

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia; E-mail: peter@protein.bio.msu.ru

Received November 6, 2019

Revised December 6, 2019

Accepted December 9, 2019

Mitochondria are obligate organelles of vast majority of eukaryotic cells. They have many different functions that are critical for cellular homeostasis. The main role of mitochondria is cell supply with ATP which is synthesized in a chain of oxidative phosphorylation reactions on the organellar inner membrane. Mitochondria are believed to have an endosymbiotic origin. In course of evolution, they lost the major part of their genetic material as a result of genome reduction and gene transfer to nucleus. The majority of mitochondrial proteins are synthesized in cytosol and then imported to the organelles. However, almost all known mitochondria still contain genomes that are maintained and expressed. The process of protein biosynthesis in mitochondria – mitochondrial translation – substantially differs from those in bacteria and in cytosol of eukaryotic cells. Organellar translation is characterized by high degree of specialization and specific regulation mechanisms. In this review, we analyze available information on common principles of mitochondrial translation with special attention to the molecular mechanisms of protein biosynthesis initiation in mitochondria of yeast and mammals.

Keywords: mitochondria, translation, initiation, translation factor, initiation factor

УДК 577.1

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Обзор

© 2020 П.А. Тюрин-Кузьмин^{1*}, А.Ю. Молчанов²,
В.И. Чечехин¹, А.М. Иванова¹, К.Ю. Кулебякин¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины,
119991 Москва, Россия; электронная почта: tyurinkuzmin.p@gmail.com

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 28.10.2019

После доработки 19.01.2020

Принята к публикации 19.01.2020

Формирование нормальной структуры ткани, поддержание ее гомеостаза и восстановление после повреждений требуют пролиферации и дифференцировки стволовых клеток. Отличительной особенностью данных клеток является уникальная организация метаболических путей, при которой вклад различных путей получения энергии в общий клеточный метаболизм кардинальным образом отличается от такового у дифференцированных клеток. При этом изменение организации метаболизма при дифференцировке как эмбриональных, так и постнатальных стволовых клеток обладает целым рядом закономерностей. Более того, изменение метаболизма стволовых клеток является не просто следствием дифференцировки, но и активным регулятором этого процесса. Метаболические ферменты и интермедиаты регулируют и направляют процессы поддержания клеток в стволовом состоянии, их самообновления и дифференцировки. В данном обзоре рассмотрены закономерности и молекулярные механизмы переключения метаболизма стволовых клеток по мере их перехода из плюрипотентного состояния в дифференцированные клетки. Особый упор сделан на то, как протекающие в клетках метаболические процессы регулируют их функции, способность к дифференцировке и выбор конкретного направления развития стволовых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метаболизм, плюрипотентные стволовые клетки, мезенхимные стволовые клетки, гликолиз, окислительное фосфорилирование.

DOI: 10.31857/S0320972520030021

Процесс дифференцировки стволовых клеток является основой индивидуального развития, а также процессов поддержания гомеостаза и обновления тканей взрослого организма. Клетками, обладающими всей полнотой программы развития, т.е. наиболее универсальными стволовыми клетками (СК), можно считать зиготу и бластомеры после первого деления зиготы. Однако уже после нескольких делений бластомеры морулы млекопитающих теряют способ-

ность развиваться в полноценный организм. Далее в процессе эмбрионального развития происходит деление, рост и специализация клеточных популяций. Смена стадий в ходе эмбрионального развития подразумевает увеличение числа клеток организма и появление у них новых качеств, необходимых для выполнения задач и функций формирующихся органов. По мере роста эмбриона, наряду с формированием разнообразных структур, не существовавших на предыдущих этапах, происходит ограничение возможностей дифференцировки клеток. Дифференцировка СК сопровождается существенным изменением особенностей протекания метаболических процессов, причем эти изменения носят закономерный характер. В то же время метаболические ферменты и ключевые участники метаболических путей, такие как NADH или ацетил-кофермент А (АцКоА), играют ключевую роль в регуляции процессов поддержания

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, АцКоА — ацетил-кофермент А, СК — стволовые клетки, ГСК — гематопозитические стволовые клетки, МСК — мезенхимные стволовые клетки или мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, ПСК — плюрипотентные стволовые клетки, ПДК — пируватдегидрогеназный комплекс, ЦТК — цикл трикарбоновых кислот, ЭпиСК — праймированные мышечные ПСК, ЭСК — эмбриональные стволовые клетки.

* Адресат для корреспонденции.

клеток в стволовом состоянии (стволовости), самообновления и дифференцировки стволовых клеток. Это позволяет рассматривать метаболические процессы, как отдельную регуляторную систему, определяющую участие СК в формировании ткани и поддержании ее гомеостаза.

В данном обзоре мы сфокусировались на описании закономерностей изменения ключевых метаболических путей получения клетками энергии — путей катаболизма глюкозы, углеродных скелетов аминокислот и жирных кислот — в процессе перехода клетки из состояния плюрипотентности в дифференцированное состояние. На каждом этапе мы рассматривали метаболизм одного конкретного типа стволовых клеток. Из множества СК взрослого организма мы взяли в качестве примера по одному наиболее хорошо изученному примеру тканеспецифичных стволовых клеток (гематопозитические стволовые клетки (ГСК)) и мультипотентных стромальных клеток (МСК) соответственно.

ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ

Формирующиеся из зиготы клетки ранней морулы представляют собой тотипотентные клетки — это клетки, которые могут дать начало всем типам клеток зародыша и внезародышевым органам (рис. 1). Сам зародыш преимущественно развивается из клеток, которые находятся внутри морулы (в случае мышиноного эмбриона — после 4-го деления, на 16-клеточной стадии) [1]. В процессе формирования бластоцисты, на стадии 64 клеток, единая популяция разделяется на клетки внутренней клеточной массы и клетки трофобласта, после чего переход между этими клеточными типами невозможен [2]. В процессе имплантации бластоцисты в матку из клеток трофобласта развивается хорион, а из клеток внутренней клеточной массы — три зародышевых листка и связанные с ними внезародышевые органы (желточной мешок, аллантоис и амнион). На стадии бластоцисты и имплантации эмбриональные клетки характеризуют как плюрипотентные, поскольку они могут дифференцироваться как в клетки всех трех зародышевых листков, так и в половые клетки. Выделенные в культуру клетки внутренней клеточной массы бластоцисты обозначают как эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). В связи с различием функциональных и метаболических свойств ЭСК, полученных из внутренней клеточной массы эмбрионов человека и мы-

ши, о которых будет сказано ниже, мы во всех случаях конкретизируем, какой тип клеток имеется в виду — человеческие (чЭСК) или мышинные (мЭСК). После разделения на зародышевые листки стволовые клетки становятся мультипотентными, поскольку способны дифференцироваться только в границах одного зародышевого листка. Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК), выделенные из эмбрионов мышей, существуют в двух функционально различных состояниях. ПСК, полученные из внутренней клеточной массы эмбрионов до имплантации, представляют собой наивные ПСК (naive PSC, mESC, или мЭСК). Клетки, полученные из эпибласта мыши после имплантации эмбриона, получили название праймированные (primed PSC, EpiSC или ЭпиСК). Между ними существует особое функциональное состояние ПСК, именуемое формативные ПСК (formative PSC, Epi-like cells, EpiLC) [3]. И наивные, и формативные, и праймированные ПСК способны к неограниченному росту, дифференцировке в клетки всех трех зародышевых листков *in vitro* и *in vivo* на иммунодефицитных животных, но отличаются в функциональном плане. Если наивные ПСК мыши при подсадке в эмбрион, т.е. в условиях *in vivo*, дают полноценный химерный организм с образованием всех типов клеток, в том числе половых, то у праймированных есть ограничения. Праймированные ПСК не колонизируют эмбрион с образованием химерного организма. Наивные и формативные ПСК, в отличие от праймированных, способны дифференцироваться в половые клетки. Метилирование генома наивных ПСК существенно ниже праймированных, кроме того, различается уровень экспрессии транскрипционных факторов-регуляторов плюрипотентности Nanog, Klf4 и Oct4 (подробнее см. в обзоре Morgani et al. [3]). Различается также и энергетический метаболизм наивных и праймированных ПСК, что будет подробно разобрано ниже [4, 5].

В организме взрослого человека постнатальные СК являются мультипотентными или унипотентными. В последнем случае стволовая клетка способна к самообновлению и дифференцировке только в один определенный вид клеток. Несколько упрощая, постнатальные СК можно разделить на два типа — тканеспецифичные стволовые клетки и мультипотентные стромальные клетки (МСК, также альтернативно называемые мезенхимными стволовыми клетками или мультипотентными мезенхимными стромальными клетками). Тканеспецифичные СК способны к самообновлению и дифференцируются в один или несколько типов клеток определенной ткани. Например, гематопозити-

ческие СК дают начало всем клеткам крови, а эпидермальные СК в течение всей жизни организма дифференцируются в клетки эпидермиса. МСК выявляются в большинстве тканей организма и ключевыми их функциями является формирование стромы органов и тканей, регуляция тканеспецифических стволовых клеток и дифференцировка в клетки мезенхимального ряда, такие как кость, жир и хрящ. Что интересно, если ПСК являются очень быстро пролиферирующими клетками, то постнатальные СК по большей части находятся в покое, лишь изредка выходя из него для обновления клеток ткани или в случае необходимости репарации и/или регенерации повреждения [5].

Изначально особенности метаболизма СК воспринимались исследователями просто как побочный продукт условий их существования. Действительно, зигота, морула и ранняя бластоциста до имплантации в эндометрий синтезируют АТФ в основном за счет потребления лактата, пирувата, аминокислот и жирных кислот, которые они получают из окружающей среды (жидкости полости матки). При этом тотипотентные клетки, входящие на начальных этапах развития в эмбрион, имеют достаточный доступ к кислороду, а ключевым катаболическим путем, служащим для синтеза АТФ, для них является окислительное фосфорилирование [5, 6]. Высокий уровень окислительного фосфорилирования характерен также и для наивных мЭСК, получаемых из мышечных эмбрионов до их имплантации. После имплантации и до развития плаценты доступ кислорода к эмбриону снижен. Клетки эмбриона переходят к анаэробному метаболизму, так же как и праймированные ПСК, выделяемые из эмбриона на этих стадиях [7]. Что интересно, несмотря на то, что уровень окислительного фосфорилирования в наивных ПСК выше, чем в праймированных, эти клетки, как и ПСК в целом, полагаются в основном на гликолитический путь получения АТФ, а митохондрий у них мало, они развиты слабо, и митохондриальный потенциал снижен по сравнению с дифференцированными клетками [8]. Далее, по мере развития плаценты, доступ кислорода к развивающимся тканям и органам становится достаточным для аэробного дыхания. Клетки организма по мере их дифференцировки все в большей степени переходят к окислительному фосфорилированию как основному источнику АТФ. Во взрослом организме постнатальные СК располагаются в особом микроокружении в тканях, называемых нишами, в которых доступность кислорода и питательных веществ может варьировать в широких пределах. Однако в целом в большинстве типов ниш СК доступ кислорода и

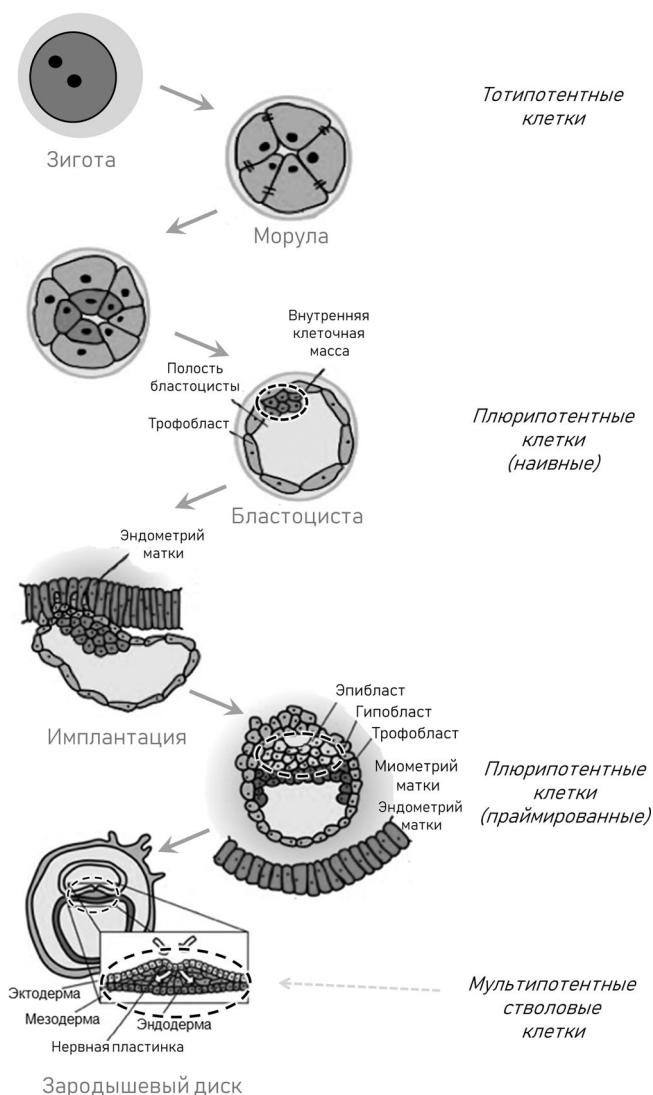


Рис. 1. Схематическое изображение начальных этапов эмбрионального развития мыши. Пунктирными линиями отмечены области эмбриона, из которых выделяют стволовые клетки, характеризующиеся различным потенциалом дифференцировки

питательных веществ ограничен [9, 10]. Общей чертой постнатальных СК является высокая роль гликолитического пути получения энергии.

ПУТИ ВЛИЯНИЯ МЕТАБОЛИЗМА НА ФУНКЦИИ КЛЕТОК

Общей закономерностью изменения метаболизма в процессе дифференцировки клеток является переход от гликолиза, как основного источника АТФ, к окислительному фосфорилированию. В ходе окислительного фосфорилирования пируват, получившийся в процессе глико-

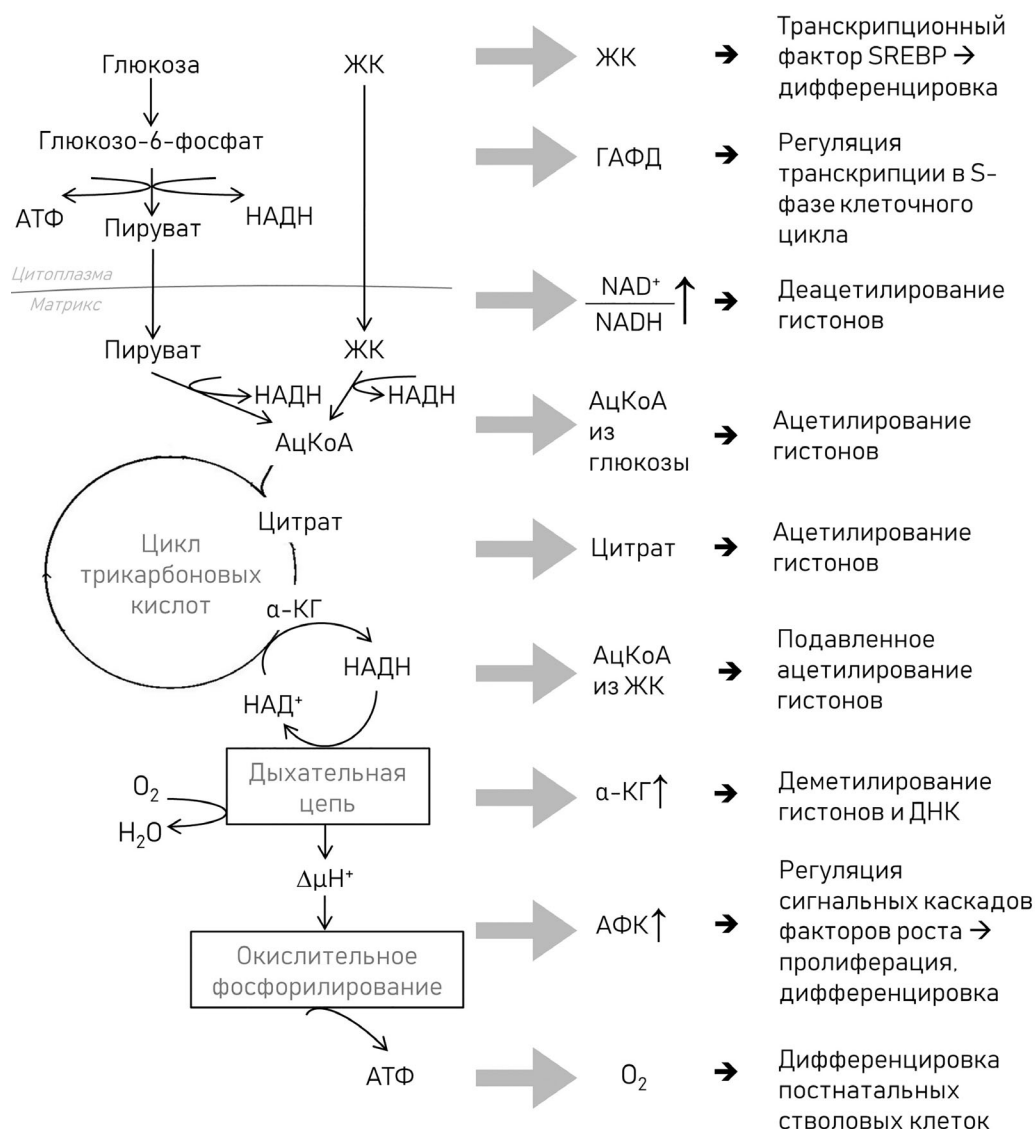


Рис. 2. Участники метаболического пути получения энергии из глюкозы регулируют активность генов на эпигенетическом и транскрипционном уровнях. Сокращения: α КГ – альфа-кетоглутарат, АцКоА – ацетил-кофермент А, ГАФД – D-глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, АФК – активные формы кислорода, $\Delta\mu H^+$ – трансмембранный электрохимический потенциал митохондрий

лиза, входит в митохондрии и превращается там в АцКоА благодаря работе пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК) с участием кофермента NAD^+ , который восстанавливается до $NADH$. АцКоА входит в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК, цикл Кребса, он же цикл лимонной кислоты), где полностью окисляется до двух молекул CO_2 . При этом образуется дополнительно три восстановленных молекулы $NADH$, одна $FADH_2$ и одна молекула АТФ или ГТФ. Получившийся во всех этих реакциях $NADH$ отдает свои электроны в дыхательную цепь, где они, проходя по цепи переноса электронов, дают энергию для создания митохондриального по-

тенциала – трансмембранного электрохимического градиента протонов на внутренней мембране митохондрий. Конечным акцептором электронов в дыхательной цепи является кислород (рис. 2).

Путь катаболизма глюкозы в клетках долгое время рассматривался в основном в призме генерации энергии АТФ. В настоящее время показан ряд других функций веществ–участников метаболических процессов. Они влияют на функционирование СК и необходимы в процессе дифференцировки для синтеза строительных блоков. Кроме того, метаболические процессы эпигенетически регулируют экспрессию генов,

влияя на выбор направления дифференцировки СК. Внутриклеточный баланс метаболитов напрямую влияет на эпигеном посредством посттрансляционных модификаций гистонов, ДНК и транскрипционных факторов [5, 11] (рис. 2).

Например показано, что в некоторых случаях искусственное изменение баланса метаболитических путей может приводить к приобретению клетками фенотипа стволовых. К примеру, при ангиогенезе капилляров эндотелий формирует 2 типа клеток: вершечную клетку, определяющую процесс прорастания капилляра в ткани, и клетки «ствола», формирующие стенки прорастающего капилляра. При этом поддержание каждого из данных фенотипов определяется тем, какие метаболитические пути преобладают в конкретной клетке. Вершечная клетка капилляра использует гликолиз как основной источник энергии, а клетки «ствола» используют окислительное фосфорилирование. При этом в случае экспериментальной активации гликолиза в клетках «ствола» достаточно быстро происходила их трансдифференцировка в новые вершечные клетки и формирование новых точек ветвления капилляров [12]. Таким образом, в организме постоянно идут процессы клеточной дифференцировки и трансдифференцировки, в которых доступность субстратов, скорость продукции АТФ и метаболитов обладает определяющим действием на фенотип клеток.

Регуляция дифференцировки и дедифференцировки клеток при участии метаболитов может осуществляться через несколько специфических механизмов.

1) Активация специфических транскрипционных факторов при изменении концентрации метаболитов. Например, уровень активности транскрипционного фактора SREBP снижается при накоплении в клетке жирных кислот [13], что может происходить при переходе клеток с окислительного фосфорилирования на гликолиз. В свою очередь, SREBP является важным регулятором адипогенной дифференцировки МСК [14].

2) Некоторые метаболитические ферменты сами могут выступать в роли транскрипционных факторов. Например, показано прямое участие фермента гликолиза глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (ГАФД) в сборке транскрипционного комплекса, который регулирует транскрипцию гена гистона H2B во время S-фазы клеточного цикла. Формирование этого комплекса ингибируется NADH и стимулируется при повышении уровня NAD⁺ [15].

3) Большинство ферментов, осуществляющих транскрипцию и ремоделирование хроматина, требуют для своей активности метаболитические

субстраты, такие как АцКоА, АТФ, NADH и др. Таким образом, эти соединения выступают в роли своеобразных метаболитических мессенджеров, способных обеспечивать сопряжение транскрипционной клеточной программы с уровнем активности основных метаболитических каскадов.

Наиболее хорошо изученным на сегодняшний день механизмом воздействия на дифференцировку клеток при участии метаболитов является регуляция эпигенетических модификаций гистонов и ДНК. Ацетилирование гистонов коррелирует с интенсивностью гликолиза. Пировиноградная кислота превращается в АцКоА, который в виде цитрата выходит из митохондрий, и в ядре разделяется на АцКоА и оксалоацетат. АцКоА выступает донором ацетильной группы для гистоновых ацетилаз [5]. Что интересно, в отсутствие поступления глюкозы в клетку, когда основным донором АцКоА для ЦТК являются жирные кислоты, ацетилирование гистонов не повышается [16]. Это может показаться странным, поскольку в митохондриях точно так же образуется цитрат, а молекулы АцКоА не различаются в зависимости от источника их синтеза. Этот феномен может быть объяснен тем, что оксалоацетат из ядра после высвобождения АцКоА не возвращается в митохондрии, соответственно, ЦТК истощается на свои интермедиаты. В случае поступления глюкозы в клетку недостаток оксалоацетата может компенсироваться путем анаплеротических реакций, связанных с активностью пируваткарбоксилазы, которая синтезирует оксалоацетат путем карбоксилирования пирувата. В том же случае, если источником АцКоА являются жирные кислоты, данный тип анаплеротических реакций не работает, и цитрат не выходит из митохондрий.

Деацетилирование гистонов осуществляется большой группой ферментов, называемых гистон-деацетилазы. Представители III класса гистон-деацетилаз, также известные как белки сиртуины, используют NAD⁺ для деацетилирования гистонов. В связи с этим их ферментативная активность зависит от уровня NAD⁺ в ядре, который, по-видимому, коррелирует с его уровнем в цитоплазме, а сами сиртуины рассматривают в качестве эндогенных сенсоров, регистрирующих потенциал NAD⁺/NADH в клетке. Изменения в метаболизме между преимущественно гликолитическим путем и окислительным фосфорилированием неизбежно приводят к изменению потенциала NAD⁺/NADH. Чем выше интенсивность гликолиза, тем большая доля NAD находится в восстановленном состоянии. Повышение доли NAD⁺ в цитоплазме при пере-

ходе клетки к окислительному фосфорилированию может регистрироваться сиртуинами и конвертироваться ими в эпигенетические модификации гистонов и негистоновых белков, подвергающихся деацетилированию [5, 17, 18].

Деметилирование гистонов и ДНК осуществляется ферментами деметилазами. Лизин-специфичная деметилаза (lysine-specific demethylase 1, LSD1) осуществляет деметилирование гистонов [19] с использованием FAD, который в процессе деметилирования восстанавливается до $FADH_2$. Предполагается, что окислительно-восстановительный потенциал FAD/ $FADH_2$ деметилаз, который зависит от метаболического статуса клетки, может влиять на эффективность деметилазной активности LSD1 [20]. Однако ключевые метаболические реакции, в ходе которых происходит восстановление $FADH_2$, а именно, окисление жирных кислот и реакции II комплекса дыхательной цепи, происходят в митохондриях. При этом гистон-деметилаза работает в ядре. Учитывая, что FAD — это простетическая группа фермента, которая не выходит из него после совершения реакции, встает вопрос: каким образом потенциал FAD/ $FADH_2$ из митохондрий транслируется в ядро. Вероятнее всего, окислительно-восстановительный потенциал FAD/ $FADH_2$ деметилаз отражает цитоплазматическое соотношение $NAD^+/NADH$. Таким образом, можно предположить участие метаболических ферментов в регуляции активности LSD1 [5]. Этот фермент привлекает особое внимание исследователей, поскольку показано, что он вызывает деметилирование гистонов и, как следствие, ингибирование энхансерных регионов генов, критически важных для поддержания стволовости ПСК. Это является одним из важных шагов для успешного направления ПСК в дифференцировку [21]. Таким образом, окислительно-восстановительный потенциал FAD, располагающегося в ферментах деметилаз, напрямую влияет на регуляцию направления ПСК в дифференцировку. В то же время вопрос о том, как он соотносится с соответствующим потенциалом митохондрий и цитоплазмы, т.е. с метаболическим статусом клетки, требует дальнейших исследований.

Ряд других деметилаз гистонов (JmJc) и ДНК (TET) в качестве акцептора электронов в окислительно-восстановительной реакции деметилирования используют альфа-кетоглутарат (α -КГ) [22, 23]. α -КГ образуется в процессе прохождения ЦТК, а также при дезаминировании аминокислот глутамата и глутамина. α -КГ посредством селективного переносчика может выходить из митохондрий и участвовать в окислительно-восстановительных реакциях деметили-

рования. Введение в кровоток мышей повышенных концентраций глюкозы, глутамина или глутамата приводит к существенному увеличению активности деметилазы TET в ряде органов [23]. С другой стороны, если стволовая клетка пребывает в условиях недостаточной доступности глюкозы, активность деметилаз JmJc и TET может быть подавлена. Аналогично ситуации с ацетилированием гистонов при участии цитрата, если один из участников ЦТК выходит из него, эта утрата должна компенсироваться за счет анаплеротических реакций, которые в значительной степени зависят от гликолиза. Таким образом, суммируя вышесказанное, метаболические процессы, протекающие в конкретной стволовой клетке, а также доступность глюкозы и кислорода для дыхания могут влиять на эпигенетические процессы регуляции активности генов, как поддерживающих клетку в состоянии стволовости, так и направляющих ее в дифференцировку.

ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Плюрипотентность — это способность клетки к формированию всех трех зародышевых листков в процессе эмбрионального развития организма или при дифференцировке в культуре. В более широком смысле, плюрипотентными называются клетки, которые способны к самообновлению и могут дифференцироваться в ткани, предшественники которых в эмбриональном развитии происходят из разных зародышевых листков. Как было сказано выше, если ПСК из эмбрионов мыши могут выделяться на двух различных стадиях и, соответственно, находиться в двух функциональных состояниях, в виде наивных и праймированных клеток, то чЭСК, выделенные из бластоцисты человека, соответствуют праймированным мышинным ПСК, т.е. ЭпиСК. Как ЭпиСК, так и чЭСК обладают особенностями метаболизма, которые обусловлены этапами развития эмбриона на стадии плюрипотентности после его имплантации (рис. 3).

Первая отличительная черта праймированных ПСК — это преобладание гликолитического пути получения энергии над окислительным фосфорилированием [7, 24]. В ПСК гликолиз занимает ключевую роль в общем энергетическом метаболизме. ПСК активно делятся и, в среднем, нуждаются в большем количестве энергии для своих синтетических процессов, чем дифференцированные клетки. При этом гликолиз — намного менее энергетически эф-

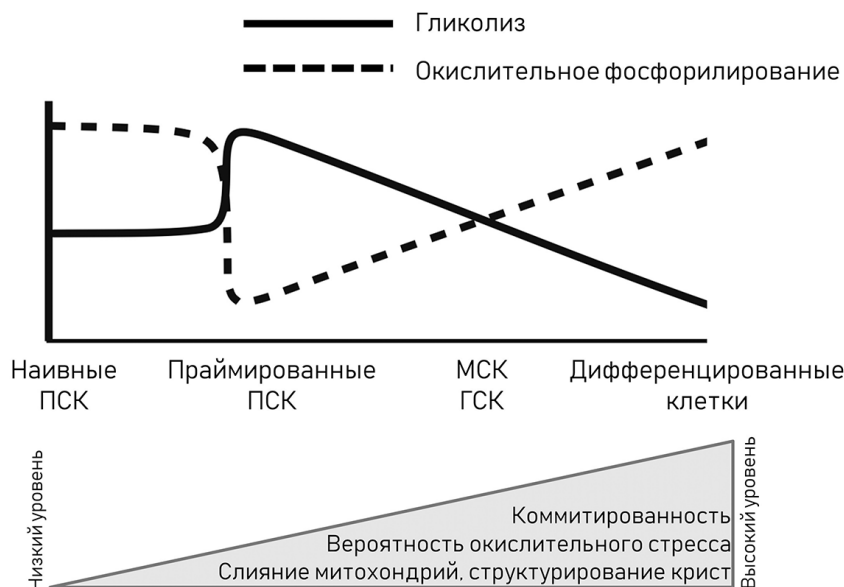


Рис. 3. Схематическое изображение закономерностей изменения уровня гликолиза и окислительного фосфорилирования при дифференцировке клеток из плюрипотентного состояния в дифференцированные клетки

фективный путь катаболизма глюкозы по сравнению с окислительным фосфорилированием. При полном окислении глюкозы с участием окислительного фосфорилирования образуется 32–34 молекулы АТФ на одну молекулу глюкозы, в гликолизе же — только 2 молекулы. Сначала в раковых клетках, а потом в плюрипотентных и некоторых постнатальных стволовых клетках (например, гематopoэтических) был обнаружен эффект перехода метаболизма преимущественно на гликолитический путь даже при высокой концентрации кислорода. При этом подавляется окислительное фосфорилирование и усиливается продукция лактата. Этот способ получения энергии получил название аэробного гликолиза или эффекта Варбурга по фамилии его первооткрывателя (рис. 4) [25, 26]. Предполагается, что необходимость перехода на гликолитический путь производства АТФ связана со скоростью процесса: гликолиз, хотя и является существенно более затратным путем, проходит намного быстрее, чем окислительное фосфорилирование. Вследствие этого суммарный выход АТФ в единицу времени оказывается выше [26]. При дифференцировке ПСК идет переключение метаболических путей, происходит переход от гликолиза к окислительному фосфорилированию в качестве основного и более эффективного пути образования энергии [27].

Клетки, переходящие на аэробный гликолиз, отличаются крайне высокой скоростью пролиферации. Соответственно, второй отличительной чертой ПСК является их быстрая

пролиферация. Это вторая причина, по которой в ПСК наблюдается крайне высокая активность гликолиза, который играет ключевую роль не только в производстве энергии, но и в прохождении ускоренных биосинтетических процессов в активно пролиферирующих клетках. Для активной пролиферации требуется синтез большого количества нуклеотидов, фосфолипидов и аминокислот; некоторые клетки крайне активно синтезируют белки внеклеточного матрикса или сигнальные молекулы. Метаболические процессы играют ключевую роль в образовании строительных блоков для синтезов новых веществ, требуемых для деления и дифференцировки. Существенная часть субстратов для синтеза всех этих молекул происходит из гликолиза и ЦТК (рис. 4). 3-Фосфоглицерат выводится из гликолиза; АцКоА — после ПДК; оксалоацетат, цитрат, альфа-кетоглутарат и сукцинил-КоА выводятся из ЦТК, и все это используется для синтезов [28]. Для компенсации недостающих компонентов цикла Кребса используются анаплеротические реакции, ключевой из которых является реакция пируваткарбоксилазы, которая из пирувата делает оксалоацетат. При этом цикл Кребса оказывается как бы разомкнутым.

Крайне высокий уровень пролиферации в ПСК характеризуется укороченным клеточным циклом. При этом по сравнению с дифференцированными клетками существенно большая часть ПСК находится в S-фазе [29]. В то же время высокая пролиферативная активность ПСК не приводит к их выходу из состояния плюрипо-

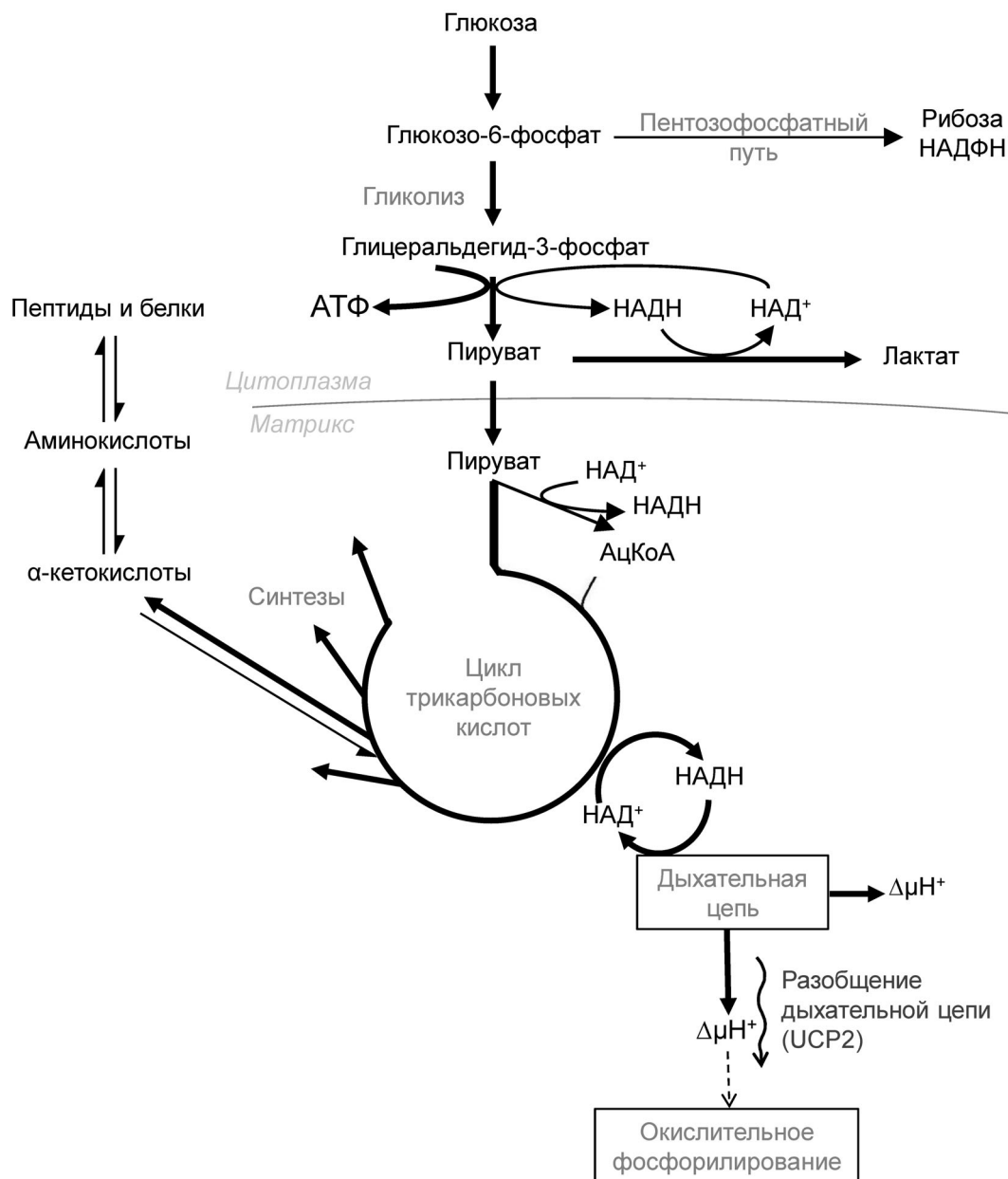


Рис. 4. Изменение ключевых метаболических путей катаболизма глюкозы при активной пролиферации ПСК. В активно пролиферирующих и синтезирующих клетках интермедиаты ЦТК выводятся из цикла и выступают в качестве предшественников синтезируемых веществ — аминокислот, гема, нуклеотидов и др. Недостаток участников ЦТК компенсируется за счет анаплеротических реакций — превращения пирувата в оксалоацетат пируваткарбоксилазой и синтеза α КГ из глутамата и глутамина. Образующиеся при этом молекулы NADH утилизируются частично за счет окислительного фосфорилирования, частично — за счет работы разобщающего белка дыхательной цепи — uncoupling protein 2 (UCP2)

тентности благодаря способности к самообновлению. Самообновление поддерживается уникальными эпигенетическими модификациями хроматина и транскрипционными факторами — регуляторами плюрипотентности Oct4, Nanog и Sox2 [30]. Таким образом, быстрый приток строительных блоков для активно пролиферирующих и синтезирующих ПСК обеспечивается выведением интермедиатов из метаболических ре-

акций и анаплеротическими реакциями [31–33].

В-третьих, в ПСК митохондрии фрагментированные и разрозненные, а уровень окислительного фосфорилирования крайне низок. При этом направление ПСК в дифференцировку характеризуется структурированием митохондрий и их выстраиванием в длинные филаментные структуры [24]. Ультраструктура крист тоже раз-

личается — если в дифференцированных клетках в активно работающих митохондриях линейные ровные кристы расположены упорядоченными стопками, то в ПСК кристы — разрозненные и слабоупорядоченные. При этом нормализованное на общий белок количество митохондрий, а также нормализованная активность цитрат-синтазы существенно не изменяются [24]. Ряд данных свидетельствует о том, что в плюрипотентных клетках меньшие плотность и количество митохондрий по сравнению с дифференцированными клетками. Однако, скорее всего, это ошибочное заключение связано с тем, что ПСК имеют меньший объем цитоплазмы при приблизительно равном размере ядра, то есть имеют более высокий показатель ядерно-цитоплазматического индекса, и при равной плотности расположения митохондрий имеют меньшее их число.

Четвертой характерной чертой ПСК является крайне высокая чувствительность к проапоптотическим стимулам и, одновременно с этим, мощная защита от этих стимулов: высокая концентрация антиоксидантов и наличие системы стабилизации митохондриального мембранного потенциала [31–33]. Несмотря на слабое развитие системы митохондрий, клетки поддерживают высокие значения митохондриального потенциала. Это объясняется тем, что АТФ-синтаза в ПСК работает в значительной степени в направлении гидролиза АТФ для продукции протонного градиента. Это также подтверждается низким уровнем экспрессии ингибиторного фактора 1 (IF1), который в дифференцированных клетках препятствует гидролазной активности АТФ-синтазы [24, 34]. Этим же свойством АТФ-синтазы митохондрий можно объяснить тот факт, что в ПСК уровень дыхания является максимально возможным даже при крайне слабом окислительном фосфорилировании. Это продемонстрировали с использованием разобщителя дыхательной цепи FCCP. При его появлении электрохимический митохондриальный потенциал падает, и клетка, пытаясь компенсировать его, разгоняет дыхание на максимально возможный для конкретных клеток уровень. Если в дифференцированных фибробластах уровень дыхания после добавления FCCP вырастает более чем вдвое, то ПСК — вообще не показывает прироста. Таким образом, низкий уровень дыхания, который наблюдается в ПСК, является максимально возможным для слабоорганизованной митохондриальной системы этих клеток, а АТФ-синтаза за счет гидролазной активности поддерживает высокий уровень электрохимического потенциала митохондрий [24].

Величина электрохимического потенциала митохондрий в ПСК регулируется при помощи разобщающего белка дыхательной цепи UCP2. UCP2 является гомологом белка UCP1 (термогенина), который разобщает дыхательную цепь митохондрий в клетках бурой жировой ткани для производства тепла. Уровень экспрессии UCP2 существенно повышен в ПСК по сравнению с дифференцированными клетками [24]. Например, по сравнению с фибробластами уровень UCP2 в плюрипотентных клетках повышен в 5–10 раз. Другие изоформы разобщителей митохондриального мембранного потенциала UCP1 и UCP3 в ПСК экспрессируются на существенно более низких уровнях. UCP2, в отличие от UCP1, не сбрасывает потенциал до низких значений, а обеспечивает «подтекание» протонов через внутреннюю мембрану митохондрий. Одной из ключевых его функций, как считается, является регулирование уровня электрохимического потенциала митохондрий для защиты от чрезмерно высоких его значений. Эта функция осуществляется за счет того, что активность UCP2 зависит от уровня активных форм кислорода (АФК). При повышении трансмембранного потенциала митохондрий дыхательная цепь замедляется, что приводит к образованию повышенного уровня АФК. АФК активируют UCP2, который сбрасывает излишки протонного градиента. Дыхательная цепь ускоряется, продукция АФК снижается, UCP2 инактивируется. Таким образом, UCP2 выполняет роль своеобразного клапана электрохимического потенциала митохондрий, который служит для предотвращения электрического пробоя «биологического конденсатора» — внутренней мембраны митохондрий [35, 36]. Механизм действия UCP основан на его способности переносить анионы органических кислот из матрикса митохондрий в межмембранное пространство, в результате чего происходит компенсация электрохимического потенциала. В том случае, если переносятся жирные кислоты, они протонируются в межмембранном пространстве и, в результате флип-флоп перехода, могут возвращаться на матриксную сторону мембраны, где дополнительно отдают протон [37].

UCP2 играет важную роль в регуляции метаболического статуса плюрипотентных стволовых клеток. При дифференцировке ПСК происходит снижение экспрессии UCP2, и, вероятно, связанные с этим повышение общего содержания АФК и увеличение мембранного потенциала митохондрий. Эктопическая экспрессия UCP2 приводит к поддержанию стволовости клеток, приводя к снижению экспрессии генов, активируемых при дифференцировке [24]. Роль

UCP2 в поддержании метаболического статуса плюрипотентных клеток не ограничивается только редокс-зависимым сбросом мембранного потенциала для защиты от окислительного стресса. Сброс излишков протонного градиента необходим при существенном повышении синтетической активности клеток, когда ЦТК работает в основном на синтез предшественников синтезируемых веществ. Анаплеротические реакции в этом случае пополняют выводимые из ЦТК интермедиаты, а NADH, как побочный продукт, «сжигается» в дыхательной цепи. Третья возможная роль UCP2 в поддержании гликолитического метаболизма ПСК связана с их способностью переносить из митохондрий анионы органических кислот, в том числе, пируват. В результате этой активности UCP2 выводит пируват из матрикса митохондрий, лишая ПДК субстрата. В дифференцированных клетках это приводит к переключению метаболизма на катаболизм жирных кислот, а в ПСК, в комплексе с другими факторами — к переключению метаболизма на аэробный гликолиз [38].

Лимитирующей скоростью стадией в метаболизме глюкозы в ПСК является не вход глюкозы в клетку, а именно способность клетки ее усвоить [24]. В ПСК достаточное количество глюкозных транспортеров и высокий уровень гексокиназы II, благодаря которой входящая в клетку глюкоза фосфорилируется и задерживается в цитоплазме. С другой стороны, в этих клетках сниженная активность пируватдегидрогеназного комплекса, который вводит пируват в ЦТК. Кроме того, в ПСК активна киназа пируватдегидрогеназы, фосфорилирование которой дополнительно снижает активность ПДК [39].

Функции ПСК регулируются также продуктами обмена аминокислот. Важную роль в этом процессе играет катаболизм треонина. С одной стороны, он ведет к образованию S-аденозилметионина (SAM), который является основным донором метильных групп при метилировании ДНК и гистонов. При этом изменения в уровне SAM могут приводить к значительному изменению уровня метилирования гистонов [40], что определяет эпигенетическое регулирование клеток при изменении метаболизма и скорости катаболизма аминокислот. С другой стороны, треонин является важным регулятором самообновления эмбриональных стволовых клеток. Катаболизм треонина, осуществляемый треонин-дегидрогеназой, приводит к образованию АцКоА и глицина в митохондриях, служащих для синтезов и получения энергии. АцКоА входит в ЦТК и используется для получения клеточной энергии. Глицин является ключевым промежуточным соединением синтеза гемов, входя-

щих в цитохромы, и антиоксидантного агента глутатиона [28]. Глутатион необходим ПСК для поддержания мощной антиоксидантной системы и новых синтезов для быстрой пролиферации клеток. Ингибирование треонин-дегидрогеназы тормозит процесс самообновления ПСК, а избыточная экспрессия способствует индуцированной плюрипотентности [41].

Таким образом, метаболизм ПСК характеризуется ключевой ролью гликолиза в выработке энергии, а ЦТК в основном работает на продукцию строительных блоков для синтезов. Это связано с крайне высокой скоростью пролиферации этих клеток и их синтетической активностью, а также слабым развитием митохондриальной системы.

ПОСТНАТАЛЬНЫЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ СТЕВЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Дифференцировка ПСК в направлении одного из зародышевых листков, мезодермы, эктодермы или энтодермы приводит к превращению плюрипотентных клеток в мультипотентные. В эмбриональном развитии на этой стадии уже начинает образовываться плацента, в результате чего доступ кислорода к эмбриону, который был затруднен после имплантации, возобновляется. В целом, как в процессе эмбрионального развития, так и в культуре, по мере дифференцировки ПСК, все больший вклад в энергетический метаболизм начинает вносить окислительное фосфорилирование. Митохондрии из разрозненных точечных образований превращаются в длинные разветвленные структуры с упорядоченными кристами [24, 42]. Однако в процессе дифференцировки ПСК переход от гликолиза к окислительному фосфорилированию осуществляется не во всех случаях. Например, эктодермальное направление дифференцировки ПСК значительно в меньшей степени приводит к переходу на окислительное фосфорилирование, в отличие от мезодермального и энтодермального направлений [43]. Таким образом, за некоторыми исключениями, переход клеток к мультипотентности сопровождается усилением функций митохондрий и окислительного фосфорилирования в синтезе АТФ.

Постнатальные СК, являющиеся либо мультипотентными, либо унипотентными, проявляют достаточно большую гетерогенность по относительному вкладу окислительного фосфорилирования и аэробного гликолиза в продукцию АТФ. Однако, в среднем, эти клетки занимают промежуточное положение между ПСК и большинством дифференцированных клеток, а за-

кономерности связи стволового потенциала клеток и их метаболического статуса справедливы и для постнатальных СК. Так, локальное микроокружение играет существенную роль в регуляции их функций. Компоненты ниши могут ограничивать доступ кислорода и/или питательных веществ к СК, поддерживая ее в покоем состоянии [10, 44]. На примере двух представителей постнатальных СК рассмотрим особенности энергетического метаболизма стволовых клеток взрослого организма и связанные с этим функции.

Гематopoэтические стволовые клетки наравне с базальными клетками эпителия и эпидермиса являются наиболее активными тканеспецифичными постнатальными СК. ГСК дают начало всем клеткам крови и локализируются в костном мозге. Вследствие ограниченной доступности кислорода в нише костного мозга ГСК постоянно находятся в гипоксических условиях. Гипоксия активирует экспрессию HIF-1 α , что приводит к усилению анаэробного гликолиза. Преимущественно гликолитический метаболический статус ГСК подтверждается низким ми-

тохондриальным потенциалом, продукцией большого количества лактата и низким уровнем АТФ и NADH [45]. Доступность кислорода и связанные с этим доминирующие пути синтеза АТФ играют критическую роль в регуляции функциональной активности ГСК. В костном мозге выявляют два типа ниш ГСК: эндостальную и периваскулярную (рис. 5). Периваскулярная ниша располагается рядом с сосудами и, как следствие, уровень кислорода в ней достаточно высокий. Эндостальная ниша располагается по периферии от периваскулярной, ближе к костной ткани, в ней доступность кислорода существенно ниже. В этих двух нишах располагаются разные по пролиферативному потенциалу и дифференцировочным свойствам ГСК. В эндостальной нише находятся покоящиеся ГСК, которые медленно делятся, характеризуются высоким уровнем HIF-1 α и повышенным анаэробным гликолизом. При переходе ГСК в периваскулярную нишу уровень HIF-1 α снижается, клетки начинают быстрее пролиферировать и направляются в дифференцировку. Выделяют 3 варианта деления ГСК. Покоящиеся ГСК в эн-

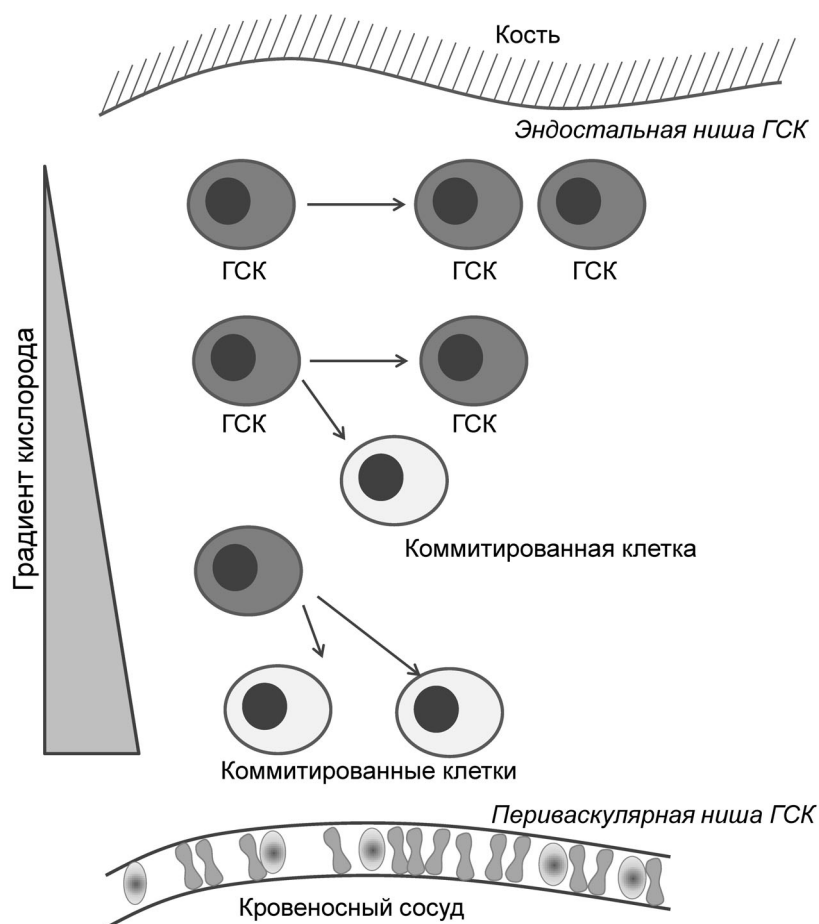


Рис. 5. Дифференцировочная судьба ГСК зависит от доступности кислорода

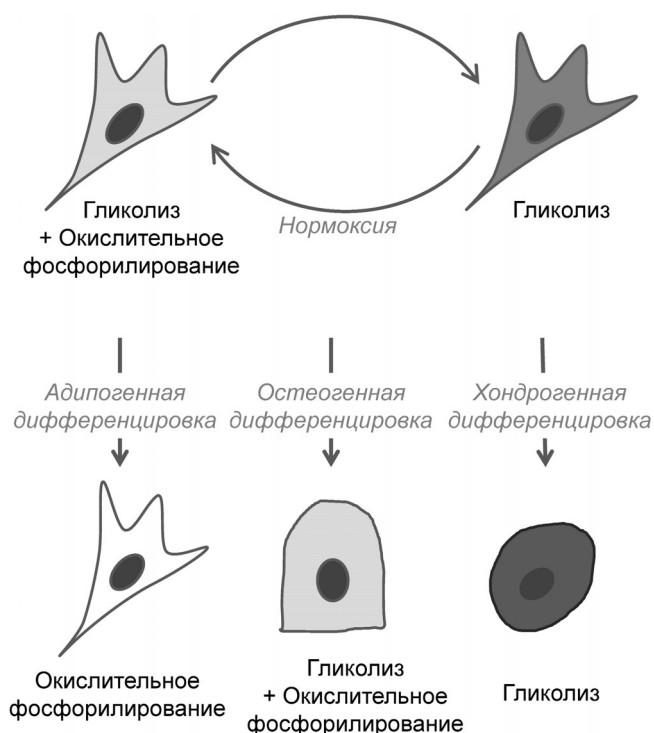


Рис. 6. МСК проявляют метаболическую пластичность, переключаясь на анаэробный гликолиз в условиях гипоксии и возвращаясь к исходному состоянию при нормализации доступа кислорода. При направлении в дифференцировку характер изменения метаболизма клеток зависит от направления дифференцировки

достальной нише делятся редко и живут за счет анаэробного гликолиза. При этом деление симметричное, на выходе образуются две стволовые клетки. ГСК, попадающие в периваскулярную нишу, делятся одним из двух вариантов. Либо асимметрично, в результате чего образуется одна стволовая клетка и одна клетка, коммитированная в дифференцировку. Либо симметрично, но на выходе из деления образуются две коммитированные в дифференцировку клетки. Выбор между двумя последними типами деления ГСК зависит от энергетического метаболизма делящихся клеток [46]. Если в ГСК активен путь β -окисления жирных кислот, то СК подвергаются асимметричному делению с поддержанием самообновления. Если же этот путь либо подавлен физиологическими стимулами, либо подавлен фармакологически, то стволовая клетка делится на две коммитированные гематopoэтические клетки [47]. Дифференцирующиеся ГСК используют для получения энергии окислительное фосфорилирование и делятся с образованием только более дифференцированных клеток. Любые воздействия, активирующие окислительное фосфорилирование, в ГСК приводят к дифференцировке клеток [46]. Таким образом, метабо-

лизм является одним из ключевых регуляторов направления дифференцировки ГСК.

Мультипотентные стромальные клетки представляют собой постнатальные СК, встречающиеся в большинстве тканей организма, которые могут дифференцироваться в ряд типов клеток мезенхимного направления, таких как адипоциты, остеобласты и хондробласты, но, по видимому, *in vivo* делают это крайне редко [48, 49]. Более важной их функцией является организация комплекса компонентов микроокружения и регуляции тканеспецифичных стволовых и дифференцированных клеток, что можно назвать понятием «строма» в широком смысле этого слова. Например, МСК костного мозга являются ключевыми и необходимыми посредниками между симпатической регуляцией кроветворения и ГСК [50]. МСК преимущественно располагаются периваскулярно, регистрируют гормональный фон организма и получают сигналы от симпатической нервной системы [51, 52]. МСК конвертируют эти сигналы в спектр паракринных факторов и регуляторных микровезикул, благодаря чему выступают ключевыми факторами поддержания гомеостаза ткани и регуляторами процессов репарации и регенерации [53, 54], а также регулируют функционирование иммунных клеток в ткани [55].

МСК проявляют очень высокую пластичность в способности переключаться между окислительным фосфорилированием и гликолизом для выбора наиболее оптимального пути получения энергии (рис. 6). При этом в МСК в условиях нормоксии активны как окислительное фосфорилирование, так и гликолитический путь получения энергии. По некоторым оценкам, в культуре МСК вклад окислительного фосфорилирования в продукцию АТФ составляет ~30%, а остальное — аэробный гликолиз [56]. МСК можно перевести в 3D-культуру путем их культивирования при низкой плотности посадки и определенном составе среды. При этом МСК самоорганизуются в клональные мезенсферы, внутри которых популяция СК поддерживается существенно дольше, чем в расплавленной культуре клеток [50]. После перехода МСК в 3D-культуру в них существенно снижается общий уровень метаболизма. Уменьшается как продукция лактата, так и уровень потребления кислорода, нормированные на количество клеток [56]. Проявляя метаболическую пластичность, МСК оказываются устойчивы к гипоксии, переходя на анаэробный гликолиз. При этом МСК не теряют своих способностей к дифференцировке, а сам переход носит обратимый характер [57]. Считается, что метаболическая пластичность необходима МСК для успешного

функционирования в условиях ишемии после повреждения ткани, когда МСК должны производить репарацию повреждения.

Преимущественно гликолитический метаболизм, даже в условиях достаточного поступления кислорода, играет существенную роль в поддержании пролиферации, секреторной функции и выбора направления дифференцировки МСК [58]. При гипоксии происходит активация HIF-1 α , что приводит к повышению экспрессии ферментов анаэробного гликолиза и снижению уровня окислительного фосфорилирования за счет ингибирования ПДК [59]. Однако и в условиях нормоксии МСК продолжают поддерживать высокий уровень гликолиза за счет сохранения экспрессии HIF-1 α . Это необходимо для поддержания высокой синтетической активности клеток, а также продукции антиоксидантов для предотвращения окислительного стресса. Кроме того, невысокая активность митохондрий дополнительно снижает вероятность образования АФК [58, 60]. Совместно мощная антиоксидантная защита и низкий уровень продукции АФК приводят к тому, что МСК проявляют крайне высокую устойчивость к апоптозу [61]. Направление МСК в дифференцировку, так же, как и в случае ПСК, изменяет метаболический статус клеток. При этом характер изменения метаболизма зависит от того, в какой тип клеток дифференцируются МСК. При адипогенной дифференцировке происходит переключение МСК с преимущественно гликолитической продукции АТФ на окислительное фосфорилирование. При этом существенно снижается продукция лактата, повышается потребление кислорода. В то же время значительно повышается экспрессия белков-разобщителей митохондрий (UCP1, UCP2 и UCP3) [62]. Это может свидетельствовать о том, что ЦТК работает не только на обеспечение энергетических нужд, но и для снабжения дифференцирующихся клеток необходимыми для синтезов интермедиатами аналогично тому, как ПСК используют интермедиаты ЦТК (рис. 2). Блокирование дыхательной цепи или помещение клеток в условия гипоксии приводит к подавлению адипогенной дифференцировки [62]. При хондрогенной дифференцировке МСК сохраняется преимущественно гликолитический путь получения АТФ. Это может быть связано с особенностями хрящевой ткани, которая не снабжается кровью, в связи с чем хондробласты функционируют в условиях гипоксии [56]. Данные по поводу изменения метаболизма МСК в процессе остеогенной дифференцировки разнятся. Ряд авторов утверждает, что клетки при этом переходят на аэробный метаболизм с преобладанием

окислительного фосфорилирования [63]. Другие же показали, что дифференцирующиеся МСК сохраняют высокий уровень гликолиза и его значительное участие в продукции АТФ [64]. Эти противоречия могут быть вызваны тем, что в процессе остеогенной дифференцировки клеточный энергетический метаболизм изменяется нелинейно. Так, на первом этапе дифференцировки МСК активно пролиферируют, при этом в них доминирует гликолитический путь получения энергии, а ЦТК используется как источник метаболитов для синтеза структур в делящихся клетках. Далее, когда клетки переходят непосредственно к остеогенной дифференцировке, для синтеза энергии используется преимущественно окислительное фосфорилирование [65]. Таким образом, МСК, в отличие от тканеспецифичных мультипотентных клеток, проявляют существенную метаболическую пластичность, которая позволяет им эффективно выполнять свои функции как в условиях нормального снабжения ткани кислородом, так и в условиях гипоксии.

МЕТАБОЛИЗМ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СТЕВОВЫХ КЛЕТОК

Как было показано выше, в процессе дифференцировки СК происходят существенные изменения метаболических путей получения энергии клетками. Более того, интермедиаты метаболических процессов сами влияют на эффективность дифференцировки. Таким образом, метаболический статус клеток и их стволовый потенциал являются взаимосвязанными и обоюдно зависимыми признаками. С практической точки зрения было бы полезно научиться управлять дифференцировочными свойствами СК для их контролируемого применения в регенеративной медицине. Например, для большинства стволовых клеток актуально стоит вопрос о как можно более однородной дифференцировке в нужном направлении без побочных продуктов. А для использования индуцированных ПСК в медицине на первых же этапах встает еще более серьезный вопрос о вероятном образовании тератом в том случае, если в популяции останутся хотя бы небольшие группы плюрипотентных клеток. Ниже будут рассмотрены некоторые примеры того, как, воздействуя на метаболизм СК, можно влиять на их способность к дифференцировке.

Величина митохондриального мембранного потенциала является фактором, регулирующим стволовый и дифференцировочный потенциал ПСК. Для демонстрации этого мышинные ЭСК

культивировали в метастабильном состоянии в среде, содержащей LIF, но без ингибиторов сигнальных путей MAPK и Gsk3, которые промотируют переход наивных мышиных ЭСК в праймированное состояние. В этом состоянии ПСК демонстрируют гетерогенность по митохондриальному мембранному потенциалу. Клетки разделили при помощи клеточного сортера на клетки с высоким и низким митохондриальным потенциалом. Такие клетки не различаются внешне и по экспрессии маркеров и факторов плюрипотентности, но отличаются функционально. Клетки с высоким мембранным потенциалом имеют существенно повышенный уровень метаболизма, поскольку у них повышен как уровень потребления кислорода, так и продукции лактата, что свидетельствует о том, что у них усилен и гликолиз, и дыхание. Эти клетки крайне плохо направляются в мезодермальную дифференцировку, но при подсадке *in vivo* образуют тератомы с формированием клеток всех трех зародышевых листков. Клетки с пониженным мембранным потенциалом эффективно направляются в мезодермальную дифференцировку [66]. Можно предположить, что клетки с высоким потенциалом митохондрий находятся в состоянии наивных мЭСК, у которых повышен уровень окислительного фосфорилирования, а клетки с низким митохондриальным потенциалом схожи с праймированными ЭпиСК.

Искусственное воздействие на митохондриальный потенциал также изменяет дифференцировочные характеристики ПСК. Так, если культивировать мЭСК или чЭСК в среде, содержащей митохондриальный разобщитель CCCP, уровень пролиферации падает, а экспрессия транскрипционных факторов плюрипотентности Oct4, Nanog и Sox2 растет. Это сопровождается снижением уровня дыхания и повышением активности анаэробного гликолиза, сопровождающегося продукцией лактата [67]. Если направить мЭСК в дифференцировку в присутствии CCCP, то, несмотря на то что экспрессия транскрипционных факторов плюрипотентности снижается так же, как и в необработанных клетках, в популяции сохраняются клетки, способные образовывать тератомы. При подсадке мыши дифференцированных мЭСК, обработанных CCCP, частота образования тератом су-

щественно выросла по сравнению с необработанными клетками [67].

В линиях ПСК, а также на начальных этапах направления их в дифференцировку, одним из основных питательных веществ является глутамин. Он обеспечивает анаплеротические реакции ЦТК в активно пролиферирующих клетках, превращаясь в глутамат и метаболиты ЦТК. Кроме того, глутамин активирует UCP2, который, как было сказано выше, является важным регулятором метаболизма ПСК. Депривация клеток в питательной среде без глутамина приводит к значительному снижению количества метаболитов ЦТК, при этом пируват не компенсирует этот недостаток [43]. Таким образом, регулируя доступность глутамина для ПСК, можно пробовать останавливать процесс самоподдержания плюрипотентных клеток при направлении их в дифференцировку.

Использование стволовых плюрипотентных и мультипотентных клеток в регенеративной медицине открывает крайне широкие возможности для восстановления тканей и целых органов человека. Однако до того, как эти клетки смогут использоваться в широкой практике, требуется существенно расширить наши знания о механизмах функционирования и регуляции этих клеток. Причем, метаболизм СК является не только маркером их стволового статуса, но и активным действующим лицом, воздействуя на которое потенциально можно управлять процессом дифференцировки стволовых клеток.

Финансирование. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-015-00421), (П.А.Т.-К.) в части регуляции метаболизма плюрипотентных стволовых клеток, а также Российским научным фондом (грант № 19-75-30007) в части регуляции метаболизма постнатальных стволовых клеток (К.Ю.К.). П.А.Т.-К. поддержан стипендией Президента России для молодых ученых СП-2903.2019.4.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pedersen, R.A., Wu, K., and Balakier, H. (1986) Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection, *Dev. Biol.*, **117**, 581–595, doi: 10.1016/0012-1606(86)90327-1.
2. Гилберт С.Ф. (2010) *Биология развития*, Политехника, Санкт-Петербург.
3. Morgani, S., Nichols, J., and Hadjantonakis, A.K. (2017) The many faces of Pluripotency: *in vitro* adaptations of a

- continuum of *in vivo* states, *BMC Dev. Biol.*, **17**, 7, doi: 10.1186/s12861-017-0150-4.
4. Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N., and Hanna, J.H. (2016) Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 155.
 5. Ryall, J.G., Cliff, T., Dalton, S., and Sartorelli, V. (2015) Metabolic reprogramming of stem cell epigenetics, *Cell Stem Cell*, **17**, 651–662, doi: 10.1016/j.stem.2015.11.012.
 6. Martin, K.L., and Leese, H.J. (1995) Role of glucose in mouse preimplantation embryo development, *Mol. Reprod. Dev.*, **40**, 436–443, doi: 10.1002/mrd.1080400407.
 7. Houghton, F.D., Thompson, J.G., Kennedy, C.J., and Leese, H.J. (1996) Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo, *Mol. Reprod. Dev.*, **44**, 476–485, doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199608)44:4<476::AID-MRD7>3.0.CO;2-I.
 8. Prigione, A., and Adjaye, J. (2010) Modulation of mitochondrial biogenesis and bioenergetic metabolism upon *in vitro* and *in vivo* differentiation of human ES and iPS cells, *Int. J. Dev. Biol.*, **54**, 1729–1741, doi: 10.1387/ijdb.103198ap.
 9. Morrison, S.J., and Spradling, A.C. (2008) Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life, *Cell*, **132**, 598–611, doi: 10.1016/j.cell.2008.01.038.
 10. Нимирицкий П., Сагарадзе Г., Ефименко А., Макаревич П., Ткачук В. (2018) Ниша стволовой клетки, *Цитология*, **60**.
 11. Moussaieff, A., Kogan, N.M., and Aberdam, D. (2015) Concise review: energy metabolites: key mediators of the epigenetic state of pluripotency, *Stem Cells*, **33**, 2374–2380, doi: 10.1002/stem.2041.
 12. Rivera, L.B., and Bergers, G. (2014) Angiogenesis. Targeting vascular sprouts, *Science*, **344**, 1449–1450, doi: 10.1126/science.1257071.
 13. Kim, H.J., Miyazaki, M., Man, W.C., and Ntambi, J.M. (2002) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) as regulators of lipid metabolism: polyunsaturated fatty acids oppose cholesterol-mediated induction of SREBP-1 maturation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **967**, 34–42, doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04261.x.
 14. Inoue, J., Kumagai, H., Terada, T., Maeda, M., Shimizu, M., and Sato, R. (2001) Proteolytic activation of SREBPs during adipocyte differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 1157–1161, doi: 10.1006/bbrc.2001.4915.
 15. Zheng, L., Roeder, R.G., and Luo, Y. (2003) S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component, *Cell*, **114**, 255–266, doi: 10.1016/s0092-8674(03)00552-x.
 16. Wellen, K.E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U.M., Bui, T.V., Cross, J.R., and Thompson, C.B. (2009) ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation, *Science*, **324**, 1076–1080, doi: 10.1126/science.1164097.
 17. Ryall, J.G. (2012) The role of sirtuins in the regulation of metabolic homeostasis in skeletal muscle, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, **15**, 561–566, doi: 10.1097/MCO.0b013e3283590914.
 18. Canto, C., Menzies, K.J., and Auwerx, J. (2015) NAD(+) Metabolism and the control of energy homeostasis: a balancing act between mitochondria and the nucleus, *Cell Metab.*, **22**, 31–53, doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.023.
 19. Shi, Y.J., Matson, C., Lan, F., Iwase, S., Baba, T., and Shi, Y. (2005) Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors, *Mol. Cell*, **19**, 857–864, doi: 10.1016/j.molcel.2005.08.027.
 20. Hirano, K., and Namihira, M. (2017) FAD influx enhances neuronal differentiation of human neural stem cells by facilitating nuclear localization of LSD1, *FEBS Open Bio*, **7**, 1932–1942, doi: 10.1002/2211-5463.12331.
 21. Whyte, W.A., Bilodeau, S., Orlando, D.A., Hoke, H.A., Frampton, G.M., Foster, C.T., Cowley, S.M., and Young, R.A. (2012) Enhancer decommissioning by LSD1 during embryonic stem cell differentiation, *Nature*, **482**, 221–225, doi: 10.1038/nature10805.
 22. Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins, *Nature*, **439**, 811–816, doi: 10.1038/nature04433.
 23. Yang, H., Lin, H., Xu, H., Zhang, L., Cheng, L., Wen, B., Shou, J., Guan, K., Xiong, Y., and Ye, D. (2014) TET-catalyzed 5-methylcytosine hydroxylation is dynamically regulated by metabolites, *Cell Res.*, **24**, 1017–1020, doi: 10.1038/cr.2014.81.
 24. Zhang, J., Khvorostov, I., Hong, J.S., Oktay, Y., Vergnes, L., Nuebel, E., Wahjudi, P.N., Setoguchi, K., Wang, G., Do, A., Jung, H.J., McCaffery, J.M., Kurland, I.J., Reue, K., Lee, W.N., Koehler, C.M., and Teitell, M.A. (2011) UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells, *EMBO J.*, **30**, 4860–4873, doi: 10.1038/emboj.2011.401.
 25. Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927) The metabolism of tumors in the body, *J. Gen. Physiol.*, **8**, 519–530, doi: 10.1085/jgp.8.6.519.
 26. Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *Science*, **324**, 1029–1033, doi: 10.1126/science.1160809.
 27. Rodimova, S.A., Meleshina, A.V., Kalabusheva, E.P., Dashinimaev, E.B., Reunov, D.G., Torgomyan, H.G., Vorotelyak, E.A., and Zagaynova, E.V. (2019) Metabolic activity and intracellular pH in induced pluripotent stem cells differentiating in dermal and epidermal directions, *Methods Appl. Fluoresc.*, **7**, 044002, doi: 10.1088/2050-6120/ab3b3d.
 28. Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2005) *Lehninger principles of biochemistry*, WH Freeman and Company, New York, pp. 1216.
 29. Becker, K.A., Ghule, P.N., Therrien, J.A., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., and Stein, G.S. (2006) Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase, *J. Cell. Physiol.*, **209**, 883–893, doi: 10.1002/jcp.20776.
 30. Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells, *Cell*, **122**, 947–956, doi: 10.1016/j.cell.2005.08.020.
 31. Madden, D.T., Davila-Kruger, D., Melov, S., and Bredesen, D.E. (2011) Human embryonic stem cells express elevated levels of multiple pro-apoptotic BCL-2 family members, *PLoS One*, **6**, e28530, doi: 10.1371/journal.pone.0028530.
 32. Setoguchi, K., TeSlaa, T., Koehler, C.M., and Teitell, M.A. (2016) P53 Regulates rapid apoptosis in human pluripotent stem cells, *J. Mol. Biol.*, **428**, 1465–1475, doi: 10.1016/j.jmb.2015.07.019.
 33. Saretzki, G., Armstrong, L., Leake, A., Lako, M., and von Zglinicki, T. (2004) Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells, *Stem Cells*, **22**, 962–971, doi: 10.1634/stemcells.22-6-962.
 34. Dahan, P., Lu, V., Nguyen, R.M.T., Kennedy, S.A.L., and Teitell, M.A. (2019) Metabolism in pluripotency: both driver and passenger? *J. Biol. Chem.*, **294**, 5420–5429, doi: 10.1074/jbc.TM117.000832.

35. Krauss, S., Zhang, C.Y., and Lowell, B.B. (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 248–261, doi: 10.1038/nrm1572.
36. Diano, S., and Horvath, T.L. (2012) Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism, *Trends Mol. Med.*, **18**, 52–58, doi: 10.1016/j.molmed.2011.08.003.
37. Berardi, M.J., and Chou, J.J. (2014) Fatty acid flippase activity of UCP2 is essential for its proton transport in mitochondria, *Cell Metab.*, **20**, 541–552, doi: 10.1016/j.cmet.2014.07.004.
38. Bouillaud, F. (2009) UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 377–383, doi: 10.1016/j.bbabi.2009.01.003.
39. Varum, S., Rodrigues, A.S., Moura, M.B., Momcilovic, O., Easley, C.A. 4th, Ramalho-Santos, J. Van Houten, B., and Schatten, G. (2011) Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts, *PLoS One*, **6**, e20914.
40. Zee, B.M., Levin, R.S., Xu, B., LeRoy, G., Wingreen, N.S., and Garcia, B.A. (2010) In vivo residue-specific histone methylation dynamics, *J. Biol. Chem.*, **285**, 3341–3350, doi: 10.1074/jbc.M109.063784.
41. Chen, G., and Wang, J. (2019) A regulatory circuitry locking pluripotent stemness to embryonic stem cell: interaction between threonine catabolism and histone methylation, *Semin. Cancer Biol.*, **57**, 72–78, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.01.005.
42. Cho, Y.M., Kwon, S., Pak, Y.K., Seol, H.W., Choi, Y.M., Park, D.J., Park, K.S., and Lee, H.K. (2006) Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **348**, 1472–1478, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.08.020.
43. Lu, V., Dahan, P., Ahsan, F.M., Patananan, A.N., Roy, I.J., Torres, A. Jr., Nguyen, R.M.T., Huang, D., Braas, D., and Teitell, M.A. (2019) Mitochondrial metabolism and glutamine are essential for mesoderm differentiation of human pluripotent stem cells, *Cell Res.*, **29**, 596–598, doi: 10.1038/s41422-019-0191-2.
44. Novoseletskaya, E.S., Grigorieva, O.A., Efimenko, A.Y., and Kalinina, N.I. (2019). Extracellular matrix in the regulation of stem cell differentiation, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 232–240.
45. Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R.J., Mahmoud, A.I., Olson, E.N., Schneider, J.W., Zhang, C.C., and Sadek, H.A. (2010) The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche, *Cell Stem Cell*, **7**, 380–390, doi: 10.1016/j.stem.2010.07.011.
46. Oburoglu, L., Romano, M., Taylor, N., and Kinet, S. (2016) Metabolic regulation of hematopoietic stem cell commitment and erythroid differentiation, *Curr. Opin. Hematol.*, **23**, 198–205, doi: 10.1097/MOH.0000000000000234.
47. Ito, K., Carracedo, A., Weiss, D., Arai, F., Ala, U., Avigan, D.E., Schafer, Z.T., Evans, R.M., Suda, T., Lee, C.H., and Pandolfi, P.P. (2012) A PML-PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance, *Nat. Med.*, **18**, 1350–1358, doi: 10.1038/nm.2882.
48. Kalinina, N.I., Sysoeva, V.Y., Rubina, K.A., and Tkachuk, V.A. (2011) Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair, *Acta Naturae*, **3**, 32–39.
49. Murray, I.R., West, C.C., Hardy, W.R., James, A.W., Park, T.S., Nguyen, A., Tawonsawatruk, T., Lazzari, L., Soo, C., and Peault, B. (2014) Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels, *Cell. Mol. Life Sci.*, **71**, 1353–1374, doi: 10.1007/s00018-013-1462-6.
50. Mendez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche, *Nature*, **466**, 829–834, doi: 10.1038/nature09262.
51. Kotova, P.D., Sysoeva, V.Y., Rogachevskaja, O.A., Bystrova, M.F., Kolesnikova, A.S., Tyurin-Kuzmin, P.A., Fadeeva, J.I., Tkachuk, V.A., and Kolesnikov, S.S. (2014) Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue, *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 1899–1908, doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.002.
52. Tyurin-Kuzmin, P.A., Fadeeva, J.I., Kanareikina, M.A., Kalinina, N.I., Sysoeva, V.Y., Dyikanov, D.T., Stambolsky, D.V., and Tkachuk, V.A. (2016) Activation of beta-adrenergic receptors is required for elevated α 1A-adrenoreceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells, *Sci. Rep.*, **6**, 32835, doi: 10.1038/srep32835.
53. Sysoeva, V.Y., Ageeva, L.V., Tyurin-Kuzmin, P.A., Sharonov, G.V., Dyikanov, D.T., Kalinina, N.I., and Tkachuk, V.A. (2017) Local angiotensin II promotes adipogenic differentiation of human adipose tissue mesenchymal stem cells through type 2 angiotensin receptor, *Stem Cell Res.*, **25**, 115–122, doi: 10.1016/j.scr.2017.10.022.
54. Lopatina, T., Bruno, S., Tetta, C., Kalinina, N., Porta, M., and Camussi, G. (2014) Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential, *Cell Commun. Signal.*, **12**, 26, doi: 10.1186/1478-811X-12-26.
55. Rubtsov, Y.P., Suzdaltseva, Y.G., Goryunov, K.V., Kalinina, N.I., Sysoeva, V.Y., and Tkachuk, V.A. (2012) Regulation of immunity via multipotent mesenchymal stromal cells, *Acta Naturae*, **4**, 23–31.
56. Pattappa, G., Heywood, H.K., de Bruijn, J.D., and Lee, D.A. (2011) The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation, *J. Cell. Physiol.*, **226**, 2562–2570, doi: 10.1002/jcp.22605.
57. Mylotte, L.A., Duffy, A.M., Murphy, M., O'Brien, T., Samali, A., Barry, F., and Szegezdi, E. (2008) Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment, *Stem Cells*, **26**, 1325–1336, doi: 10.1634/stemcells.2007-1072.
58. Liu, Y., and Ma, T. (2015) Metabolic regulation of mesenchymal stem cell in expansion and therapeutic application, *Biotechnol. Prog.*, **31**, 468–481, doi: 10.1002/btpr.2034.
59. Hsu, Y.C., Wu, Y.T., Yu, T.H., and Wei, Y.H. (2016) Mitochondria in mesenchymal stem cell biology and cell therapy: from cellular differentiation to mitochondrial transfer, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **52**, 119–131, doi: 10.1016/j.semcdb.2016.02.011.
60. Palomaki, S., Pietila, M., Laitinen, S., Pesala, J., Sormunen, R., Lehenkari, P., and Koivunen, P. (2013) HIF-1 α is upregulated in human mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, **31**, 1902–1909, doi: 10.1002/stem.1435.
61. Рылова Ю., Андреева Е., Гогвадзе В., Животовский Б., Буравкова Л. (2012) Этопозид и гипоксия не активируют апоптоз мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток *in vitro*, *Клеточные технологии в биологии и медицине*, **3**, 148–151.
62. Zhang, Y., Marsboom, G., Toth, P.T., and Rehman, J. (2013) Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *PLoS One*, **8**, e77077, doi: 10.1371/journal.pone.0077077.
63. Chen, C.T., Shih, Y.R.V., Kuo, T.K., Lee, O.K., and Wei, Y.H. (2008) Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation

- of human mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, **26**, 960–968.
64. Esen, E., Chen, J., Karner, C.M., Okunade, A.L., Patterson, B.W., and Long, F. (2013) WNT-LRP5 signaling induces Warburg effect through mTORC2 activation during osteoblast differentiation, *Cell Metab.*, **17**, 745–755, doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.017.
65. Shum, L.C., White, N.S., Mills, B.N., Bentley, K.L., and Elisei, R.A. (2016) Energy metabolism in mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation, *Stem Cells Dev.*, **25**, 114–122, doi: 10.1089/scd.2015.0193.
66. Schieke, S.M., Ma, M., Cao, L., McCoy, J.P. Jr., Liu, C., Hensel, N.F., Barrett, A.J., Boehm, M., and Finkel, T. (2008) Mitochondrial metabolism modulates differentiation and teratoma formation capacity in mouse embryonic stem cells, *J. Biol. Chem.*, **283**, 28506–28512, doi: 10.1074/jbc.M802763200.
67. Mandal, S., Lindgren, A.G., Srivastava, A.S., Clark, A.T., and Banerjee, U. (2011) Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells, *Stem Cells*, **29**, 486–495.

METABOLIC REGULATION OF MAMMALIAN STEM CELLS DIFFERENTIATION

Review

P. A. Tyurin-Kuzmin^{1*}, A. Yu. Molchanov², V. I. Chechekhin¹,
A. M. Ivanova¹, and K. Yu. Kulebyakin¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine,
Department of Biochemistry and Molecular Medicine, 119991 Moscow, Russia; E-mail: tyurinkuzmin.p@gmail.com

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

Received October 28, 2019

Revised January 19, 2020

Accepted January 19, 2020

Proliferation and differentiation of stem cells are required for the formation of a normal tissue structure, for the maintenance of its homeostasis, and for the repair from damage. A distinctive feature of these cells is the unique organization of metabolic pathways, in which the contribution of various energy production pathways to the general cellular metabolism is radically different from that of differentiated cells. Changes in metabolism during the differentiation of both embryonic and postnatal stem cells have several specific features. Moreover, changes in stem cell metabolism are not just a consequence of differentiation, but also an active regulator of this process. Metabolic enzymes and intermediates regulate and direct the processes of maintaining stemness, self-renewal and differentiation of stem cells. Here we discuss the patterns and molecular mechanisms of switching of stem cells' metabolism on their transition from a pluripotent to differentiated state with particular emphasis on how metabolic processes in cells regulate their functions, their ability to differentiate, and the choice of a specific direction of stem cell development.

Keywords: metabolism, pluripotent stem cells, mesenchymal stem cells, glycolysis, oxidative phosphorylation

УДК 577.21

НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДОВ В МОЗГЕ: ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ПОДХОДЫ К ИХ ИССЛЕДОВАНИЮ (ПЕПТИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МОЗГА)

Обзор

© 2020 И.Б. Филиппенков*, Л.В. Дергунова, С.А. Лимборская, Н.Ф. Мясоєдов

Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, Россия; электронная почта: Filippenkov@img.ras.ru

Поступила в редакцию 05.12.2019

После доработки 05.12.2019

Принята к публикации 11.12.2019

В настоящее время все большее значение придается изучению механизмов действия лекарственных средств на основе естественных регуляторных пептидов. Особое внимание уделяется пептидным препаратам, способствующим восстановлению функций мозга после острого нарушения мозгового кровообращения (инсульта), которое продолжает уже многие годы оставаться одной из главных угроз для здоровья человека. Однако молекулярно-генетические изменения в мозге в ответ на ишемию, а также механизмы протективных эффектов пептидов изучены недостаточно, что ограничивает их применение и затрудняет разработку новых более эффективных препаратов со специализированным воздействием на функции мозга. Перспективным подходом для изучения механизмов повреждающего действия ишемии мозга, а также механизмов нейропротективных эффектов пептидных препаратов является транскриптомный анализ. Помимо мРНК, направляющих синтез белка, большое значение имеет изучение роли регуляторных РНК при ишемии для разработки новых стратегий нейропротекции. Наибольший интерес представляют микроРНК, а также циклические РНК (циклоРНК), которые имеют замкнутую структуру и преимущественно мозгоспецифическую экспрессию. ЦиклоРНК могут взаимодействовать с микроРНК, нивелировать их активность и тем самым препятствовать микроРНК-опосредованной репрессии мРНК. В последнее время становится очевидным, что анализ системы взаимодействий циклоРНК–микроРНК–мРНК является важной составляющей для детального изучения механизмов повреждения и восстановления. В данном обзоре представлены результаты анализа изменений работы генов при развитии ишемического повреждения, изучения транскриптомного профиля клеток мозга под действием пептидов в условиях экспериментальной ишемии мозга, а также сформулированы основные принципы механизмов пептидной регуляции при ишемическом повреждении.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: транскриптомика, регуляторные пептиды, ишемия мозга, мРНК, некодирующие РНК, микроРНК, циклические РНК.

DOI: 10.31857/S0320972520030033

Регуляторные пептиды – универсальные эндогенные биологические вещества пептидной природы, основное назначение которых заключается в интеграции нервной, эндокринной и иммунной систем в единый функциональный континуум [1]. Многочисленные пептиды, та-

кие как энкефалины, нейротензин, холецистокинин, кортистатин, орексин, ангиотензин II, брадикинин, меланоцитстимулирующие гормоны и др., могут активно функционировать в ЦНС [2, 3]. В настоящее время успешно развиваются медицинские технологии, в т.ч. исполь-

Принятые сокращения: cAMP – циклический аденозин монофосфат; circDLGAP4 – циклическая РНК гена мембраносвязанной гуанилаткиназы *Dlgap4*; circHECTD1 – циклическая РНК гена убиквитинлигазы, содержащей HECT-домен, *Hectd1*; CREB – транскрипционный фактор, опосредующий связь с cAMP (cAMP response element-binding protein); E2 – 17 β -эстрадиол; GLP-1 – инсулино-глюкагоноподобный пептид-1; GPCR – метаботропный рецептор, связанный с G-белком; HMGB1 – амфотерин (high-mobility group protein B1); MSH – меланоцитстимулирующий гормон; N-AcPGR – N-ацетил-Pro-Gly-Pro; NFAT – активность ядерного фактора активированных Т-клеток; NF- κ B – ядерный фактор κ B; OGD/R – кислородно-глюкозная депривация–реоксигенация; P – прогестерон; PACAP – полипептид, активирующий аденилатциклазу гипоталамуса; PGP – Pro-Gly-Pro; pMCAO – модель необратимой окклюзии средней мозговой артерии (permanent middle cerebral artery occlusion model); RNA-seq – технология высокопроизводительного секвенирования РНК; tMCAO – модель обратимой окклюзии средней мозговой артерии (transient middle cerebral artery occlusion model); АКТГ – адренокортикотропный гормон; днРНК – длинные некодирующие РНК (long non-coding RNAs, lncRNAs); кэРНК – конкурентные эндогенные РНК (competitive endogenous RNAs, ceRNAs); нкРНК – некодирующие РНК (non-coding RNAs, ncRNAs); циклоРНК – циклические РНК (circular RNAs, circRNAs).

* Адресат для корреспонденции.

зующие нейропротективные, противовоспалительные, нейростимулирующие и противострессовые препараты, созданные на основе природных регуляторных пептидов. Такие лекарственные препараты не имеют побочных эффектов и безопасны в применении. Уже имеющиеся на сегодня пептидные лекарства оказывают значительное воздействие на работу мозга. Однако механизмы такого воздействия недостаточно изучены, что затрудняет разработку новых еще более эффективных препаратов со специализированным действием на функции мозга.

Одной из наиболее распространенных причин нарушений функций мозга является ишемический инсульт. Он возникает вследствие постоянного или временного снижения мозгового кровотока, в большинстве случаев вызванного окклюзией мозговых артерий тромбом или эмболом [4–6]. Ишемический инсульт приводит к гибели нейронов и клеток глии, сопровождающейся массивным воспалением. Таким образом, исключительное значение приобретает развитие новых стратегий нейропротекции и восстановления нервных тканей после ишемического инсульта, направленных на дальнейшую разработку препаратов нейропротективного действия.

Большие надежды при изучении особенностей действия пептидных препаратов можно возлагать на исследования с помощью недавно появившихся транскриптомных подходов, в т.ч. основанных на полногеномном секвенировании клеточных РНК. Анализ транскриптома позволяет не только выявлять отдельные гены или РНК, которые специфичны для того или иного физиологического воздействия, но и предоставляет возможность изучать транскрипционную реакцию всего генома одновременно, а также обнаруживать сигнальные пути и биологические процессы, активность которых может быть связана с природой индуцируемого физиологического ответа клеток, органов и тканей. Применение транскриптомного анализа позволило существенно детализировать изменения работы генов при развитии ишемического повреждения в мозге крыс в условиях транзиторной окклюзии средней мозговой артерии (transient middle cerebral artery occlusion model, tMCAO) [7], а также исследовать механизмы нейропротективного действия синтетических пептидов, в т.ч. успешно применяющихся в качестве лекарственных препаратов при инсульте [8, 9]. В мировой практике имеются и другие примеры успешного использования транскриптомного подхода к изучению механизмов действия ряда пептидов: PACAP38, N-ацетил-Pro-Gly-Pro (N-AsPGP) и др. [10].

Для создания новых нейропротективных препаратов необходимо полное понимание молекулярно-генетических и клеточных изменений в мозге, которые происходят после ишемического повреждения. На сегодняшний день показано, что в ответе на патологическое воздействие участвуют не только кодирующие мРНК, но и различные типы некодирующих РНК (нкРНК), в т.ч. микроРНК и длинные некодирующие РНК (днРНК). Так, микроРНК, взаимодействуя с сайтами-мишенями на мРНК, приводит к деградации мРНК или репрессии ее трансляции [11]. В последнее время активно развивается представление о том, что днРНК могут взаимодействовать с микроРНК и нивелировать их активность [12]. Такие функции приписывают в первую очередь циклическим РНК (циклоРНК) – новому и активно изучаемому в настоящее время типу РНК [13, 14]. Особенности функционирования нкРНК под действием пептидных препаратов изучены недостаточно. Однако для дальнейшего совершенствования стратегии в разработке новых нейроактивных пептидов самое пристальное внимание начинает уделяться изучению роли нкРНК в формировании эффектов пептидных препаратов. В последних работах показано, что мРНК, циклоРНК и микроРНК, а также их взаимодействия играют важную роль в механизмах повреждения и регенерации при патологическом воздействии [15, 16].

В настоящем обзоре представлены результаты анализа изменений работы генов при развитии ишемического повреждения, изучения транскриптомного профиля клеток мозга под действием пептидов в условиях экспериментальной ишемии мозга, а также сформулированы основные принципы механизмов пептидной регуляции при ишемическом повреждении.

ПЕПТИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРИ ИШЕМИИ

Церебральная ишемия возникает в результате острого снижения мозгового кровотока, ограничения поступления в нервную ткань кислорода и глюкозы, приводящего к истощению энергетических запасов, и каскада биохимических изменений в тканях мозга. После окклюзии сосуда активируется глутамат-кальциевый каскад, способствующий притоку ионов Ca^{2+} , образованию внутриклеточных медиаторов (фосфоинозитол, диацилглицерин), деполяризации мембраны, накоплению глутамата и дальнейшему притоку Ca^{2+} , приводящему к повреждению макромолекул и, в конечном итоге, к гибели клеток [17, 18]. В регуляции ишемического про-

песса также активно участвуют пептиды. Роль и возможные механизмы протективного действия ряда биологически активных пептидов, исследованные в условиях экспериментальной ишемии мозга на животных, описаны в обзоре Wu et al. [19].

Было показано, что после ишемического повреждения эндогенные пептиды могут принимать участие в регулировании кровотока [20–24] и в работе гематоэнцефалического барьера [25, 26], препятствовать развитию отека [27, 28], оказывать противовоспалительное иммуномодулирующее действие [29–31], уменьшать повреждение нейронов и образование зоны инфаркта [32]. Из ранних работ было известно, что к числу пептидов, активно функционирующих в условиях церебральной ишемии и обладающих множеством эффектов при ишемии, относится брадикинин. Показано, что при ишемическом инсульте брадикинин оказывает антиоксидантное, противовоспалительное, антиапоптотическое, антиэксайтотоксическое действие, подавляет митохондриально-опосредованный клеточный апоптоз, способствует выживанию клеток глии в ядре и пенумбре [21–24, 33, 34].

В последние годы активно разрабатываются препараты на основе пептидов меланокортинового ряда. Меланокортины — это большое семейство нейропептидов, образованных из общего предшественника — молекулы проопиомеланокортина, включающее в себя группу меланостимулирующих гормонов (α -, β -, γ -MSH), аденокортикотропный гормон (АКТГ) и некоторые фрагменты, содержащие, по крайней мере, аминокислотную последовательность His-Phe-Arg-Trp. Меланокортины принимают активное участие в балансе дофаминергической, холинергической и опиоидной систем. Кроме того, они проявляют противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства, оказывают влияние на процессы обучения и памяти, эмоциональное состояние, рост и регенерацию нервов, пищевое и половое поведение и ряд других функций организма [35, 36]. В моделях ишемии и воспаления головного мозга сильные противовоспалительные, нейрогенные и нейропротективные эффекты проявляет α -MSH [37–39]. α -MSH индуцирует активацию протеинкиназы А, транскрипционного фактора, опосредующего связь с cAMP (CREB), подавляет активность ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) и ядерного фактора κ B (NF- κ B), снижает уровень провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-6 и активность каспазы 3, а также индуцирует экспрессию интерлейкина IL-10 и апоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL [39, 40].

Пептидным препаратом, успешно зарекомендовавшим себя в клинической практике при лечении инсульта, является синтетический пептид меланокортинового ряда семакс (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro), N-конец которого содержит фрагмент АКТГ(4–7), а С-конец стабилизирован присоединением пептида Pro-Gly-Pro (PGP). Семакс обладает ярко выраженным ноотропным, нейропротективным, противовоспалительным и иммуномодулирующим эффектом [41–43]. При действии семакса было показано существенное снижение размеров ишемического повреждения в условиях модели фотоиндуцированного тромбоза у крыс [44].

Все большее значение приобретают новые пептидные препараты, относящиеся к классу глипролинов. Они содержат в своем составе дипептид Gly-Pro, имеют повышенную метаболическую стабильность, участвуют в различных биологических процессах, включая провоспалительную хемоаттракцию нейтрофилов при заболеваниях легких, воспалительных заболеваниях кишечника или при ишемическом инсульте [45]. Одним из наиболее простых глипролинов является пептид PGP. В ряде работ было показано, что пептид PGP оказывает противоязвенное и противовоспалительное действие [46, 47]. На основе данного пептида получен ряд синтетических производных, которые проявляют активность в отношении широкого спектра патологических и стрессовых состояний [48–51].

Таким образом, регуляторные пептиды и лекарственные препараты, созданные на их основе, являются полифункциональными, способными влиять сразу на несколько физиологических функций, однако многие аспекты молекулярных механизмов их действия остаются неизвестными и требуют дальнейших исследований. Можно полагать, что значительный вклад в изучение молекулярных механизмов действия пептидных препаратов внесет транскриптомный анализ.

ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ИШЕМИИ

Острое снижение мозгового кровотока, вызывающее каскад патофизиологических и биохимических изменений, сопровождается немедленными реакциями генома в клетках мозга [18]. Реперфузия в сочетании с ишемическим повреждением также приводит к многочисленным нарушениям регуляции мРНК, участвующих в повреждении [52–54]. Технологии с использованием биочипов и высокопроизводительного секвенирования РНК (RNA-seq) пре-

доставили возможность изучения реакции всего генома на подобные повреждения [7, 52, 53].

В условиях tMCAO с помощью RNA-seq нами были обнаружены сотни генов, уровень экспрессии которых изменился в подкорковых структурах мозга крыс, содержащих зону некроза и пенумбру. Более четырехсот генов изменили экспрессию через 4,5 ч и в 4 раза больше — через 24 ч после tMCAO [7]. Сравнение дифференциально экспрессированных генов, выявленных в двух временных точках, позволило нам изучить динамику изменений содержания транскриптов в процессе развития повреждения. В подкорковых структурах мозга крыс в условиях ишемии/реперфузии была обнаружена активация огромного числа генов, участвующих в воспалении, иммунном ответе, апоптозе, в ответе на стресс, в функционировании рибосом, репликации ДНК и других процессах (*Hspa1a*, *Hspb1*, *Lrg1*, *Jun*, *Socs3*, *Cish*, *Cd14*, *Cd63*, *Cd74*, *Ccl6*, *Ccl9*, *Nfkb2* и др.) [7]. Наряду с этим было показано массивное угнетение генов, обеспечивающих работу нейротрансмиттерных систем (*Chrm1*, *Chrm4*, *Cplx2*, *Drd2*, *Gabra5*, *Gria3*, *Grm3*, *Htr6*, *Neurod6*, *Ntsr2*, *Drd1*, *Grm5* и др.), были выявлены десятки сигнальных путей, с функционированием которых связан ответ клеток мозга на повреждение [7]. Таким образом, анализ транскриптома дает новое понимание транскриптомных функциональных изменений генома в тканях мозга в ответ на ишемическое повреждение.

РОЛЬ ТРАНСКРИПТОМА В ПЕПТИДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ ИШЕМИИ МОЗГА

Анализ транскриптома может являться одним из наиболее эффективных подходов в исследовании механизмов действия регуляторных пептидов и препаратов на их основе в норме и при различных физиологических и патологических состояниях. Основанием для этого служит представление о том, что при взаимодействии пептида с рецепторами на клеточной мембране сигнал передается по системе сигнальных путей (сAMP, PI3K, ERK и др.) в ядро клетки. Далее происходит активация транскрипционных факторов (*Fos*, *Jun*, *Creb* и др.) и инициация транскрипционного ответа клетки, связанного с эффектом пептида. Транскриптомные исследования действия регуляторных пептидов в значительной степени подтвердили эту гипотезу. Так, Nori et al. показали, что в условиях модели экспериментальной ишемии мозга, вызванной электрокоагуляционной окклюзией дистального участка средней мозговой артерии

(permanent middle cerebral artery occlusion model, pMCAO model), полипептид, активирующий аденилатциклазу гипофиза (PACAP), и продукт его деградации PACAP38 существенно модулировали экспрессию генов передачи нервного импульса (*Gabra6*), иммунного ответа (*Crtam*), а также генов семейства интерлейкинов. Авторами было сделано предположение, что PACAP активирует механизм защиты нейронов на ранней стадии ишемического повреждения [10].

Применение транскриптомного анализа позволило нам в условиях модели pMCAO существенно детализировать механизмы действия пептидного препарата семакс и его C-концевого пептида PGP. Анализ экспрессии более 22 000 генов с использованием микрочипов Illumina RatRef-12 Expression BeadChip позволил нам выявить изменение содержания транскриптов нескольких десятков генов, определяющих работу важнейших метаболических систем клеток мозга, связанных с функционированием семакса в условиях pMCAO [8, 9]. В первые часы после окклюзии под действием семакса было обнаружено существенное увеличение экспрессии генов транскрипционных факторов (*Fos*, *Junb*, *Egr2*, *Egr4*), белковые продукты которых запускают сигнальные пути, корректирующие деструктивные процессы при ишемии. Семакс оказал положительное воздействие на экспрессию генов факторов роста, участвующих в трофических и протективных процессах (*Bdnf*, *Nov*), в васкуляризации поврежденных тканей (*Cyr61*, *Atf3*, *Klf4*, *Adamts1*, *Nfil3*, *Ptgs2*, *Cox2* и др.). Введение семакса оказало существенное влияние на экспрессию генов, ассоциированных с процессами иммунного ответа. Спустя 24 ч после окклюзии было выявлено увеличение экспрессии генов, кодирующих иммуноглобулины, белки комплекса гистосовместимости (*RT1-Ba*, *RT1-A3*, *RT1-A1*), а также белки, участвующие в регуляции синтеза антител и миграции иммунных клеток [55, 56]. Нами также был проведен полногеномный анализ изменений транскриптома мозга крыс в условиях pMCAO под воздействием пептида PGP [55]. Поскольку пептид PGP является одним из преобладающих производных семакса в плазме крови и тканях мозга животных [57], то можно было ожидать, что наблюдаемые эффекты семакса и PGP будут схожи. Однако влияние PGP на экспрессию генов факторов роста лишь частично совпадало с действием семакса [58]. Было показано увеличение экспрессии генов, ответственных за процессы пролиферации, дифференцировки, миграции, выживаемости и гибели клеток (*Bdnf*, *Nos3*, *Nts*, *Ttr* и др.) [8, 56]. Однако под действием PGP, в отличие от семакса, была существенно снижена экспрессия генов, ассо-

циированных с функцией иммунного ответа (*Adora3*, *Clqa*, *Clqc*, *C2*, *Cd74*, *Cxcl1*, *Cxcl11*, *Cxcl13*, *Cxcl9* и др.) [8, 9, 55]. В число белков, кодируемых генами, экспрессия которых уменьшилась под действием PGP, вошли цитокины, транспортные белки, факторы транскрипции и трансмембранные рецепторы. Сравнительный анализ действия PGP и семакса в условиях рМCAO показал специфичность воздействия этих пептидов на транскриптом при ишемии. Таким образом, применение транскриптомного анализа позволяет выявить большее количество генов, которые связаны с протективным эффектом пептидов в условиях ишемии.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ нкРНК – НОВЫЕ МИШЕНИ В МЕХАНИЗМАХ ПОВРЕЖДЕНИЯ И НЕЙРОПРОТЕКЦИИ

В настоящее время показано, что в ответе на патологическое и стрессовое воздействия участвуют не только мРНК, но и различные типы нкРНК, которые обладают значительным регуляторным потенциалом. Большое внимание исследователей уделяется сегодня изучению особенностей функционирования микроРНК и днРНК. Так, микроРНК представляют собой молекулы нкРНК длиной 20–22 нуклеотидов. Они действуют путем непосредственного взаимодействия с сайтами-мишенями на мРНК, которое приводит к деградации мРНК или репрессии ее трансляции [11]. В настоящее время активно развивается концепция, связанная с нивелированием действия микроРНК с помощью днРНК, выполняющих функции конкурентных эндогенных РНК (кэРНК). кэРНК конкурируют с мРНК за связывание с микроРНК и нивелируют действие последних на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях регуляции экспрессии генов [12]. В ряде последних работ отмечается, что эффективные кэРНК должны иметь множество сайтов связывания микроРНК, а также высокий уровень экспрессии или повышенную стабильность [12, 14].

На сегодняшний день имеются данные о том, что значительная часть днРНК существует в виде циклической формы [59–61]. ЦиклоРНК не подвергаются действию экзонуклеаз и вследствие своей повышенной устойчивости могут более эффективно играть роль кэРНК [13, 14]. Большинство циклоРНК человека и грызунов обладают мозгоспецифической экспрессией [13, 61, 62], что может указывать на их особые функции в мозге.

В последние годы активно изучаются особенности функционирования нкРНК в качестве

регуляторов в механизмах повреждения и нейропротекции [63]. В недавних исследованиях были выявлены микроРНК, вовлеченные в пост-ишемическое повреждение нейронов и тромбоз [64, 65], а также показано, что мРНК генов *HMGB1*, *YWHAZ*, *PIK3R1*, *STAT3*, *MAPK1*, *CBX5*, *CAPZB*, *THBS1*, *TNFRSF10B* и *RCOR1*, связанных с воспалением, свертыванием крови и активацией тромбоцитов, являются мишенями для микроРНК при инсульте [66]. Несколько обзоров посвящено использованию микроРНК в качестве диагностических и прогностических маркеров, а также возможных терапевтических агентов при инсульте [64–68].

В одной из последних работ Herzog et al. изучили роль стероидных гормонов 17 β -эстрадиола (E2) и прогестерона (P) в мозге в качестве регуляторных факторов для miR-223-3p, miR-200c-3p, miR-375-3p, miR-199-3p и miR-214-3p и их целевых генов при ишемии в условиях модели tMCAO [69]. Было показано, что упомянутые микроРНК демонстрировали увеличение уровня экспрессии через 12 или 72 ч после воздействия tMCAO. При этом E2 и P избирательно подавляли miR-223 и miR-214, но дополнительно повышали содержание miR-375. Интересно, что экспрессия генов *Nr2b* и *Gria2*, которые являются мишенями для miR-223, была снижена после воздействия tMCAO, а применение E2 и P отменяло этот эффект. Кроме того, стероидная терапия ингибировала индуцированное tMCAO увеличение экспрессии генов *Bcl-2* и *Rad1*, являющихся мишенями для miR-375. Таким образом, была показана роль E2 и P в качестве косвенных микроРНК-опосредованных регуляторов трансляции проапоптотических и провоспалительных генов. В результате функционирование E2 и P приводило к ослаблению ишемического повреждения ткани [69].

Bai et al. показали, что циклоРНК гена мембраносвязанной гуанилаткиназы *Dlgap4* (circDLGAP4) функционирует как «губка» для микроРНК, связывая их на себе и удаляя тем самым из клеточного пула. Ее нивелирующая активность для miR-143 приводит к ингибированию экспрессии гомологов E6-AP C-концевого домена E3 убиквитинлигазы 1 в условиях церебральной ишемии [16]. При этом уровень circDLGAP4 был значительно снижен даже в плазме пациентов с острым ишемическим инсультом, а также в условиях модели tMCAO в мозге у мышей. Было показано, что увеличение экспрессии circDLGAP4 значительно ослабляло неврологический дефицит, уменьшало размер ядра инфаркта и повреждение гематоэнцефалического барьера в модели инсульта у мышей. В работе Han et al. (2018) также сообщается, что в

мозге мышей в условиях модели tMCAO, в клетках глиобластомы человека A172 в условиях кислородно-глюкозной депривации—реоксигенации (OGD-R) и в крови пациентов с ишемическим инсультом повышена экспрессия циклоРНК гена убиквитинлигазы, содержащей НЕСТ-домен, *Hectd1* (circNESTD1) [70]. Было показано, что circNESTD1 участвует в регуляции регенеративных механизмов клеток мозга при ишемии [63, 68].

РОЛЬ нкРНК В ПЕПТИДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ МОЗГА

Некодирующие РНК могут также влиять на функционирование пептидов. Так, Shang et al. исследовали потенциальное участие микроРНК в эффекте инсулино-глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) на глюкозостимулированную секрецию [71]. Было показано, что GLP-1 увеличивает экспрессию miR-132 и miR-212 через протеинкиназа A/cAMP-зависимый путь в панкреатических β -клетках поджелудочной железы [71]. В работе Madadi et al. (2019) описана роль микроРНК в ингибировании трансляции мРНК, кодирующих ключевые белки путей транспорта β -амилоида из клетки, что способствует его накоплению при болезни Альцгеймера. Так, miR-34a и miR-29b ингибируют по меньшей мере три пути транспорта β -амилоида и могут быть в перспективе использованы для лечения болезни Альцгеймера [72].

Несмотря на то, что днРНК, в первую очередь циклоРНК, играют критическую роль в развитии и прогрессировании ишемического инсульта [15, 16], особенности их функционирования под действием пептидных препаратов остаются неясными. Однако в последнее время становится очевидным, что анализ системы взаимодействий циклоРНК—микроРНК—мРНК является важной составляющей для детального изучения механизмов повреждения и регенерации при патологическом или стрессовом состоянии и действии терапевтических средств, в т.ч. пептидной природы.

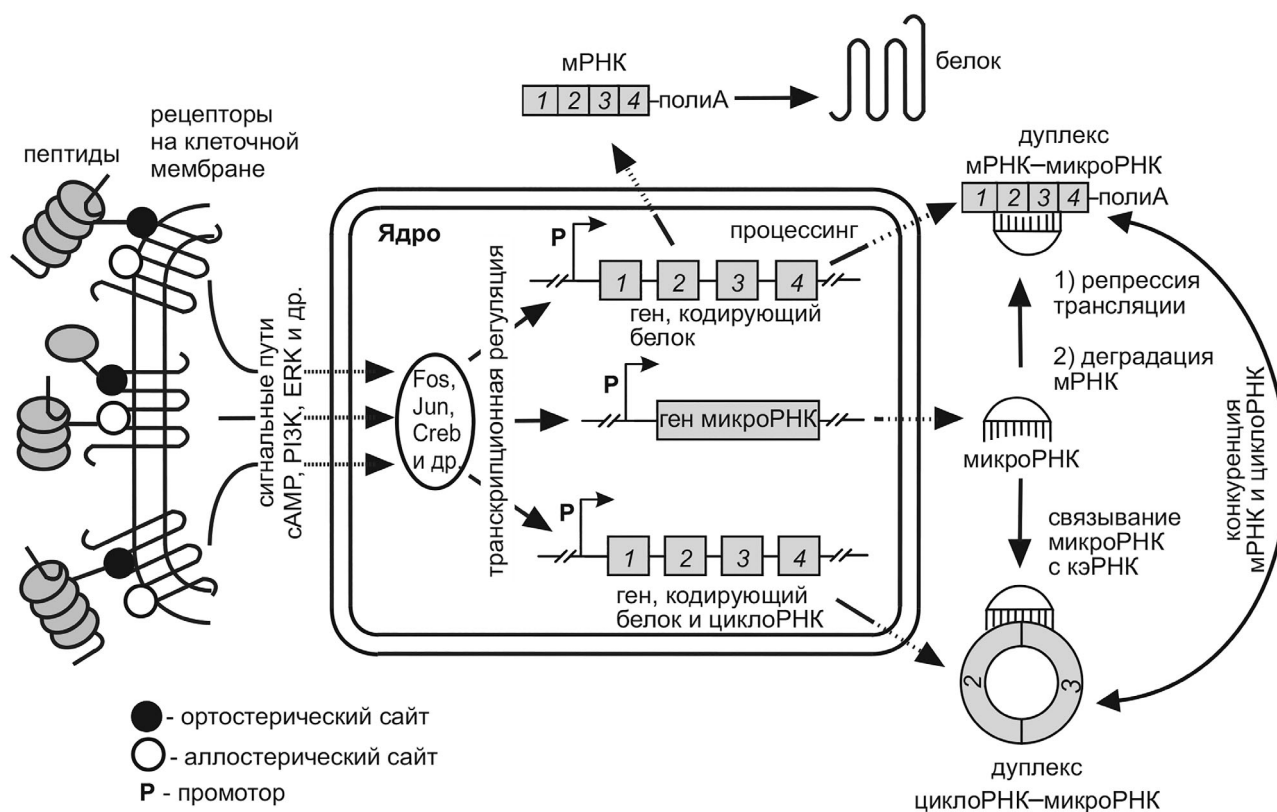
СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДОВ В МОЗГЕ

Механизмы действия регуляторных пептидов обусловлены, по-видимому, их специфическими лиганд-рецепторными взаимодействиями на плазматических мембранах клеток-мишеней. Нейропептидные рецепторы, связанные с

G-белком (GPCR), составляют самое большое семейство рецепторов клеточной поверхности, которые опосредуют многочисленные пути передачи сигналов в клетках, участвуют в разнообразных физиологических процессах и являются мишенями, на которые нацелены лекарственные средства [73, 74]. Молекулярный механизм передачи сигналов семейства рецепторов GPCR изложен в ряде обзоров [75–77].

Недавние исследования показали, что механизмы функционирования пептидов могут не ограничиваться ортостерическим взаимодействием с рецепторами [78, 79]. Обнаружено, что один и тот же регуляторный пептид может иметь собственные высокоспецифичные места связывания на поверхности клетки, а также способен влиять на работу сразу нескольких рецепторных групп, относящихся к различным системам клеточной сигнализации [80, 81]. Экспериментальные данные по специфическому связыванию пептидов позволили выдвинуть предположение об аллостерическом действии пептидов на различные рецепторные системы. Аллостерическое связывание приводит к изменению влияния эндогенных ортостерических лигандов на рецептор и специфическим ответам клеток [82]. Это предположение объясняет полифункциональность пептидов, а также специфичность и «мягкость» их действия.

Чтобы объяснить множественное влияние пептидов на межмолекулярные процессы, была предложена гипотеза, согласно которой в основе действия регуляторных пептидов лежит синактонный механизм [82]. Суть механизма заключается в том, что помимо самого пептида можно выделить функциональное ядро, представленное основными продуктами его метаболизма. Эти вторичные пептиды могут иметь свои собственные сайты связывания и вместе с родительским пептидом составлять единый комплекс биорегуляторов, действующих в определенной последовательности и во взаимодействии, — синактон. В частности, примером синактонного механизма является действие семакса. В общем пуле его метаболитов, который включает продукты расщепления родительской молекулы, можно выделить функциональное ядро, представленное пептидами HFPGP и RGP — основными продуктами его метаболизма. Эффект пептидов, которые действуют в синактоне, значительно расширяет регуляторный потенциал исходной молекулы. В результате, помимо ортостерического связывания, наблюдается аллостерическое взаимодействие с различными типами рецепторов, что указывает на множественный (плейотропный) характер действия пептидов.



Модель пептидной регуляции с участием некодирующих РНК в мозге. Экзоны показаны пронумерованными блоками, интроны – линиями, соединяющими экзоны

С учетом вышеизложенных данных мы предлагаем модель пептидной регуляции в мозге с участием нкРНК на основе известных механизмов их функционирования (рисунок). При взаимодействии пептида с рецептором на мембране сигнал передается в ядро клетки по системе сигнальных путей. Активация транскрипционных факторов приводит к транскрипции генов, направляющих синтез мРНК, микроРНК и циклоРНК. Численность активных мРНК, способных обеспечивать синтез белка, регулируется взаимодействием кэРНК циклической природы с микроРНК и удалением последних из клеточного пула. Таким образом, действие пептидов на транскриптом может быть обусловлено системой взаимодействий циклоРНК–микроРНК–мРНК, которая, в конечном итоге, может приводить клетки мозга в иное функциональное состояние. Изучение данной системы взаимодействий позволит сформулировать основные принципы пептидной регуляции и на основе этого определить новые подходы для дальнейшей разработки препаратов направленного нейропротективного действия.

В современном мире церебральная ишемия является одной из главных угроз для здоровья

человека. В борьбе с ишемией большие надежды возлагаются на новые препараты пептидной природы, которые обладают широким спектром действия и минимальным побочным воздействием на организм. Обзор экспериментальных данных свидетельствует о том, что большое число пептидов обладает нейропротективными полифункциональными свойствами, однако многие аспекты молекулярных механизмов их действия, а также метаболические звенья и возможные мишени зачастую остаются неизвестными и требуют дальнейших исследований. В формировании физиологических ответов пептидов существенное значение имеет регуляция на уровне транскриптома. Важную роль в регулировании внутриклеточных процессов помимо мРНК играют нкРНК, среди которых особый интерес представляют микроРНК и циклоРНК. В настоящее время роль нкРНК в пептидной регуляции в мозге остается недостаточно изученной. Однако становится очевидным, что изучение механизмов действия терапевтических средств, в т.ч. пептидной природы, а также определение стратегии в достижении нейропротективного эффекта препаратов невозможно без учета вклада нкРНК.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00268).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Ляпина Л.А., Пасторова В.Е. (1996) Модуляция гемостатических реакций *in vitro* и *in vivo* представителями семейств регуляторных пептидов, *Вестник Российской академии медицинских наук*, **6**, 50–57.
2. Snyder, S. (1980) Brain peptides as neurotransmitters, *Science*, **209**, 976–983, doi: 10.1126/science.6157191.
3. Hoyer, D., and Bartfai, T. (2012) Neuropeptides and neuropeptide receptors: drug targets, and peptide and non-peptide ligands: a tribute to Prof. Dieter Seebach, *Chem. Biodivers.*, **9**, 2367–2387, doi: 10.1002/cbdv.201200288.
4. Kalara, R.N., and Ballard, C. (2001) Stroke and cognition, *Curr. Atheroscler. Rep.*, **3**, 334–339, doi: 10.1007/s11883-001-0028-5.
5. Seshadri, S., Beiser, A., Kelly-Hayes, M., Kase, C.S., Au, R., Kannel, W.B., and Wolf, P.A. (2006) The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study, *Stroke*, **37**, 345–350, doi: 10.1161/01.STR.0000199613.38911.b2.
6. Mukherjee, D., and Patil, C.G. (2011) Epidemiology and the global burden of stroke, *World Neurosurg.*, **76**, S85–S90, doi: 10.1016/j.wneu.2011.07.023.
7. Dergunova, L.V., Filippenkov, I.B., Stavchansky, V.V., Denisova, A.E., Yuzhakov, V.V., Mozerov, S.A., Gubsky, L.V., and Limborska, S.A. (2018) Genome-wide transcriptome analysis using RNA-Seq reveals a large number of differentially expressed genes in a transient MCAO rat model, *BMC Genomics*, **19**, 655, doi: 10.1186/s12864-018-5039-5.
8. Medvedeva, E.V., Dmitrieva, V.G., Povarova, O.V., Limborska, S.A., Skvortsova, V.I., Myasoedov, N.F., and Dergunova, L.V. (2014) The peptide semax affects the expression of genes related to the immune and vascular systems in rat brain focal ischemia: genome-wide transcriptional analysis, *BMC Genomics*, **15**, 228, doi: 10.1186/1471-2164-15-228.
9. Medvedeva, E.V., Dmitrieva, V.G., Limborska, S.A., Myasoedov, N.F., and Dergunova, L.V. (2017) Semax, an analog of ACTH₍₄₋₇₎, regulates expression of immune response genes during ischemic brain injury in rats, *Mol. Genet. Genomics*, **292**, 635–653, doi: 10.1007/s00438-017-1297-1.
10. Hori, M., Nakamachi, T., Shibato, J., Rakwal, R., Shioda, S., and Numazawa, S. (2015) Unraveling the specific ischemic core and penumbra transcriptome in the permanent middle cerebral artery occlusion mouse model brain treated with the neuropeptide PACAP38, *Microarrays*, **4**, 2–24, doi: 10.3390/microarrays4010002.
11. Bartel, D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, **136**, 215–233, doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
12. Broderick, J.A., and Zamore, P.D. (2014) Competitive endogenous RNAs cannot alter microRNA function *in vivo*, *Mol. Cell*, **54**, 711–713, doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.023.
13. Hansen, T.B., Jensen, T.I., Clausen, B.H., Bramsen, J.B., Finsen, B., Damgaard, C.K., and Kjems, J. (2013) Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges, *Nature*, **495**, 384–388, doi: 10.1038/nature11993.
14. Denzler, R., Agarwal, V., Stefano, J., Bartel, D.P., and Stoffel, M. (2014) Assessing the ceRNA hypothesis with quantitative measurements of miRNA and target abundance, *Mol. Cell*, **54**, 766–776, doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.045.
15. Saugstad, J.A. (2015) Non-coding RNAs in stroke and neuroprotection, *Front. Neurol.*, **6**, 50, doi: 10.3389/fneur.2015.00050.
16. Bai, Y., Zhang, Y., Han, B., Yang, L., Chen, X., Huang, R., Wu, F., Chao, J., Liu, P., Hu, G., Zhang, J.H., and Yao, H. (2018) Circular RNA DLGAP4 ameliorates ischemic stroke outcomes by targeting miR-143 to regulate endothelial-mesenchymal transition associated with blood-brain barrier integrity, *J. Neurosci.*, **38**, 32–50, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1348-17.2017.
17. Pellegrini-Giampietro, D.E., Bennett, M.V., and Zukin, R.S. (1992) Are Ca²⁺-permeable kainate/AMPA receptors more abundant in immature brain? *Neurosci. Lett.*, **144**, 65–69, doi: 10.1016/0304-3940(92)90717-1.
18. Гусев Е.И., Скворцова В.И. (2001) *Ишемия головного мозга*, Медицина, Москва.
19. Wu, D., Wang, J., Wang, H., Ji, A., and Li, Y. (2017) Protective roles of bioactive peptides during ischemia-reperfusion injury: from bench to bedside, *Life Sci.*, **180**, 83–92, doi: 10.1016/j.lfs.2017.05.014.
20. Miyazaki, T., Otani, K., Chiba, A., Nishimura, H., Tokudome, T., Takano-Watanabe, H., Matsuo, A., Ishikawa, H., Shimamoto, K., Fukui, H., Kanai, Y., Yasoda, A., Ogata, S., Nishimura, K., Minamino, N., and Mochizuki, N. (2018) A new secretory peptide of natriuretic peptide family, osteocrin, suppresses the progression of congestive heart failure after myocardial infarction, *Circ. Res.*, **122**, 742–751, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312624.
21. Zhang, H.Y., Li, J., Guo, N., and Zhang, B.Y. (2019) Brain functions and unusual β -amyloid accumulation in the hypertensive white matter lesions of rats, *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, **33**, 1073–1084.
22. Martins, A.H., Zayas-Santiago, A., Ferrer-Acosta, Y., Martinez-Jimenez, S.M., Zueva, L., Diaz-Garcia, A., and Inyushin, M. (2019) Accumulation of amyloid beta (A β) peptide on blood vessel walls in the damaged brain after transient middle cerebral artery occlusion, *Biomolecules*, **9**, 350, doi: 10.3390/biom9080350.
23. Guo, S., Barringer, F., Zois, N.E., Goetze, J.P., and Ashina, M. (2014) Natriuretic peptides and cerebral hemodynamics, *Regul. Pept.*, **192–193**, 15–23, doi: 10.1016/j.regpep.2014.07.003.
24. James, M.L., Wang, H., Venkatraman, T., Song, P., Lascola, C.D., and Laskowitz, D.T. (2010) Brain natriuretic peptide improves long-term functional recovery after acute CNS injury in mice, *J. Neurotrauma*, **27**, 217–228, doi: 10.1089/neu.2009.1022.
25. Liu, Z., Liu, Q., Cai, H., Xu, C., Liu, G., and Li, Z. (2011) Calcitonin gene-related peptide prevents blood-brain barrier injury and brain edema induced by focal cerebral ischemia reperfusion, *Regul. Pept.*, **171**, 19–25, doi: 10.1016/j.regpep.2011.05.014.
26. Huang, Q., Zhong, W., Hu, Z., and Tang, X. (2018) A review of the role of cav-1 in neuropathology and neural recovery after ischemic stroke, *J. Neuroinflammation*, **15**, 348, doi: 10.1186/s12974-018-1387-y.

27. Wang, Y.F., and Parpura, V. (2018) Astroglial modulation of hydromineral balance and cerebral edema, *Front. Mol. Neurosci.*, **11**, 204, doi: 10.3389/fnmol.2018.00204.
28. Jia, S.W., Liu, X.Y., Wang, S.C., and Wang, Y.F. (2016) Vasopressin hypersecretion-associated brain edema formation in ischemic stroke: underlying mechanisms, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, **25**, 1289–1300, doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.02.002.
29. Waschek, J.A. (2013) VIP and PACAP: neuropeptide modulators of CNS inflammation, injury, and repair, *Br. J. Pharmacol.*, **169**, 512–523, doi: 10.1111/bph.12181.
30. Lakhan, S.E., Kirchgessner, A., and Hofer, M. (2009) Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches, *J. Transl. Med.*, **7**, 97, doi: 10.1186/1479-5876-7-97.
31. La, M., Taylor, A., D'Amico, M., Flower, R.J., and Perretti, M. (2001) Analysis of the protection afforded by annexin 1 in ischaemia–reperfusion injury: focus on neutrophil recruitment, *Eur. J. Pharmacol.*, **429**, 263–278, doi: 10.1016/S0014-2999(01)01325-5.
32. Wang, M., Wang, J., Liu, Z., Guo, X., Wang, N., Jia, N., Zhang, Y., and Yuan, J. (2018) Effects of intermedin on autophagy in cerebral ischemia/reperfusion injury, *Neuropeptides*, **68**, 15–21, doi: 10.1016/j.npep.2017.10.004.
33. Ji, B., Cheng, B., Pan, Y., Wang, C., Chen, J., and Bai, B. (2017) Neuroprotection of bradykinin/bradykinin B2 receptor system in cerebral ischemia, *Biomed. Pharmacother.*, **94**, 1057–1063, doi: 10.1016/j.biopha.2017.08.042.
34. Li, M., Chen, S., Shi, X., Lyu, C., Zhang, Y., Tan, M., Wang, C., Zang, N., Liu, X., Hu, Y., Shen, J., Zhou, L., and Gu, Y. (2018) Cell permeable HMGB1-binding heptamer peptide ameliorates neurovascular complications associated with thrombolytic therapy in rats with transient ischemic stroke, *J. Neuroinflammation*, **15**, 237, doi: 10.1186/s12974-018-1267-5.
35. De Wied, D. (1999) Behavioral pharmacology of neuropeptides related to melanocortins and the neurohypophyseal hormones, *Eur. J. Pharmacol.*, **375**, 1–11, doi: 10.1016/s0014-2999(99)00339-8.
36. Catania, A., Gatti, S., Colombo, G., and Lipton, J.M. (2004) Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation, *Pharmacol. Rev.*, **56**, 1–29, doi: 10.1124/pr.56.1.1.
37. Giuliani, D., Ottani, A., Neri, L., Zaffe, D., Grieco, P., Jochem, J., Cavallini, G.M., Catania, A., and Guarini, S. (2017) Multiple beneficial effects of melanocortin MC4 receptor agonists in experimental neurodegenerative disorders: therapeutic perspectives, *Prog. Neurobiol.*, **148**, 40–56, doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.11.004.
38. Lisak, R.P., and Benjamins, J.A. (2017) Melanocortins, melanocortin receptors and multiple sclerosis, *Brain Sci.*, **7**, 104, doi: 10.3390/brainsci7080104.
39. Mykicki, N., Herrmann, A.M., Schwab, N., Deenen, R., Sparwasser, T., Limmer, A., Wachsmuth, L., Klotz, L., Kohrer, K., Faber, C., Wiendl, H., Luger, T.A., Meuth, S.G., and Loser, K. (2016) Melanocortin-1 receptor activation is neuroprotective in mouse models of neuroinflammatory disease, *Sci. Transl. Med.*, **8**, 362ra146, doi: 10.1126/scitranslmed.aaf8732.
40. Giuliani, D., Minutoli, L., Ottani, A., Spaccapelo, L., Bitto, A., Galantucci, M., Altavilla, D., Squadrito, F., and Guarini, S. (2012) Melanocortins as potential therapeutic agents in severe hypoxic conditions, *Front. Neuroendocrinol.*, **33**, 179–193, doi: 10.1016/j.yfne.2012.04.001.
41. De Wied, D. (1997) Neuropeptides in learning and memory processes, *Behav. Brain Res.*, **83**, 83–90, doi: 10.1016/s0166-4328(97)86050-0.
42. Grivennikov, I.A., Dolotov, O.V., and Gol'dina, I.I. (1999) Peptide factors in processes of proliferation, differentiation, and extended viability of mammalian nervous system cells, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **33**, 120–126.
43. Kolomin, T., Shadrina, M., Slominsky, P., Limborska, S., and Myasoedov, N. (2013) A new generation of drugs: synthetic peptides based on natural regulatory peptides, *Neurosci. Med.*, **4**, 223–252, doi: 10.4236/nm.2013.44035.
44. Romanova, G.A., Silachev, D.N., Shakova, F.M., Kvashennikova, Y.N., Viktorov, I.V., Shram, S.I., and Myasoedov, N.F. (2006) Neuroprotective and antiapoptotic effects of Semax during experimental ischemic infarction of the cerebral cortex, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **142**, 663–666, doi: 10.1007/s10517-006-0445-0.
45. Misiura, M., and Milyuk, W. (2019) Proline-containing peptides – new insight and implications: a review, *Biofactors*, **45**, 857–866, doi: 10.1002/biof.1554.
46. Бондаренко Н.С., Шнейдерман А.Н., Гусева А.А., Умарова Б.А. (2017) Пептид пролил–глицил–пролин (PGP) препятствует повышению проницаемости кровеносных сосудов при воспалении, *Acta Naturae*, **1**, 55–59.
47. Безуглов В.В., Грецкая Н.М., Васильева Т.М., Петрухина Г.Н., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф., Макаров В.А. (2014) Антиагрегационная активность конъюгатов арахидоновой кислоты и нейротропных пептидов прогиппрола и семакса, *Экспериментальная и клиническая фармакология*, **77**, 30–32.
48. Мясоедов Н.Ф., Рочев Д.Л., Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Андреева Л.А. (2013) Лейциноидсодержащие глипролины (PRO-GLY-PRO-LEU и LEU-PRO-GLY-PRO): участие в реакциях гемостаза *in vitro* и *in vivo* в условиях нарушений процессов свертывания крови и жирового обмена у крыс, *Доклады Академии наук*, **453**, 457–460.
49. Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Ульянов А.М., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., Пасторова В.Е. (2010) Фибринолитический и гипогликемический эффекты пептида Pro-Gly-Pro-Leu при развитии инсулинзависимого диабета у крыс, *Известия РАН Сер. биол.*, **3**, 375–379.
50. Ashmarin, I.P., Samonina, G.E., Lyapina, L.A., Kamenskii, A.A., Levitskaya, N.G., Grivennikov, I.A., Dolotov, O.V., Andreeva, L.A., and Myasoedov, N.F. (2005). Natural and hybrid (“chimeric”) stable regulatory glyproline peptides, *Pathophysiology*, **11**, 179–185, doi: 10.1016/j.pathophys.2004.10.001.
51. Filatova, E., Kasian, A., Kolomin, T., Rybalkina, E., Alieva, A., Andreeva, L., Limborska, S., Myasoedov, N., Pavlova, G., Slominsky, P., and Shadrina, M. (2017) GABA, Selank, and olanzapine affect the expression of genes involved in GABAergic neurotransmission in IMR-32 cells, *Front. Pharmacol.*, **8**, 89, doi: 10.3389/fphar.2017.00089.
52. Ford, G., Xu, Z., Gates, A., Jiang, J., and Ford, B.D. (2006) Expression analysis systematic explorer (EASE) analysis reveals differential gene expression in permanent and transient focal stroke rat models, *Brain Res.*, **1071**, 226–236, doi: 10.1016/j.brainres.2005.11.090.
53. Wang, C., Liu, M., Pan, Y., Bai, B., and Chen, J. (2017) Global gene expression profile of cerebral ischemia–reperfusion injury in rat MCAO model, *Oncotarget*, **8**, 74607–74622, doi: 10.18632/oncotarget.20253.
54. DeGracia, D.J. (2017) Regulation of mRNA following brain ischemia and reperfusion, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **8**, 4, doi: 10.1002/wrna.1415.
55. Медведева Е.В., Дмитриева В.Г., Поварова О.В., Лимборская С.А., Скворцова В.И., Мясоедов Н.Ф., Дергунова Л.В. (2014) Трипептид Pro-Gly-Pro влияет на транскриптом коры головного мозга крыс в условиях фокальной ишемии, *Молекулярная биология*, **48**, 277–287.

56. Medvedeva, E.V., Dmitrieva, V.G., Povarova, O.V., Limborska, S.A., Skvortsova, V.I., Myasoedov, N.F., and Dergunova, L.V. (2013) Effect of semax and its C-terminal fragment Pro-Gly-Pro on the expression of VEGF family genes and their receptors in experimental focal ischemia of the rat brain, *J. Mol. Neurosci.*, **49**, 328–333, doi: 10.1007/s12031-012-9853-y.
57. Dolotov, O.V., Zolotarev, I.A., Dorokhova, E.M., Andreeva, L.A., Alfeeva, L.I., Grivennikov, I.A., and Miasoedov, N.F. (2004) The binding of Semax, ACTH 4–10 heptapeptide, to plasma membranes of the rat forebrain basal nuclei and its biodegradation, *Bioorg. Khim.*, **30**, 241–246, doi: 10.1023/b:rubi.0000030127.46845.f0.
58. Дмитриева В.Г., Дергунова Л.В., Поварова О.В., Скворцова В.И., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф. (2008) Действие семакса и его С-концевого трипептида PGP на экспрессию генов факторов роста и их рецепторов в условиях экспериментальной ишемии мозга крыс, *Доклады Академии наук*, **422**, 258–261.
59. Lasda, E., and Parker, R. (2014) Circular RNAs: diversity of form and function, *RNA*, **20**, 1829–1842, doi: 10.1261/rna.047126.114.
60. Filippenkov, I.B., Kalinichenko, E.O., Limborska, S.A., and Dergunova, L.V. (2017) Circular RNAs – one of the enigmas of the brain, *Neurogenetics*, **18**, 1–6, doi: 10.1007/s10048-016-0490-4.
61. Filippenkov, I.B., Sudarkina, O.Y., Limborska, S.A., and Dergunova, L.V. (2015) Circular RNA of the human sphingomyelin synthase 1 gene: multiple splice variants, evolutionary conservatism and expression in different tissues, *RNA Biol.*, **12**, 1030–1042, doi: 10.1080/15476286.2015.1076611.
62. Rybak-Wolf, A., Stottmeister, C., Glazar, P., Jens, M., Pino, N., Giusti, S., Hanan, M., Behm, M., Bartok, O., Ashwal-Fluss, R., Herzog, M., Schreyer, L., Papavasileiou, P., Ivanov, A., Ohman, M., Refojo, D., Kadener, S., and Rajewsky, N. (2015) Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed, *Mol. Cell*, **58**, 870–885, doi: 10.1016/j.molcel.2015.03.027.
63. Heydari, E., Alishahi, M., Ghaedrahmati, F., Winlow, W., Khoshnam, S.E., and Anbiyaiee, A. (2019) The role of non-coding RNAs in neuroprotection and angiogenesis following ischemic stroke, *Metab. Brain Dis.*, doi: 10.1007/s11011-019-00485-2.
64. He, W., Chen, S., Chen, X., Li, S., and Chen, W. (2016) Bioinformatic analysis of potential microRNAs in ischemic stroke, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, **25**, 1753–1759, doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.03.023.
65. Dewdney, B., Trollope, A., Moxon, J., Thomas Manapathe, D., Biros, E., and Gollidge, J. (2018) Circulating microRNAs as biomarkers for acute ischemic stroke: a systematic review, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, **27**, 522–530, doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.09.058.
66. Eyileten, C., Wicik, Z., De Rosa, S., Mirowska-Guzel, D., Soplińska, A., Indolfi, C., Jastrzebska-Kurkowska, I., Czlonkowska, A., and Postula, M. (2018) MicroRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers in ischemic stroke – a comprehensive review and bioinformatic analysis, *Cells*, **7**, 249, doi: 10.3390/cells7120249.
67. Khoshnam, S.E., Winlow, W., Farbood, Y., Moghaddam, H.F., and Farzaneh, M. (2017) Emerging roles of microRNAs in ischemic stroke: as possible therapeutic agents, *J. Stroke*, **19**, 166–187, doi: 10.5853/jos.2016.01368.
68. Wang, S.W., Liu, Z., and Shi, Z.S. (2018) Non-coding RNA in acute ischemic stroke: mechanisms, biomarkers and therapeutic targets, *Cell Transplant.*, **27**, 1763–1777, doi: 10.1177/0963689718806818.
69. Herzog, R., Zendedel, A., Lammending, L., Beyer, C., and Slowik, A. (2017) Impact of 17 β -estradiol and progesterone on inflammatory and apoptotic microRNA expression after ischemia in a rat model, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **167**, 126–134, doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.11.018.
70. Han, B., Zhang, Yuan, Zhang, Yanhong, Bai, Y., Chen, X., Huang, R., Wu, F., Leng, S., Chao, J., Zhang, J.H., Hu, G., and Yao, H. (2018) Novel insight into circular RNA *HECTD1* in astrocyte activation via autophagy by targeting *MIR142-TIPARP*: implications for cerebral ischemic stroke, *Autophagy*, **14**, 1164–1184, doi: 10.1080/15548627.2018.1458173.
71. Shang, J., Li, J., Keller, M.P., Hohmeier, H.E., Wang, Y., Feng, Y., Zhou, H.H., Shen, X., Rabaglia, M., Soni, M., Attie, A.D., Newgard, C.B., Thornberry, N.A., Howard, A.D., and Zhou, Y.P. (2015) Induction of miR-132 and miR-212 expression by glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in rodent and human pancreatic β -cells, *Mol. Endocrinol.*, **29**, 1243–1253, doi: 10.1210/me.2014-1335.
72. Madadi, S., Schwarzenbach, H., Saidijam, M., Mahjub, R., and Soleimani, M. (2019) Potential microRNA-related targets in clearance pathways of amyloid- β : novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease, *Cell Biosci.*, **9**, 91, doi: 10.1186/s13578-019-0354-3.
73. Edward Zhou, X., Melcher, K., and Eric Xu, H. (2019) Structural biology of G protein-coupled receptor signaling complexes, *Protein Sci.*, **28**, 487–501, doi: 10.1002/pro.3526.
74. Левченко М.Е., Поройков В.В., Канехиса М. (2004) Пептидные рецепторы, сопряженные с G-белками, и их эндогенные лиганды в геноме человека, *Биомедицинская химия*, **50**, 149–158.
75. Duc, N.M., Kim, H.R., and Chung, K.Y. (2015) Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor, *Eur. J. Pharmacol.*, **763**, 214–222, doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.016.
76. Culhane, K.J., Liu, Y., Cai, Y., and Yan, E.C. (2015) Transmembrane signal transduction by peptide hormones via family B G protein-coupled receptors, *Front. Pharmacol.*, **6**, 264, doi: 10.3389/fphar.2015.00264.
77. Lohse, M.J., Maiellaro, I., and Calebiro, D. (2014) Kinetics and mechanism of G protein-coupled receptor activation, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **27**, 87–93, doi: 10.1016/j.ceb.2013.11.009.
78. Vyunova, T.V., Andreeva, L., Shevchenko, K., and Myasoedov, N. (2018) Peptide-based anxiolytics: the molecular aspects of heptapeptide Selank biological activity, *Protein. Pept. Lett.*, **25**, 914–923, doi: 10.2174/0929866525666180925144642.
79. Lee, S.M., Hay, D.L., and Pioszak, A.A. (2016) Calcitonin and amylin receptor peptide interaction mechanisms: insights into peptide-binding modes and allosteric modulation of the calcitonin receptor by receptor activity-modifying proteins, *J. Biol. Chem.*, **291**, 8686–8700, doi: 10.1074/jbc.M115.713628.
80. Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Бобров М.Ю., Безуглов В.В., Мясоедов Н.Ф. (2018) Взаимодействие трипептида Pro-Gly-Pro, меченного по С-концевому остатку пролина, с плазматическими мембранами мозга крыс, *Доклады Академии наук*, **419**, 136–137, doi: 10.1017/SBO9781107415324.004.
81. Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Бобров М.Ю., Безуглов В.В., Мясоедов Н.Ф. (2014) Особенности специфического связывания пептида HFPGR, меченного по С-концевому остатку пролина, с плазматическими мембранами нервных клеток головного мозга крысы, *Доклады Академии наук*, **456**, 490–493, doi: 10.7868/s0869565214160312.
82. Vyunova, T.V., Andreeva, L.A., Shevchenko, K.V., and Myasoedov, N.F. (2017) Synacton and individual activity of synthetic and natural corticotropins, *J. Mol. Recognit.*, **30**, e2597, doi: 10.1002/jmr.2597.

NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF PEPTIDES IN THE BRAIN: TRANSCRIPTOME APPROACH

Review

I. B. Filippenkov*, L. V. Dergunova, S. A. Limborska, and N. F. Myasoedov

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, 123182 Moscow, Russia; E-mail: Filippenkov@img.ras.ru

Received December 5, 2019

Revised December 5, 2019

Accepted December 11, 2019

The importance of studying the action mechanisms of drugs based on natural regulatory peptides is commonly recognized. Particular attention is paid to the peptide drugs that contribute to the restoration of brain functions after acute cerebrovascular accidents (stroke), which for many years continues to be one of the main problems and threats to human health. However, molecular genetic changes in the brain in response to ischemia, as well as the mechanisms of protective effects of peptides, have not been sufficiently studied. This limits the use of neuroprotective peptides and makes it difficult to develop new, more efficient drugs with targeted action on brain functions. Transcriptome analysis is a promising approach for studying the mechanisms of the damaging effects of cerebral ischemia and neuroprotective action of peptide drugs. Beside investigating the role of mRNAs in protein synthesis, the development of new neuroprotection strategies requires studying the involvement of regulatory RNAs in ischemia. Of greatest interest are microRNAs (miRNAs) and circular RNAs (circRNAs), which are expressed predominantly in the brain. CircRNAs can interact with miRNAs and diminish their activity, thereby inhibiting miRNA-mediated repression of mRNAs. It has become apparent that analysis of the circRNA/miRNA/mRNA system is essential for deciphering the mechanisms of brain damage and repair. Here, we present the results of studies on the ischemia-induced changes in the activity of genes and peptide-mediated alterations in the transcriptome profiles in experimental ischemia and formulate the basic principles of peptide regulation in the ischemia-induced damage.

Keywords: transcriptomics, regulatory peptides, brain ischemia, mRNA, non-coding RNA, microRNA, circular RNA

УДК 577.29

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕНИЯ БЕЛКА XRCC1 ЧЕЛОВЕКА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЕГО КОМПЛЕКСОВ С КЛЮЧЕВЫМИ ФЕРМЕНТАМИ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ ДНК*,**

© 2020 И.А. Васильева^{1#}, Н.А. Моор^{1#}, О.И. Лаврик^{1,2***}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия;
электронная почта: lavrik@niboch.nsc.ru

² Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 29.11.2019

После доработки 20.01.2020

Принята к публикации 27.01.2020

Эксцизионная репарация оснований (Base Excision Repair, BER) обеспечивает исправление самых многочисленных повреждений ДНК у млекопитающих. Эффективность репарации с помощью этого многоступенчатого процесса, протекающего по разным маршрутам, зависит от координированного действия ферментов, катализирующих отдельные стадии. Важную роль в координации процессов репарации поврежденных оснований и апуриновых/апириимидиновых (AP) сайтов по «короткозаплаточному» маршруту и репарации одноцепочечных разрывов играет архитектурный белок XRCC1. В работе впервые с использованием метода флуоресцентного титрования показано образование *in vitro* тройного комплекса белка XRCC1 с ключевыми ферментами «короткозаплаточной» репарации – ДНК-полимеразой β (Pol β) и ДНК-лигазой III α (LigIII α). Зарегистрировано прямое взаимодействие Pol β с LigIII α , но их комплекс уступает по стабильности комплексам XRCC1–Pol β и XRCC1–LigIII α . Исследовано влияние окисления белка XRCC1 и состава мультибелкового комплекса на эффективность репаративного синтеза и лигирования ДНК. Образование дисульфидной связи между остатками Cys12 и Cys20 в результате окисления XRCC1, модулирующее сродство белка к Pol β (как показано ранее), оказывает влияние на выход как конечного продукта «короткозаплаточной» репарации, так и нелигируемых ДНК-интермедиатов (субстратов «длиннозаплаточной» репарации). Эффект окисления XRCC1 на выход конечного продукта зависит от присутствия AP-эндонуклеазы 1. Результаты работы и ранее проведенного нами исследования указывают на важную роль окисления XRCC1 в тонкой регуляции процессов формирования и функциональной активности репаративных комплексов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эксцизионная репарация оснований ДНК, белок-белковые взаимодействия, белок XRCC1 человека, ДНК-полимераза β , ДНК-лигаза III α .

DOI: 10.31857/S0320972520030045

Эксцизионная репарация оснований (Base Excision Repair, BER) обеспечивает исправление самых многочисленных повреждений ДНК у млекопитающих – модифицированных оснований, апуриновых/апириимидиновых (AP) сайтов и одноцепочечных разрывов [1, 2], и является важнейшей системой для сохранения генома.

Многостадийные процессы коррекции повреждений ДНК по различным маршрутам BER представлены на рис. 1. Удаление поврежденных оснований инициируется ДНК-гликозилазами, специфичными к определенному типу повреждения. Моно- или бифункциональные ДНК-гликозилазы катализируют образование интакт-

Принятые сокращения: AP-сайт – апуриновый/апириимидиновый сайт; APE1 – AP-эндонуклеаза 1; dRp – дезоксирибозофосфат; DTT – дитиотреитол; FAM – 5(6)-карбоксифлуоресцеин; FEN1 – флэп-эндонуклеаза 1; гар-ДНК – ДНК-дуплекс с однонуклеотидной брешью; LigI/LigIII α – ДНК-лигаза I/III α ; LP BER – «длиннозаплаточная» эксцизионная репарация оснований; nick-ДНК – ДНК-дуплекс с одноцепочечным разрывом; PARP1/PARP2 – поли(ADP-рибоза)-полимераза 1/2; Pol β /Pol δ /Pol ϵ – ДНК-полимераза β / δ / ϵ ; SP BER – «короткозаплаточная» эксцизионная репарация оснований; XRCC1ox – окисленная форма белка XRCC1.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochimiyu>, в рубрике «Papers in Press», BM19-338, 02.03.2020.

** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 3, 2020.

*** Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

ного или расщепленного (по механизму β - или β/δ -элиминации) AP-сайта. Интактный AP-сайт гидролизруется AP-эндонуклеазой 1 (APE1); затем ДНК-полимераза β (Pol β) удаляет остаток дезоксирибозофосфата (dRp) на 5'-конце разрыва с помощью ее dRp-лиазной активности. Продукты действия бифункциональных ДНК-гликозилаз содержат 3'- или 5'-концевые блокирующие группы, которые удаляются с помощью фосфатазной активности полинуклеотидкиназы/фосфатазы (PNKP) или 3'-фосфатазной и 3'-фосфодиэстеразной активностей APE1. Основным путем репарации оснований по «короткозаплаточному» пути (short patch, SP BER) включает заполнение однонуклеотидной брешы с помощью ДНК-полимеразной активности Pol β и восстановление целостности цепи с помощью ДНК-лигазы III α (LigIII α). Другой путь, известный как «длиннозаплаточная» репарация (long patch, LP BER), реализуется в случае модификации 5'-dRp-остатка (не удаляемого с помощью лиазной активности Pol β). Синтез с вытеснением цепи инициируется Pol β и продолжается с

участием репликативных ДНК-полимераз δ и ϵ (Pol δ , Pol ϵ), свисающая структура (флэп) удаляется флэп-эндонуклеазой 1 (FEN1), и конечное лигирование разрыва завершает ДНК-лигаза I (LigI). Репарация одноцепочечных разрывов в ДНК, возникающих под действием повреждающих факторов или в процессе репарации модифицированных оснований и AP-сайтов, включает детекцию разрыва, удаление блокирующих групп, заполнение брешы и лигирование разрыва. Основным детектором разрывов в ДНК является поли(ADP-рибоза)-полимераза 1 (PARP1); в деблокировании 3'- и 5'-концов участвуют APE1, PNKP, апраксин (APTX) и тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1); Pol β и LigIII α катализируют заполнение брешы и лигирование. Взаимодействуя с поврежденной ДНК, PARP1 активируется и катализирует синтез поли(ADP-рибозы) (PAR) и ее присоединение к себе и другим белкам-участникам репарации. Основной мишенью этой модификации (PARилирования) в процессе BER является белок XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1), в привлече-

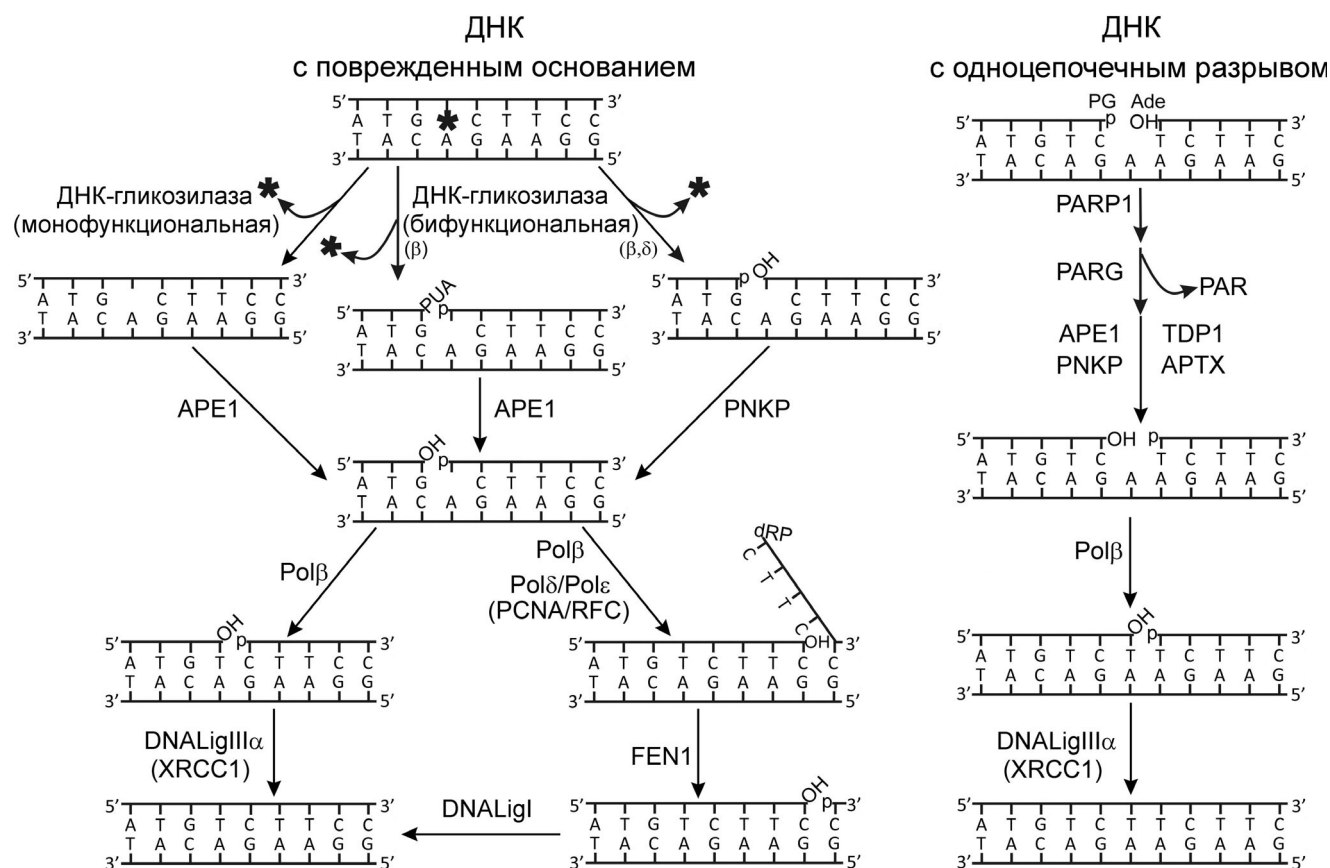


Рис. 1. Схематическое представление путей репарации поврежденных оснований и одноцепочечных разрывов в ДНК. Обозначения белков описаны в тексте. Обозначения концевых блокирующих групп в разрывах ДНК следующие: PUA — 3'-фосфо- α, β -ненасыщенный альдегид, p — 3'-/5'-фосфат, OH — 3'-/5'-ОН-группа, dRp — 5'-дезоксирибозофосфат, PG — 3'-фосфогликолят, Ade — 5'-альдегидная группа. Рисунок воспроизводится из обзора [5] с разрешения издателя

нии которого к одноцепочечным разрывам хромосомной ДНК PARP1 играет главную роль [1, 3]. XRCC1 не имеет ферментативной активности и выполняет функцию «платформы» в организации комплекса BER [3–5]. Практически для всех белков-участников BER локализованы сайты связывания в XRCC1, в формирование которых вовлечены все его структурные фрагменты: N-концевой (NTD), центральный (BRCTa) и C-концевой домены (BRCTb) и неупорядоченные линкеры XL1 и XL2 [4, 5].

Эффективность репарации с помощью многоступенчатого процесса BER зависит от координированного действия ферментов, катализирующих отдельные стадии. Один из механизмов координации предполагает формирование мультибелковых комплексов, «репарасом», с участием ферментов и архитектурных белков, каким является XRCC1 [1, 6]. Ранее было показано, что комплекс XRCC1 с LigIII α критически важен для стабилизации этого фермента и репарации *in vivo* [7, 8]. Этот комплекс был зарегистрирован в клеточном экстракте неравновесным методом гель-фильтрации и рассматривался как самый устойчивый среди белковых комплексов с участием XRCC1 [9]. С использованием равновесного и неравновесного методов нами зарегистрирован комплекс XRCC1 с Pol β , и впервые оценена его стабильность в сравнении с комплексами других белков [10]. Необходимость этого комплекса для эффективной репарации *in vitro* и *in vivo* и взаимной защиты белков от протеасомной деградации была установлена в других работах [11–13]. Учитывая, что сайты связывания Pol β и LigIII α сформированы разными доменами XRCC1 (NTD и BRCTb соответственно) и не перекрываются с сайтами связывания других участников BER, мы предположили существование тройного комплекса этих белков, как устойчивой «платформы» для формирования более динамичных мультибелковых ансамблей [10]. Для подтверждения этой гипотезы в настоящей работе исследовано взаимодействие LigIII α с XRCC1 и Pol β методом флуоресцентного титрования, использованным нами ранее для характеристики комплекса XRCC1 с Pol β [10], чтобы сравнить сродство разных белков друг к другу в одинаковых условиях. Этот равновесный метод позволил зарегистрировать комплексы разных белков-участников BER, не детектируемые часто используемыми неравновесными методами аффинного соосаждения и гель-фильтрации [5, 10]. Кроме этого, мы исследовали роль тройного комплекса в регуляции эффективности SP BER *in vitro* в зависимости от существования XRCC1 в обычной (восстановленной) или окисленной форме. Образование

дисульфидной связи между остатками Cys12 и Cys20 в результате окисления XRCC1 индуцирует структурную реорганизацию NTD и его комплекса с Pol β , как показано с помощью рентгеноструктурного анализа комплекса соответствующих доменов белков, и усиливает сродство белков друг к другу [4]. Блокирование образования окисленной формы XRCC1 (XRCC1ox) в клетках млекопитающих заменой белка XRCC1 дикого типа на Cys12Ala мутант снижает выживаемость клеток в условиях окислительного стресса [14, 15]. Авторы этих исследований предполагают, что образование более прочного комплекса XRCC1ox с Pol β необходимо для эффективной репарации окислительных повреждений ДНК *in vivo*. Однако влияние окисления XRCC1 на собственно процесс репаративного синтеза ДНК до сих пор не изучено.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. В работе использованы [γ - 32 P]АТФ (с удельной радиоактивностью 5 Ки/мкмоль) производства лаборатории биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; N-оксисукцинимидный эфир 5(6)-карбоксифлуоресцеина (FAM-SE) и трис(2-карбоксиэтил)фосфин (TCEP) («Sigma», США); глутатион окисленный (GSSG) («ICN Biomedicals», США); реактивы для электрофореза и реактивы, входящие в состав буферных растворов, производства фирмы «Sigma» (США) или отечественного производства (квалификации о.с.ч.). В работе использованы рекомбинантные белки эксцизионной репарации оснований ДНК млекопитающих. Плазмидные векторы для экспрессии в клетках *Escherichia coli* белков APE1 человека и Pol β крысы любезно предоставлены доктором Вильсоном (National Institute of Health, North Carolina, США), XRCC1 человека – доктором Радицеллой (UMR217 CNRS/CEA, Франция) и LigIII α человека – доктором Диановым (Oxford University, Великобритания). Pol β , XRCC1 и APE1 получали как описано ранее [16–18]. LigIII α получали по оригинальному методу, описанному ниже. Конечные препараты белков диализовали против буфера хранения, содержащего 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl, 0,5 mM ЭДТА, 5 mM дитиотреитол (DTT) и 40%-ный (v/v) глицерин, и хранили при -30°C . ДНК-олигонуклеотиды (5'-GGAAGACCCCTGACGTTACCCAACTTAATCGCC-3' – матрица, 5'-GGCGATTAAGTTGGG-3' – праймер 1, 5'-GGCGATTAAGTTGGGT-3' – праймер 2 и 5'-pAACGTCAGGGTCTTCC-3' – запирающий

праймер) были синтезированы в лаборатории Медицинской химии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. ^{32}P -Мечение олигонуклеотидов по 5'-концу было выполнено с использованием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и T4 полинуклеотидкиназы («Биосан», Россия) по протоколу, рекомендованному производителем. 32-звенные ДНК-дуплексы с одноцепочечным разрывом (nick-ДНК) или однонуклеотидной брешью (gap-ДНК) в середине цепи были подготовлены как описано нами ранее [10].

Получение окисленной формы белка XRCC1.

Для получения XRCC1_{ox} использован метод мягкого окисления SH-групп в белках [19]. XRCC1 (100 мкМ) инкубировали с GSSG (10 мМ) в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,8), содержащем 100 мМ NaCl, в течение 18 ч в темноте при 4 °С. Белок диализовали против буфера хранения, не содержащего DTT. Для получения обычной полностью восстановленной формы XRCC1 исходный препарат белка инкубировали с 10 мМ TCEP в течение 18 ч при 4 °С и диализовали против буфера хранения. Содержание SH-групп в препаратах XRCC1 и XRCC1_{ox} анализировали колориметрическим методом с использованием реактива Элмана [20].

Экспрессия и очистка ДНК-лигазы III α . Полноразмерный ядерный белок LigIII α человека с полигистидиновой последовательностью на N-конце экспрессировали в клетках *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2. После трансформации плазмидой клетки подращивали при 30 °С в среде LB до A_{600} 0,6 и после индукции 1 мМ изопропил- β -D-1-тиоугалактопиранозидом инкубировали 4 ч при 18 °С; клетки осаждали центрифугированием (7000 об./мин при 4 °С) («Beckman Coulter Inc», США) и хранили при –40 °С. Биомассу оттаивали на льду и ресуспендировали в предварительно охлажденном буфере для лизиса, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 300 мМ NaCl, 1%-ный (v/v) детергент NP-40, 1 мМ β -меркаптоэтанол (β -ME), 10%-ный (v/v) глицерин, 1 мМ фенолметилсульфонил фторид (PMSF), 1 мМ бензамидин (Bz) и таблетку ингибиторного коктейля («Roche», Швейцария). После инкубации с лизоцимом (1,5 мг/мл; «Boehringer Mannheim», Германия) в течение 20 мин во льду клетки разрушали ультразвуком («Bandelin», Германия) до получения гомогенной суспензии, и клеточный дебрис отделяли центрифугированием (18000 об./мин при 4 °С) («Beckman Coulter Inc», США). К супернатанту добавляли имидазол (pH 8,0) до 5 мМ, и сорбировали белки на Ni-сефарозе (Ni Sepharose 6 Fast Flow, «GE Healthcare», Швейцария), уравновешенной буфером А (50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 300 мМ NaCl, 3 мМ β -ME, 1 мМ PMSF, 1 мМ Bz и 5 мМ имидазол). Белки элюи-

ровали градиентом 5–600 мМ имидазола (pH 8,0) в буфере А. Целевой белок отделяли от примесей с помощью последовательных хроматографий на колонках с гепарин-сефарозой (Heparin Sepharose 6 Fast Flow, «GE Healthcare», Швейцария) и ss-ДНК-целлюлозой («USB», США), уравновешенных буфером Б (50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 100 мМ NaCl, 10 мМ β -ME, 0,5 мМ ЭДТА, 5%-ный (v/v) глицерин), используя градиент 0,1–1,0 М NaCl в буфере Б. Анализ фракций проводили с помощью электрофореза в 10%-ном (m/v) Ds-Na-ПААГ. Фракции, содержащие очищенный белок, концентрировали и диализовали против буфера хранения в микродиализных ячейках 10 кДа («Sartorius», Германия). Функциональную активность LigIII α тестировали в реакции лигирования синтетического 32-звенного дуплекса, содержащего одноцепочечный разрыв (nick-ДНК). Реакционную смесь (10 мкл), содержащую 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl_2 , 7 мМ DTT, 1 мМ ATP, 50 нМ 5'- ^{32}P -меченный ДНК-субстрат и 100–400 нМ LigIII α , инкубировали 30 мин при 37 °С. Реакцию инициировали добавлением фермента и останавливали добавлением равного объема буфера для нанесения образцов на денатурирующий ПААГ (90%-ный (v/v) формамид, 20 мМ ЭДТА, 0,05%-ный (m/v) бромфеноловый синий и 0,05%-ный (m/v) ксиленианол). Образцы инкубировали 2 мин при 90 °С, и продукты реакции разделяли электрофорезом в 20%-ном (m/v) ПААГ с мочевиной. Для визуализации гелей и количественного анализа продуктов реакции использовали сканер Typhoon FLA 9500 («GE Healthcare», Швейцария) и программу Quantity One («Bio-Rad», США).

Флуоресцентное мечение ДНК-лигазы III α и исследование образования белковых комплексов методом флуоресцентного титрования. Мечение LigIII α N-оксисукцинимидным эфиром 5(6)-карбоксифлуоресцеина (FAM-SE) по N-концевой аминогруппе белка проводили по методу, разработанному нами ранее [10]. Белок диализовали 4 раза против буфера, содержащего 100 мМ Mes (pH 7,0) и 200 мМ NaCl, используя микродиализную ячейку 10 кДа. Реакцию с FAM-SE проводили в этом же буфере, инкубируя 20–50 мкМ LigIII α с 40–200 мкМ реагентом в течение 18 ч при 4 °С в темноте. Реакцию останавливали добавлением к реакционной смеси (30–50 мкл) буфера, содержащего 100 мМ Hepes (pH 8,0), 200 мМ NaCl и 10 мМ DTT, до конечного объема 500 мкл. Белок отделяли от избытка реагента гель-фильтрацией на микроколонке Spin Trap G-25 («GE Healthcare», Швейцария). После концентрирования к белку добавляли глицерин до 40% для хранения при –30 °С и цетиловый эфир по-

лиоксиэтилена Brij 58 («Sigma», США) до 0,001% для предотвращения агрегации белка. Концентрацию белка и степень его мечения определяли спектрофотометрически на приборе CLARIOstar («GMB Labtech GmbH», Германия), используя коэффициенты экстинкции для FAM ϵ_{494} 80445 М⁻¹·см⁻¹ и для LigIII α ϵ_{280} 79300 М⁻¹·см⁻¹. Специфическую активность меченого фермента тестировали в реакции лигирования ³²P-меченой nick-ДНК как описано выше.

Эксперименты по связыванию FAM-LigIII α другими белками выполняли титрованием меченого белка (при фиксированной концентрации 40 нМ) отдельными белками Pol β и XRCC1 (в отсутствие или в присутствии второго партнера в концентрации 200 нМ) или эквимольной смесью XRCC1 и Pol β . Буфер связывания содержал 50 мМ Hepes (pH 8,0), 100 мМ NaCl и 5 мМ DTT. Измерения интенсивности флуоресценции образцов (объемом 12 мкл) проводили в непрозрачных полипропиленовых планшетах («Corning», США) с использованием микропланшетного флуориметра CLARIOstar («GMB Labtech GmbH», Германия). Длина волны возбуждения флуоресценции составляла 485 нм, изменение интенсивности флуоресценции детектировали на длине волны эмиссии 530 нм. В каждом независимом эксперименте измерения интенсивности флуоресценции при каждой концентрации белка-партнера проводились для трех одинаковых образцов. Количественную обработку экспериментальных данных выполняли в программе MARS Data analysis («GMB Labtech GmbH», Германия). Кривые связывания описываются уравнением:

$$F = F_0 + (F_{\infty} - F_0) / [1 + (EC_{50}/C)^n],$$

где F_0 , F и F_{∞} — интенсивность флуоресценции раствора FAM-LigIII α в отсутствие других белков, в присутствии белка-партнера в данной (C) и насыщающей концентрации соответственно, EC_{50} — концентрация белка-партнера, при которой $F - F_0 = (F_{\infty} - F_0)/2$, n — коэффициент Хилла. Все независимые эксперименты были выполнены не менее трех раз. Кривые связывания по усредненным экспериментальным данным построены в программе OriginPro 8.6; степень связывания, соответствующая максимальному сигналу при насыщающей концентрации белка-партнера ($F_{\infty} - F_0$), принята за единицу, а степень связывания при данной концентрации определена как отношение $(F - F_0)/(F_{\infty} - F_0)$.

Регистрация продуктов репарации ДНК, содержащей однонуклеотидную брешь, в присутствии ферментов и белков-участников SP BER. Стандартная реакционная смесь (объемом

10 мкл) содержала 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 50 мМ NaCl, 6 мМ MgCl₂, 50 нМ ³²P-меченную гар-ДНК, 10–50 нМ Pol β . Реакцию инициировали добавлением смеси нуклеотидов dATP, dGTP, dTTP и ddCTP до конечной концентрации каждого нуклеотида 10 мМ. Смеси инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. При изучении влияния белков на выход продуктов стандартная смесь содержала 50 нМ Pol β , 50–200 нМ XRCC1 или XRCC1ox, 10–50 нМ APE1, 10–50 нМ LigIII α (в присутствии 1 мМ АТР), как указано в подписях к рисункам. Реакцию останавливали добавлением равного объема буфера для нанесения образцов на денатурирующий ПААГ. Образцы инкубировали 2 мин при 90 °С, и продукты реакции разделяли электрофорезом в денатурирующем 20%-ном (m/v) ПААГ с мочевиной. Гели визуализировали с помощью сканера Typhoon FLA 9500 и анализировали выход продуктов реакции с помощью программы Quantity One.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование взаимодействия ДНК-лигазы III α с белком XRCC1 и ДНК-полимеразой β . Взаимодействие LigIII α с архитектурным белком XRCC1 и ферментом Pol β , катализирующим в процессе «короткозаплаточной» репарации синтез субстрата LigIII α , было исследовано методом флуоресцентного титрования путем измерения интенсивности флуоресценции FAM-меченой LigIII α в отсутствие и в присутствии немеченых белков (XRCC1, Pol β). Для мечения LigIII α N-оксисукцинимидным эфиром 5(6)карбоксифлуоресцеина (FAM-SE) преимущественно по N-концевой аминокислоте белка реакцию модификации проводили при pH 7,0 [21]. Условия реакции были оптимизированы варьированием концентрации белка и реагента для получения полностью активного белка, содержащего не более одного остатка флуоресцеина на молекулу белка. Такой препарат со стехиометрией мечения ~0,5 моль FAM на 1 моль белка был получен при инкубации 50 мкМ белка с 200 мкМ реагента.

Типичные кривые титрования FAM-LigIII α немечеными белками (LigIII α , Pol β и XRCC1) и соответствующие кривые связывания белков представлены на рис. 2. Максимальное увеличение интенсивности флуоресценции меченого белка в присутствии насыщающих концентраций белков-партнеров не превышало 20%, в отличие от зарегистрированных нами ранее для других FAM-меченых белков изменений в 1,5–2 раза [10]. Такое различие может быть обусловле-

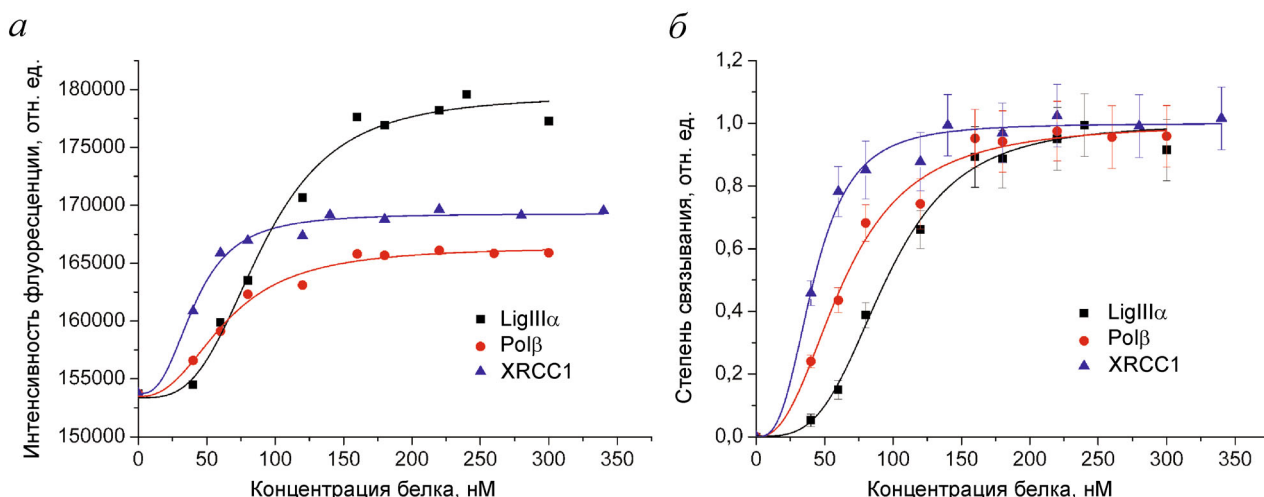


Рис. 2. Исследование гомо- и гетеро-ассоциации LigIIIα с белками-участниками BER методом флуоресцентного титрования. На панели *a* представлены типичные экспериментальные кривые титрования FAM-меченой LigIIIα (40 нМ) немечеными белками (LigIIIα, Polβ и XRCC1), на панели *б* – кривые связывания, рассчитанные из данных 3–5 независимых экспериментов (на графиках приведены средние значения $\pm$ стандартные отклонения). С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

но удаленностью флуорофора в FAM-LigIIIα от С-концевого BRCT-домена, на котором локализованы сайты как гомо-ассоциации LigIIIα, так и ее гетеро-ассоциации с белком XRCC1 [5]. Эффективная концентрация белка-партнера (EC_{50}), при которой увеличение интенсивности флуоресценции по сравнению с начальным уровнем ($F - F_0$) составляет половину от максимального увеличения при насыщающей концентрации [$(F_{\infty} - F_0)/2$], представляет собой кажущуюся

равновесную константу диссоциации комплекса. Сравнение этих характеристик для разных белков (таблица) указывает на образование более прочных комплексов при гетеро-ассоциации, чем при гомо-ассоциации LigIIIα. Сродство LigIIIα к XRCC1 ($EC_{50} = 42$ нМ) в 1,5 раза выше, чем к Polβ ($EC_{50} = 64$ нМ). В то же время XRCC1 обладает более высоким сродством к Polβ ($EC_{50} = 23$ нМ [10]), чем к LigIIIα. В целом, комплексы белка XRCC1 с Polβ и LigIIIα являются самыми прочными среди всех комплексов белков-участников BER, охарактеризованных нами одним и тем же равновесным методом [10].

Чтобы зарегистрировать формирование тройного комплекса XRCC1 с LigIIIα и Polβ к смеси FAM-LigIIIα с одним из партнеров (Polβ или XRCC1), присутствующим в высокой (практически насыщающей) концентрации, добавляли в возрастающей концентрации третий белок (XRCC1 или Polβ). В каждом эксперименте измеряли параллельно интенсивность флуоресценции FAM-LigIIIα при титровании соответствующим белком. Более высокий нулевой сигнал флуоресценции (F_0) для смеси FAM-LigIIIα с Polβ или XRCC1 в сравнении с FAM-LigIIIα (рис. 3, *a* и *б*) обусловлен образованием двойного комплекса. Увеличение этого сигнала при добавлении XRCC1 к смеси FAM-LigIIIα с Polβ (рис. 3, *a*) свидетельствует о взаимодействии XRCC1 с FAM-LigIIIα, несмотря на присутствие в смеси более предпочтительного для XRCC1 партнера в избыточной концентрации. Величи-

Количественные характеристики взаимодействия LigIIIα с белками BER

Меченый белок ^a	Белок-партнер ^б	EC_{50} ^в , нМ
FAM-LigIIIα	LigIIIα	91 ± 16
FAM-LigIIIα	Polβ	64 ± 11
FAM-LigIIIα	XRCC1	42 ± 8
FAM-LigIIIα	Polβ + XRCC1	46 ± 8
FAM-LigIIIα + Polβ	XRCC1	70 ± 13
FAM-LigIIIα + XRCC1	Polβ	н.о. ^г

^a Титрование FAM-LigIIIα (40 нМ) белком-партнером проводилось в отсутствие или в присутствии предварительно добавленного белка (Polβ или XRCC1) в избыточной концентрации (200 нМ).

^б Титрование FAM-LigIIIα отдельными белками или эквимолярной смесью Polβ и XRCC1.

^в Кажущиеся равновесные константы диссоциации комплексов белков. Приведены средние значения $\pm$ стандартные отклонения 3–5 независимых экспериментов.

^г Не определена из-за отсутствия изменения интенсивности флуоресценции.

на EC_{50} для связывания FAM-LigIII α с XRCC1 в тройной смеси (70 нМ) ниже суммарной концентрации XRCC1, необходимой для независимого связывания половины FAM-LigIII α (42 нМ) и половины Pol β (не менее 100 нМ), что указывает на формирование тройного комплекса белков. Отсутствие изменения нулевого сигнала флуоресценции смеси FAM-LigIII α с XRCC1 при добавлении Pol β (рис. 3, б) свидетельствует о том, что связывание Pol β с XRCC1 при образовании тройного комплекса не оказывает существенного влияния на взаимодействие между XRCC1 и FAM-LigIII α . Титрование FAM-LigIII α эквимольной смесью Pol β и XRCC1 показало увеличение интенсивности флуоресценции до более высокого уровня, чем при титровании белком Pol β (рис. 3, в), что указывает на

различное окружение флуорофора при образовании двойного комплекса FAM-LigIII α с Pol β или тройного комплекса с Pol β и XRCC1. Величина EC_{50} для связывания FAM-LigIII α в тройной смеси (46 нМ) сопоставима с величиной EC_{50} для ее двойного комплекса с XRCC1 (42 нМ). Совокупность этих фактов свидетельствует о преимущественном взаимодействии LigIII α с белком XRCC1 в их тройном комплексе с Pol β . Таким образом, впервые показано прямое взаимодействие между ферментами Pol β и LigIII α , катализирующими последовательные стадии SP BER, а также образование их тройного комплекса с координирующим белком XRCC1 (Pol β • XRCC1 • LigIII α). Ранее было показано прямое взаимодействие Pol β с ферментом LigI, завершающим LP BER [22].

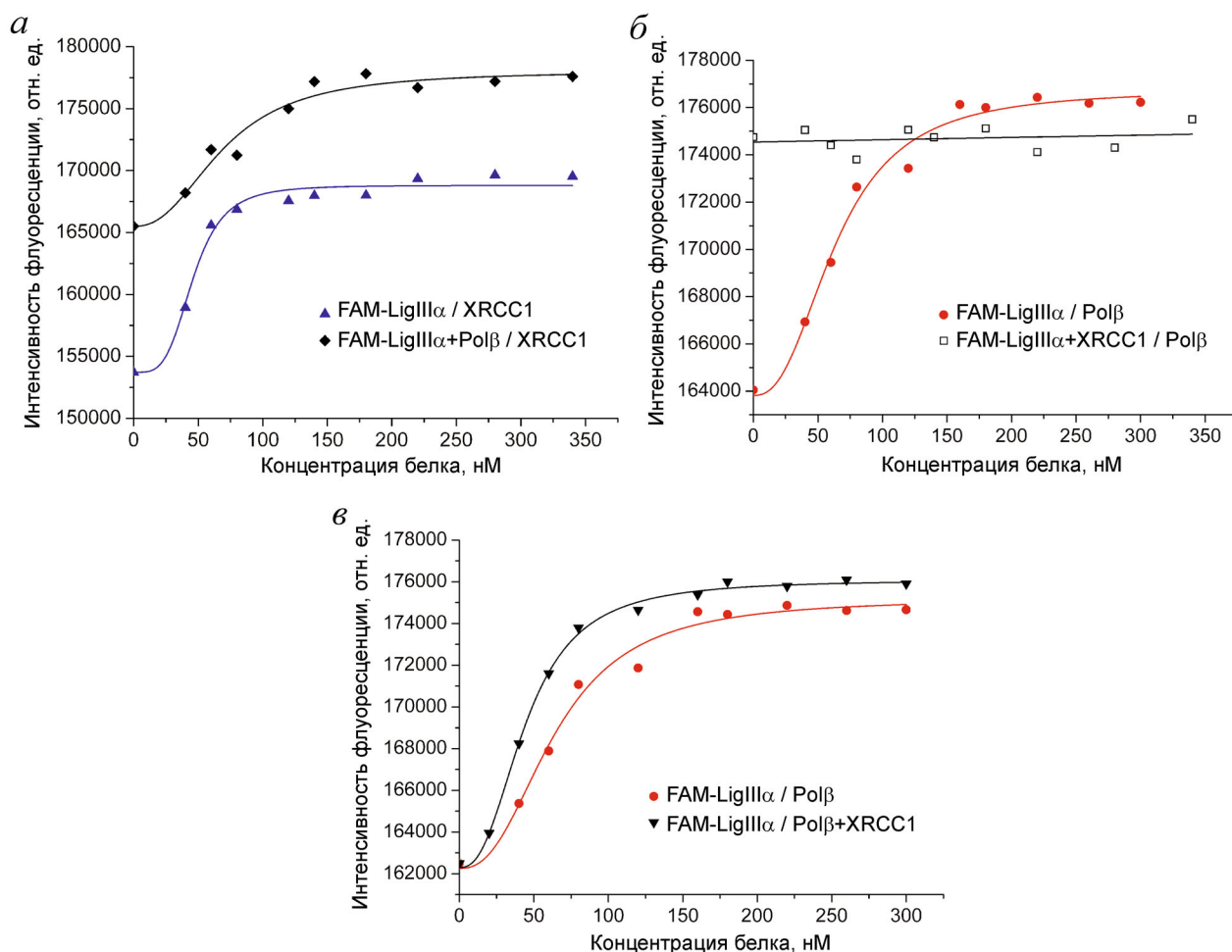


Рис. 3. Исследование формирования тройного комплекса LigIII α с Pol β и XRCC1. Типичные кривые флуоресцентного титрования (а) FAM-LigIII α (40 нМ) в отсутствие и в присутствии Pol β (200 нМ) белком XRCC1; (б) FAM-LigIII α (40 нМ) в отсутствие и в присутствии XRCC1 (200 нМ) белком Pol β ; (в) FAM-LigIII α (40 нМ) белком Pol β или эквимольной смесью белков Pol β и XRCC1. Кривые связывания, рассчитанные из усредненных данных независимых экспериментов, приведены на рис. S1 в Приложении к статье.

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

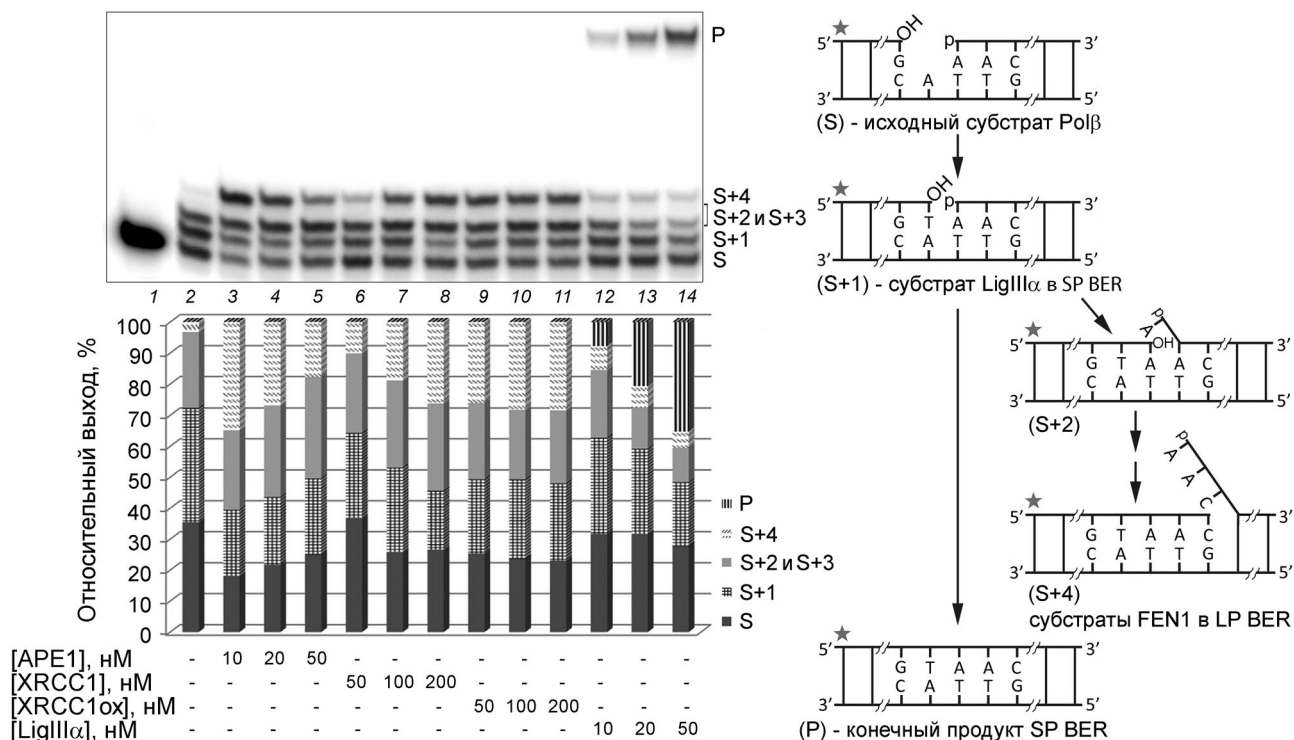


Рис. 4. Влияние на активность Polβ в репаративном синтезе ДНК белков-участников BER при их различных концентрациях. Представлены радиоавтограф геля после разделения продуктов репаративного синтеза ДНК, катализируемого Polβ в отсутствие и в присутствии других белков, и гистограмма относительных выходов продуктов удлинения и лигирования цепи ДНК в соответствующих образцах. 32 P-меченную гар-ДНК (50 нМ) инкубировали с Polβ (50 нМ) и смесью dATP, dGTP, dTTP и ddCTP (10 мкМ каждого) в течение 30 мин при 37 °C (дорожки 2–14) в отсутствие или в присутствии APE1 (10–50 нМ), XRCC1 или XRCC1ox (50–200 нМ) или LigIIIα (10–50 нМ). Остальные условия реакции описаны в Методах исследования. Обозначения: S — 32 P-меченный праймер (15-мер) в исходной ДНК, S+1 — S+4 — продукты удлинения праймера, P — конечный продукт репарации цепи после лигирования (32-мер); соответствующие структуры дуплексов (интермедиатов разных стадий SP/LP BER) приведены на схеме справа, где звездочкой показано положение 32 P-метки. Для продуктов включения одного/двух остатков dAMP (S+2 и S+3), не разрешенных в геле, приведен их суммарный выход. Представлены данные одного из трех независимых экспериментов; отклонения значений относительных выходов от средних значений составляли 2–10%

Исследование влияния на репаративный синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой β, других белков. Для исследования влияния белковых комплексов различного состава на активность Polβ в репаративном синтезе предварительно были найдены концентрации отдельных белков, при которых наблюдали активацию Polβ (рис. 4). Условия реакции были оптимизированы по концентрации Polβ и времени инкубации, чтобы тестировать продукты «коротко-» и «длиннозаплаточного» синтеза ДНК (заполнения бреши в гар-ДНК и синтеза с вытеснением цепи соответственно) при неполном превращении субстрата. Для ограничения длины продуктов синтеза с вытеснением цепи включением четырех нуклеотидов, реакцию проводили в присутствии соответствующего дидезоксинуклеотида (ddCTP). Стимулирующее влияние обычной формы XRCC1 на синтез ДНК с вытеснением цепи возрастало с увеличением концен-

трации белка от 50 до 200 нМ: доля продукта, соответствующего включению одного нуклеотида в репарруемую цепь (S+1) уменьшалась, а доля продукта, соответствующего включению 4-х нуклеотидов (S+4) увеличивалась (рис. 4, дорожки 6–8). В случае окисленной формы XRCC1 (XRCC1ox) не обнаружено зависимости эффектов от концентрации белка, варьируемой в том же диапазоне (рис. 4, дорожки 9–11). Для сравнения XRCC1 и в последующих экспериментах (в присутствии других участников) была выбрана концентрация 100 нМ, при которой наблюдали влияние обычной формы на общую эффективность превращения исходного субстрата и различия двух форм в оказываемых эффектах. LigIIIα наряду с каталитическим превращением продукта заполнения бреши (S+1) в конечный продукт «короткозаплаточной» репарации (P) стимулировала синтез с вытеснением цепи; этот эффект уменьшался с уве-

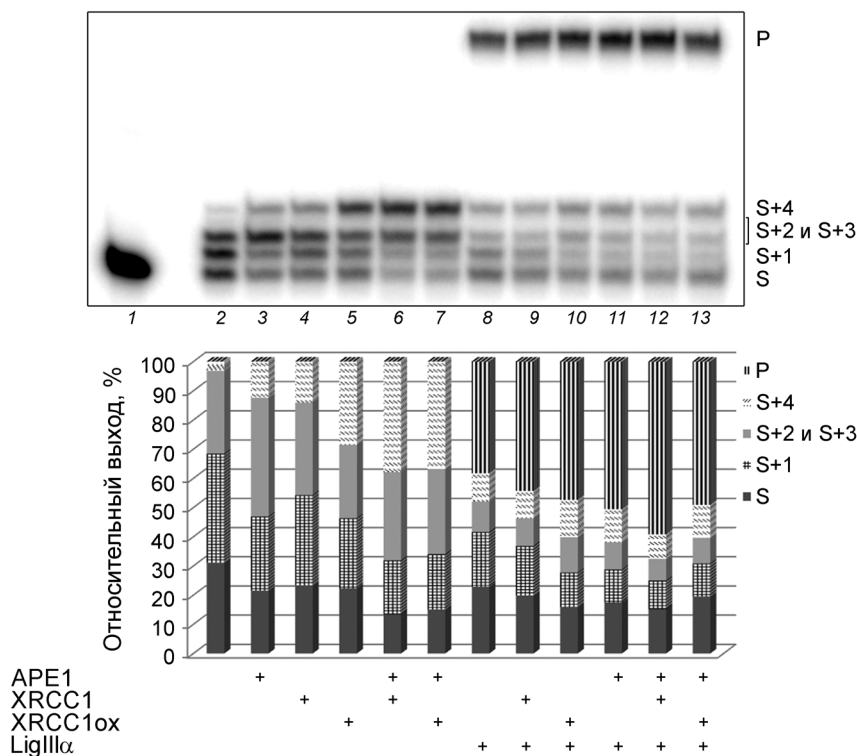


Рис. 5. Влияние белков-участников BER на репаративный синтез ДНК, катализируемый Polβ. Представлены радиоавтограф геля после разделения продуктов репаративного синтеза ДНК, катализируемого Polβ в отсутствие и в присутствии других белков (APE1, XRCC1, XRCC1ox и LigIIIα), и гистограмма относительных выходов продуктов удлинения и лигирования цепи ДНК в соответствующих образцах. ³²P-меченную гар-ДНК (50 нМ) инкубировали с Polβ (50 нМ) и смесью dATP, dGTP, dTTP и ddCTP (10 мкМ каждого) в течение 30 мин при 37°C (дорожки 2–13), в отсутствие или в присутствии (+) APE1 (50 нМ), разных форм XRCC1 (100 нМ) или LigIIIα (50 нМ). Остальные условия реакции описаны в «Методах исследования». Для продуктов включения одного/двух остатков dAMP (S+2 и S+3), не разрешенных в геле, приведен их суммарный выход. Обозначения регистрируемых в геле ДНК расшифрованы в подписи к рис. 4. Представлены данные одного из трех независимых экспериментов; отклонения значений относительных выходов от средних значений составляли 2–10%

личением концентрации фермента из-за более эффективного лигирования (рис. 4, дорожки 12–14). В качестве оптимальной была выбрана концентрация 50 нМ, при которой заметно уменьшалась доля исходного субстрата. Стимулирующее влияние APE1 на синтез ДНК с вытеснением цепи и общую эффективность превращения исходного субстрата уменьшалось с увеличением концентрации белка от 10 до 50 нМ из-за 3'-5'-экзонуклеазной активности фермента (рис. 4, дорожки 3–5), но еще наблюдалось при концентрации 50 нМ, используемой в последующих экспериментах.

Как видно из данных, представленных на рис. 5, отдельные белки APE1, XRCC1, XRCC1ox и LigIIIα оказывают сравнимые эффекты на общую эффективность превращения исходного субстрата: его доля в их присутствии уменьшается на ~10% (дорожки 3, 4, 5 и 8 по сравнению с дорожкой 2). По стимулирующему

действию на синтез с вытеснением цепи (увеличению выхода S+4) белки можно расположить в следующий ряд: XRCC1ox > XRCC1 > APE1 > LigIIIα. Окисленная форма XRCC1 значительно превосходит обычную форму в этом действии: доля S+4 в присутствии XRCC1ox больше в 2 раза, чем в присутствии XRCC1. Такое различие может быть объяснено более высоким сродством XRCC1ox к Polβ [4].

APE1 усиливает стимулирующий эффект XRCC1 на синтез с вытеснением цепи в большей степени, чем стимулирующий эффект XRCC1ox: доля S+4 увеличивается в 2,7 раза в первом случае и в 1,3 раза во втором (рис. 5, дорожки 6 и 7 по сравнению с дорожками 4 и 5). В результате этого в присутствии APE1 нивелируются различия между разными формами XRCC1. Формирование тройного комплекса XRCC1 с Polβ и APE1 показано нами ранее [10]. Сайт связывания APE1 локализован в линкер-

ной области (XL1), примыкающей к *N*-концевому домену XRCC1 (NTD), где локализован сайт связывания Pol β [4]. Не исключено, что окисление XRCC1 индуцирует перестройку не только NTD, где образуется (–S–S–) связь между остатками Cys12 и Cys20, но и в трехмерной структуре белка в целом. Более прочное связывание XRCC1 α с Pol β может оказывать негативное влияние на формирование их тройного комплекса с APE1.

Совместное действие LigIII α и XRCC1 α на общую эффективность превращения субстрата несколько превосходит действие LigIII α и XRCC1 (рис. 5, дорожка 10 по сравнению с дорожкой 9). LigIII α подавляет стимулирующий эффект обеих форм XRCC1 на синтез с вытеснением цепи, но превосходство XRCC1 α над XRCC1 в стимуляции этого синтеза сохраняется и в присутствии LigIII α (дорожки 9 и 10 по сравнению с дорожками 4 и 5 и по сравнению друг с другом). В свою очередь, обе формы XRCC1 усиливают активность LigIII α : выход конечного продукта репарации увеличивается на 6% и 9% в присутствии XRCC1 и XRCC1 α соответственно (дорожки 9 и 10 по сравнению с дорожкой 8). Интересно отметить, что суммарные выходы лигируемого интермедиата (S+1) и конечного продукта «короткозаплаточной» репарации (P) очень близки в присутствии LigIII α и XRCC1 (61%) или LigIII α и XRCC1 α (59%), но степень превращения S+1 в конечный продукт выше во втором случае (72% и 80% соответственно). Можно предположить, что формирование тройного комплекса белков и стабилизация взаимодействия Pol β с XRCC1 α (по сравнению с комплексом Pol β с XRCC1) способствуют передаче ДНК-интермедиата от одного фермента другому.

Общая эффективность превращения субстрата при совместном присутствии APE1 и LigIII α несколько превышает соответствующие уровни в присутствии отдельных белков (рис. 5, дорожка 11 по сравнению с дорожками 3 и 8). APE1 стимулирует активность LigIII α более эффективно, чем XRCC1 и XRCC1 α : выход конечного продукта увеличивается на 12% (дорожка 11 по сравнению с дорожками 9 и 10). В свою очередь, LigIII α подавляет стимулирующий эффект APE1 на синтез нелигируемых интермедиатов (S+2, S+3 и S+4): их выход в присутствии APE1 и LigIII α в 2,5 раза ниже, чем в присутствии APE1 и почти такой же, как в присутствии LigIII α (дорожка 11 по сравнению с дорожками 3 и 8). Активирующее действие APE1 на лигирование ДНК известно для LigI и указывает на активную роль фермента, ответственного за деблокирование 3'-концов в разрывах, в координации всего процесса репарации [23].

Наличие в реакционной смеси всех белковых участников SP BER показывает наиболее эффективную репарацию в комплексе с обычной формой XRCC1: в ее присутствии выход конечного продукта на 10% выше, чем в присутствии XRCC1 α (рис. 5, дорожка 12 по сравнению с дорожкой 13). Кроме этого, эффективность репарации в присутствии APE1, LigIII α и XRCC1 выше, чем в присутствии APE1 и LigIII α (на 9%) или LigIII α и XRCC1 (на 15%) (дорожка 12 по сравнению с дорожками 11 и 9). Такой результат может быть обусловлен комбинацией более сильного действия APE1 по сравнению с XRCC1 или XRCC1 α на активность LigIII α и пониженным стимулирующим действием XRCC1 по сравнению с XRCC1 α на синтез нелигируемых ДНК-интермедиатов, что в целом может указывать на формирование в случае XRCC1 более устойчивого мультибелкового ансамбля с участием всех белков. Действительно, распределение продуктов в присутствии LigIII α и XRCC1 α меняется незначительно при добавлении APE1 (дорожка 10 по сравнению с дорожкой 13). Таким образом, влияние окисления белка XRCC1 на эффективность репарации ДНК-субстрата, катализируемой Pol β по «короткозаплаточному» маршруту, зависит от состава «репарасомы».

С использованием равновесного метода флуоресцентного титрования нами впервые показано образование *in vitro* тройного комплекса ключевых участников SP BER – архитектурного белка XRCC1 с ферментами Pol β и LigIII α . Pol β и LigIII α , прямое взаимодействие которых в отсутствие XRCC1 зарегистрировано впервые, образуют менее прочный комплекс по сравнению с комплексами Pol β -XRCC1 и LigIII α -XRCC1. Эти результаты объясняют, почему образование тройного комплекса может обеспечить более эффективную координацию заключительных стадий процесса BER. Тройной комплекс белков не был зарегистрирован в цельноклеточном экстракте [9], что может быть обусловлено его нестабильностью в неравновесных условиях гель-фильтрации и/или дестабилизирующим действием других белков экстракта. В то же время, в другой работе показано совместное присутствие XRCC1, Pol β и LigIII α в целом ряде мультибелковых комплексов BER, выделенных из ядерных экстрактов [24]. В пользу существования тройного комплекса *in vivo* указывает синхронная локализация XRCC1, Pol β и LigIII α на повреждениях ДНК [25].

Стабильность комплекса XRCC1 с Pol β регулируется окислением архитектурного белка с образованием дисульфидной связи между остатками Cys12 и Cys20 в *N*-концевом домене, где

локализован сайт связывания Pol β [4]. XRCC1 α присутствует в клетках млекопитающих, и от относительного содержания этой формы XRCC1 зависит цитотоксичность окислительных агентов, обусловленная дефицитом BER [14, 15]. Значительное различие клеток, экспрессирующих XRCC1 дикого типа или его Cys12Ala мутант (не образующий окисленной формы), в их выживаемости обнаружено лишь в экстремальных условиях окисления — при подавлении активности системы, синтезирующей глутатион [15]. Показано, что наличие окисленной формы XRCC1 ускоряет аккумуляцию Pol β на повреждениях ДНК [14, 15], но до сих пор не установлено как окислительная модификация XRCC1 может влиять на формирование репаративных комплексов и собственно процесс репарации. С использованием реконструированной системы мы показали, что от образования тройного комплекса и окисления белка XRCC1 зависит эффективность репарации ДНК по «короткозаплаточному» маршруту BER. XRCC1 α превосходит обычную форму XRCC1 в стимулирующем действии на каталитическую активность Pol β и LigIII α . Однако в присутствии APE1 окисление XRCC1 снижает выход конечного продукта репарации. Таким образом, стимуляция репаративного синтеза ДНК окислением XRCC1 может иметь значение для эффективного восстановления некоторых повреждений ДНК. Так, репарация поврежденных оснований, удаляемых бифункциональными ДНК-гликозилазами по механизму β/δ элиминации, и ряда одноцепочечных разрывов не требует участия APE1 (рис. 1).

Состав белковых комплексов BER зависит от типа и уровня повреждений ДНК, и репарация при высоких уровнях любых повреждений требует участия PARP1 для более эффективной сборки репаративных комплексов [24]. Уровень автомодификации PARP1 синтезируемым полимером ADP-рибозы (PAR) влияет на сродство PARP1 к ДНК-интермедиатам BER и рассматривается как фактор регуляции процесса репарации ДНК [1, 3]. XRCC1 обладает высоким сродством к PAR и играет первостепенную роль в сборке комплексов репарации с участием PARP1 [26]. Кроме этого, XRCC1 является эффективной мишенью ADP-рибозилирования и регулирует уровень автомодификации PARP1, подавляя элонгацию PAR [27]. Как нами недавно установлено, окисление XRCC1 оказывает негативное влияние на взаимодействие этого белка с PAR и акцепторную активность в реакции ADP-рибозилирования, что подавляет ингибирующее действие белка на автомодификацию PARP1 [28]. Различие между разными фор-

мами XRCC1 в их способности регулировать уровень автомодификации PARP1 усиливается в присутствии Pol β [28], что указывает на возможную кооперацию XRCC1 и Pol β в этом процессе. Таким образом, соотношение уровней XRCC1 и XRCC1 α может регулировать время жизни комплекса PAR—PARP1 с поврежденной ДНК. В настоящем исследовании мы обнаружили, что присутствие в большинстве исследованных комплексов XRCC1 α вместо XRCC1 увеличивает долю нелигируемых ДНК-интермедиатов, что требует их более эффективной репарации в повторном цикле. Их репарация может происходить по «длиннозаплаточному» маршруту с участием Pol β и FEN1. В свою очередь, активность Pol β в LP BER регулируется PARP1 и его PARилированием: PARP1 подавляет синтез ДНК и FEN1-зависимую стимуляцию репарации, но его ингибирующее действие снижается при автомодификации PARP1 [29]. В то же время взаимодействие PARP1 с ДНК-интермедиатами SP BER не влияет на эффективность репарации по этому маршруту из-за отсутствия ингибирующего действия PARP1 на dRp-лиазную активность Pol β и лигирующую активность LigIII α [29–31]. Таким образом, обеспечивая тонкую регуляцию уровня автомодификации PARP1, окисление XRCC1 может способствовать более эффективной репарации нелигируемых ДНК-интермедиатов в повторном цикле с участием PARP1. Совокупность результатов ранее проведенного [28] и настоящего исследования позволяет заключить, что окислительно-восстановительный статус XRCC1 может влиять на эффективность BER как на стадии формирования репаративных комплексов регуляцией уровня автомодификации PARP1, так и на стадии репаративного синтеза.

Финансирование. Нарботка рекомбинантных белков для исследования выполнена при поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. (№ АААА-А17-117020210022-4); исследование белок-белковых взаимодействий поддержано грантом Российского Научного Фонда (проект № 19-14-00107).

Благодарности. Авторы благодарны доктору С. Вильсону (Dr. S.H. Wilson, National Institute of Health, North Carolina, США), доктору Х.П. Радичелле (Dr. J.P. Radicella, UMR217 CNRS/CEA, Франция) и доктору Г. Дианову (Dr. G. Dianov, Oxford University, UK) за предоставленные плазмидные векторы для экспрессии белков. Авторы выражают глубокую благодарность студенту Новосибирского государственного университета

Чжао Минсин за участие в экспериментах по флуоресцентному титрованию.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит исследований с участием людей

или использованием животных в качестве объектов.

Приложение к статье. Дополнительные материалы размещены в электронной версии журнала на сайтах: <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>; <https://link.springer.com/journal/10541>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abbotts, R., and Wilson, D.M. 3rd (2017) Coordination of DNA single strand break repair, *Free Radic. Biol. Med.*, **107**, 228–244, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.039.
- Whitaker, A.M., Schaich, M.A., Smith, M.R., Flynn, T.S., and Freudenthal, B.D. (2017) Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease, *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, **22**, 1493–1522, doi: 10.2741/4555.
- Caldecott, K.W. (2014) DNA single-strand break repair, *Exp. Cell. Res.*, **329**, 2–8, doi: 10.1016/j.yexcr.2014.08.027.
- London, R.E. (2015) The structural basis of XRCC1-mediated DNA repair, *DNA Repair (Amst.)*, **30**, 90–103, doi: 10.1016/j.dnarep.2015.02.005.
- Moor, N.A., and Lavrik, O.I. (2018) Protein–protein interactions in DNA base excision repair, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 411–422, doi: 10.1134/S0006297918040120.
- Dutta, A., Yang, C., Sengupta, S., Mitra, S., and Hegde, M.L. (2015) New paradigms in the repair of oxidative damage in human genome: mechanisms ensuring repair of mutagenic base lesions during replication and involvement of accessory proteins, *Cell. Mol. Life Sci.*, **72**, 1679–1698, doi: 10.1007/s00018-014-1820-z.
- Caldecott, K.W., McKeown, C.K., Tucker, J.D., Ljungquist, S., and Thompson, L.H. (1994) An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III, *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 68–76, doi: 10.1128/mcb.14.1.68.
- Kubota, Y., and Horiuchi, S. (2003) Independent roles of XRCC1's two BRCT motifs in recovery from methylation damage, *DNA Repair (Amst.)*, **2**, 407–415, doi: 10.1016/s1568-7864(02)00242-2.
- Parsons, J.L., Dianova, I.I., Allinson, S.L., and Dianov, G.L. (2005) DNA polymerase beta promotes recruitment of DNA ligase III alpha-XRCC1 to sites of base excision repair, *Biochemistry*, **44**, 10613–10619, doi: 10.1021/bi050085m.
- Moor, N.A., Vasil'eva, I.A., Anarbaev, R.O., Antson, A.A., and Lavrik, O.I. (2015) Quantitative characterization of protein-protein complexes involved in base excision DNA repair, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 6009–6022, doi: 10.1093/nar/gkv569.
- Kubota, Y., Nash, R.A., Klungland, A., Schär, P., Barnes, D.E., and Lindahl, T. (1996) Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein, *EMBO J.*, **15**, 6662–6670, doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb01056.x.
- Wong, H.K., and Wilson, D.M. 3rd (2005) XRCC1 and DNA polymerase beta interaction contributes to cellular alkylating-agent resistance and single-strand break repair, *J. Cell. Biochem.*, **95**, 794–804, doi: 10.1002/jcb.20448.
- Fang, Q., Inanc, B., Schamus, S., Wang, X.H., Wei, L., Brown, A.R., Svilar, D., Sugrue, K.F., Goellner, E.M., Zeng, X., Yates, N.A., Lan, L., Vens, C., and Sobol, R.W. (2014) HSP90 regulates DNA repair via the interaction between XRCC1 and DNA polymerase beta, *Nat. Commun.*, **5**, 5513, doi: 10.1038/ncomms6513.
- Horton, J.K., Stefanick, D.F., Gassman, N.R., Williams, J.G., Gabel, S.A., Cuneo, M.J., Prasad, R., Kedar, P.S., Deroose, E.F., Hou, E.W., London, R.E., and Wilson, S.H. (2013) Preventing oxidation of cellular XRCC1 affects PARP-mediated DNA damage responses, *DNA Repair (Amst.)*, **12**, 774–785, doi: 10.1016/j.dnarep.2013.06.004.
- Horton, J.K., Seddon, H.J., Zhao, M.L., Gassman, N.R., Janoshazi, A.K., Stefanick, D.F., and Wilson, S.H. (2017) Role of the oxidized form of XRCC1 in protection against extreme oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.*, **107**, 292–300, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.005.
- Kumar, A., Widen, S.G., Williams, K.R., Kedar, P., Karpel, R.L., and Wilson, S.H. (1990) Studies of the domain structure of mammalian DNA polymerase beta. Identification of a discrete template binding domain, *J. Biol. Chem.*, **265**, 2124–2131.
- Belousova, E.A., Vasil'eva, I.A., Moor, N.A., Zatssepina, T.S., Oretskaya, T.S., and Lavrik, O.I. (2013) Clustered DNA lesions containing 5-formyluracil and AP site: repair via the BER system, *PLoS One*, **8**, e68576, doi: 10.1371/journal.pone.0068576.
- Strauss, P.R., Beard, W.A., Patterson, T.A., and Wilson, S.H. (1997) Substrate binding by human apurinic/apyrimidinic endonuclease indicates a Briggs-Haldane mechanism, *J. Biol. Chem.*, **272**, 1302–1307, doi: 10.1074/jbc.272.2.1302.
- Chim, N., Harmston, C.A., Guzman, D.J., and Goulding, C.W. (2013) Structural and biochemical characterization of the essential DsbA-like disulfide bond forming protein from *Mycobacterium tuberculosis*, *BMC Struct. Biol.*, **13**, 23, doi: 10.1186/1472-6807-13-23.
- Wunderlich, M., and Glockshuber, R. (1993) Redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) from *Escherichia coli*, *Protein Sci.*, **2**, 717–726, doi: 10.1002/pro.5560020503.
- Haugland, R.P. (2005) *The Handbook – a Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10th edn., Invitrogen Corp., USA.
- Dimitriadis, E.K., Prasad, R., Vaske, M.K., Chen, L., Tomkinson, A.E., Lewis, M.S., and Wilson, S.H. (1998) Thermodynamics of human DNA ligase I trimerization and association with DNA polymerase beta, *J. Biol. Chem.*, **273**, 20540–20550, doi: 10.1074/jbc.273.32.20540.
- Ranalli, T.A., Tom, S., and Bambara, R.A. (2002) AP endonuclease 1 coordinates flap endonuclease 1 and DNA ligase I activity in long patch base excision repair, *J. Biol. Chem.*, **277**, 41715–41724, doi: 10.1074/jbc.M207207200.
- Hanssen-Bauer, A., Solvang-Garten, K., Sundheim, O., Peña-Díaz, J., Andersen, S., Slupphaug, G., Krokan, H.E., Wilson, D.M. 3rd, Akbari, M., and Otterlei, M. (2011) XRCC1 coordinates disparate responses and multiprotein repair complexes depending on the nature and context of the DNA damage, *Environ. Mol. Mutagen.*, **52**, 623–635, doi: 10.1002/em.20663.
- Lan, L., Nakajima, S., Oohata, Y., Takao, M., Okano, S., Masutani, M., Wilson, S.H., and Yasui, A. (2004) *In situ* analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 13738–13743, doi: 10.1073/pnas.0406048101.
- Polo, L.M., Xu, Y., Hornyak, P., Garces, F., Zeng, Z., Hailstone, R., Matthews, S.J., Caldecott, K.W., Oliver, A.W.,

- and Pearl, L.H. (2019) Efficient single-strand break repair requires binding to both poly(ADP-ribose) and DNA by the central BRCT domain of XRCC1, *Cell Rep.*, **26**, 573–581, doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.082.
27. Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller S., Menissier-de Murcia, J. and de Murcia, G. (1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage, *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3563–3571, doi: 10.1128/mcb.18.6.3563.
 28. Vasil'eva, I.A., Moor, N.A., and Lavrik, O.I. (2019) Role of oxidation of XRCC1 protein in regulation of mammalian DNA repair process, *Doklady Biochem. Biophys.*, **489**, doi: 10.1134/S1607672919060012.
 29. Sukhanova, M., Khodyreva, S., and Lavrik, O. (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase beta in long patch base excision repair, *Mutat. Res.*, **685**, 80–89, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.08.009.
 30. Prasad, R., Lavrik, O.I., Kim, S.J., Kedar, P., Yang, X.P., Vande Berg, B.J., and Wilson, S.H. (2001) DNA polymerase beta-mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis, *J. Biol. Chem.*, **276**, 32411–32414, doi: 10.1074/jbc.C100292200.
 31. Leppard, J.B., Dong, Z., Mackey, Z.B., and Tomkinson, A.E. (2003) Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair, *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 5919–5927, doi: 10.1128/mcb.23.16.5919-5927.2003.

INFLUENCE OF HUMAN XRCC1 PROTEIN OXIDATION ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF ITS COMPLEXES WITH KEY ENZYMES OF DNA BASE EXCISION REPAIR*,**

I. A. Vasil'eva^{1#}, N. A. Moor^{1#}, and O. I. Lavrik^{1,2***}

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

² Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia

Received November 29, 2019

Revised January 20, 2020

Accepted January 27, 2020

Base Excision Repair (BER) ensures correction of the most abundant DNA lesions in mammals. The efficiency of this multistep repair process occurring via various sub-pathways depends on the coordinated action of enzymes catalyzing individual steps. Scaffold XRCC1 protein plays an important coordinating role in the repair of base damages and apurinic/apyrimidinic (AP) sites via short patch sub-pathway and in the repair of single-strand breaks. In this study we showed for the first time the *in vitro* formation of a ternary complex of XRCC1 protein with the key enzymes of short patch BER, DNA polymerase β (Pol β) and DNA ligase III α (LigIII α), using fluorescence titration technique. Pol β interacts directly with LigIII α , but this complex is less stable than XRCC1–Pol β and XRCC1–LigIII α complexes. The influence of both XRCC1 oxidation and composition of the multiprotein complex on the efficiency of DNA repair synthesis and DNA ligation has been explored. The oxidation-induced formation of disulfide bond between Cys12 and Cys20 of XRCC1, modulating, as shown previously, the protein affinity for Pol β , affects the yield of both the final product of short-patch BER and the non-ligated DNA intermediates (substrates of long-patch BER). The effect of XRCC1 oxidation on the yield of the final product depends on the presence of AP endonuclease 1. Our cumulative (previous and present) results indicate the important role of XRCC1 oxidation in fine regulation of the formation and functional activity of BER complexes.

Keywords: DNA base excision repair, protein–protein interactions, human XRCC1 protein, DNA polymerase β , DNA ligase III α

УДК 577.2

РОЛЬ ГЕНОВ *LAM* В ГИБЕЛИ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *S. cerevisiae*, ВЫЗВАННОЙ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ПОЛОВОГО ФЕРОМОНА*

© 2020 С.С. Соколов^{1**}, К.В. Галкина¹, Е.А. Литвинова²,
Д.А. Кнорре^{1,3}, Ф.Ф. Северин¹

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: sviatoslav.sokolov@gmail.com

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

³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119992 Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.11.2019

После доработки 21.01.2020

Принята к публикации 21.01.2020

Белки Lam1–Lam4 осуществляют невезикулярный транспорт стерина из плазматической мембраны (ПМ) в эндоплазматический ретикулум, нарушение их работы приводит к увеличению содержания стерина в ПМ. У животных гомологи белков Lam отвечают за интернализацию холестерина из плазмы крови. Биологическая роль дрожжевых белков Lam остается неясной, так как выраженные фенотипы у штаммов с делецией отдельных генов *LAM* не наблюдаются. Однако известно, что делеция *LAM1* (*YSP1*) препятствует регулируемой гибели клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, вызванной половым феромоном. Мы исследовали, будет ли мутация по гену *LAM2* также влиять на гибель клеток в присутствии избытка полового феромона и оценили характер генетических взаимодействий между *LAM2* и генами, отвечающими за биосинтез эргостерина. Мы показали, что делеция *LAM2* частично предотвращает гибель клеток дрожжей лабораторного штамма *W303*, вызванную половым феромоном. При этом делеция трех других генов *LAM* – *LAM1*, *LAM3* и *LAM4* – дополнительно не увеличивала этот эффект. Мутация в гене транскрипционного фактора *UPC2*, приводящая к избыточному накоплению стерина в клетке (*UPC2-1*), приводила к увеличению выживаемости клеток в присутствии α -фактора и проявляла аддитивность с делецией *LAM2*. В то же время в лабораторном штамме *BY4741* делеция *LAM2* наоборот стимулировала гибель клеток, вызванную феромоном. Мы обнаружили, что делеция генов биосинтеза эргостерина *ERG2* и *ERG6* снижала эффект от делеции *LAM2*. В штамме *Derg4*, в котором делегирован ген терминального этапа пути биосинтеза эргостерина, делеция *LAM2* заметно увеличивала долю мертвых клеток и снижала скорость роста суспензионной культуры клеток этого штамма даже в отсутствие феромона. Мы предполагаем, что отсутствие эффекта от делеции гена *LAM2* в штаммах *Derg6* и *Derg2* указывает на неспособность Lam2p транспортировать некоторые интермедиаты биосинтеза эргостерина, такие как ланостерин. В совокупности наши данные говорят о том, что роль белков Lam в клеточной смерти дрожжей, вызванной феромоном, обусловлена их воздействием на стеринный состав ПМ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гены *LAM*, дрожжи, клеточная смерть, половой феромон, стерин.

DOI: 10.31857/S0320972520030057

У многоклеточных организмов запрограммированная гибель клеток (запрограммированная клеточная смерть, ЗКС) играет важную роль в индивидуальном развитии, иммунитете и поддержании тканевого гомеостаза [1, 2]. Наличие и физиологическая роль ЗКС у одноклеточных организмов до сих пор остается открытым воп-

росом. В случае хорошо изученного модельного объекта — пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — принято различать: СКС (случайную клеточную смерть, accidental cell death), вызванную стрессорными факторами высокой интенсивности и сопряженной с потерей барьерной функции плазматической мембраны (ПМ), и

Принятые сокращения: ЗКС — запрограммированная клеточная смерть, КОЕ — колониеобразующая единица; ПМ — плазматическая мембрана; РКС — регулируемая гибель клеток; ЭР — эндоплазматический ретикулум.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-339, 24.02.2020.

** Адресат для корреспонденции.

РКС (регулируемую клеточную смерть) [3]. Под РКС подразумевают клеточную гибель, вызванную слабыми стрессорными условиями, внешними или внутренними сигналами, которые можно искусственно предотвратить, например, путем выключения работы определенных генов. ЗКС является естественным (физиологическим) сценарием РКС. В настоящее время описано довольно много индукторов РКС дрожжей и других одноклеточных организмов, однако физиологическая роль РКС во многих случаях остается неизвестной [4–8].

Ранее мы показали, что высокая концентрация полового феромона α -фактора (100 мкг/мл) вызывает РКС дрожжей α -типа спаривание [9, 10]. Действие полового феромона сопровождается увеличением в цитоплазме концентрации кальция [11], поэтому было высказано предположение, что увеличение концентрации кальция в цитоплазме может быть фактором, принимающим участие в развитии цепи событий, приводящей к гибели клеток [10]. Антиаритмический препарат амиодарон также вызывает увеличение концентрации кальция в цитоплазме [12] и активирует цепь событий внутри клетки, схожую с той, которая включается в ответ на добавление 100 мкг/мл феромона [10]. Следует отметить, что даже такие высокие концентрации α -фактора приводят к гибели лишь определенной фракции клеток в суспензии, в то время как существенная часть (50–80%) клеток сохраняют жизнеспособность. Размер этой фракции зависит от штамма и дальнейшее увеличение концентрации феромона не приводит к увеличению доли мертвых клеток [13]. Механизмы, ограничивающие гибель клеток в присутствии избытка полового феромона, до сих пор неизвестны. Мутация в гене кальмодулина *cmd1-6* [9] или делеция гена метаксазы дрожжей *MCA1* [13] приводят к значительному увеличению количества мертвых клеток в присутствии избытка феромона.

Ранее мы провели два скрининга, направленных на поиск генов — положительных регуляторов ЗКС дрожжей, вызванной феромоном и амиодароном. В результате были выявлены гены *LAM1* и *LAM2*, снижающие резистентность клеток к амиодарону [10, 14]. Первоначально эти гены были названы *YSP1* и *YSP2* (от Yeast Suicidal Proteins), однако позднее переименованы в *LAM1* и *LAM2* (от LAM — Lipid transfer protein Anchored at Membrane contactsites, транспортер липидов, заякоренный в контактных сайтах мембраны) соответственно. Делеция гена *LAM1* также частично защищала клетки от гибели, вызванной феромоном [10].

Недавно было показано, что *LAM1* и *LAM2* кодируют белки, принадлежащие одному се-

мейству мембранных стерин-связывающих белков [15]. Функция этих белков, предположительно, заключается в транспорте стерина между ПМ и эндоплазматическим ретикуломом (ЭР). В случае многоклеточных животных такой транспорт необходим для захвата холестерина из плазмы крови [16]. Для пекарских дрожжей было показано, что делеция *LAM1* приводит к снижению резистентности клеток к антигрибковому препарату амфотерицину В [15]. Поскольку амфотерицин В способен встраиваться и нарушать функции только тех мембран, где содержится эргостерин [17], увеличение чувствительности делеционных мутантов *Δlam1* и *Δlam2* к амфотерицину В указывает на то, что нарушение транспорта стерина в дрожжах приводит к увеличению содержания эргостерина в плазматической мембране. Недавно мы показали, что делеции генов семейства *LAM* действительно приводят к увеличению содержания стерина в плазматической мембране и во внутренних компартментах клетки [18].

Помимо *LAM1* и *LAM2* в геноме пекарских дрожжей есть еще четыре паралогичных гена того же семейства: *LAM3*, *LAM4*, *LAM5* и *LAM6*. При этом синтезируемые ими белки Lam1, Lam2, Lam3 и Lam4 локализованы в местах контактов ПМ и ЭР, в то время как Lam5 и Lam6 — в местах контакта ЭР и митохондрий (см. обзоры Alli-Balogun и Levine [19] и Sokolov et al. [20]).

Открытие роли белков Lam в транспорте стерина поставило вопрос о роли стеринового состава мембраны в РКС дрожжей. Возможно, эффекты делеций генов *LAM1* и *LAM2*, на РКС, вызванную феромоном, амиодароном и ацетатом, являются следствием изменения содержания эргостерина в ПМ. В этом случае другие воздействия на клетку, повышающие или понижающие содержание стерина в дрожжах, предположительно, будут оказывать такое же воздействие. Альтернативой этому предположению является непосредственное участие белков Lam в трансдукции сигнала, приводящего к гибели клеток. Более того, до сих пор не известно способны ли паралогичные гены *LAM* дублировать функции друг друга или каждый из них имеет свою узкую специализацию внутри клетки.

В своей работе мы исследовали РКС, вызванную высокой концентрацией полового феромона и амиодароном. Для этих индукторов РКС мы оценили роль делеций гена *LAM2* и мутаций, приводящих как к увеличению содержания стерина (*UPC2-1*), так и к нарушению терминальных стадий биосинтеза стерина (*Δerg2*, *Δerg3*, *Δerg4*, *Δerg6*). Кроме того, мы сравнили эффект от одиночной делеции гена *LAM2* с эф-

фектом от делеции всех четырех генов *LAM* (*LAM1–LAM4*). Полученные нами и ранее опубликованные данные указывают на то, что роль генов *LAM* в РКС дрожжей опосредована изменениями в стеринном составе мембраны.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы, условия культивирования дрожжей и реагенты. Реактивы, используемые в исследовании: амиодарон, α -фактор, пропиция йодид, синтетическая среда YNB, аминокислотные добавки и галактоза («Sigma-Aldrich», США), дрожжевой экстракт, пептон и агар («Difco», США), глюкоза («Helicon», Россия). Клетки выращивали на средах: YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% глюкоза) и YPGal (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон и 2% галактоза). В твердые среды добавляли агар до 2%. Штаммы *UPC2-1*, *$\Delta lam1$* , *$\Delta lam2$* , *$\Delta lam3$* , *$\Delta lam4$* и *$\Delta lam1\Delta lam2\Delta lam3\Delta lam4$* — производные *W303*. Штаммы *$\Delta erg2$* , *$\Delta erg2\Delta ysp2$* , *$\Delta erg3$* , *$\Delta erg3\Delta ysp2$* , *$\Delta erg4$* , *$\Delta erg4\Delta ysp2$* , *$\Delta erg5$* , *$\Delta erg5\Delta ysp2$* , *$\Delta erg6$* , *$\Delta erg6\Delta ysp2$* — производные штамма *BY4741* (таблица).

Смена типа спаривания. Для смены типа спаривания мы трансформировали штаммы плазмидой *pGAL-НО*, в которой закодирована экзонуклеаза *НО* под контролем галактозо-регулируемого промотора *P_{GAL}*, по методу, опубликованному в работе Herskowitz и Jensen [21]. Полученные штаммы инкубировали ночь в среде YPGal (2% галактоза) и переносили на твердую среду YPD (2% глюкоза). Тип спаривания полученных таким образом отдельных колоний определяли контрольным скрещиванием со штаммами α и альфа типа. Колонии с нужным типом спаривания сутки выращивали в жидкой среде YPD для потери плазмиды *pGAL-НО*. Потерю плазмиды *pGAL-НО* проверяли по отсутствию роста на селективной среде YNB-leu («Sigma-Aldrich», США).

Индукция РКС амиодароном, и оценка жизнеспособности клеток дрожжей. Клетки выращивали 12–16 ч до логарифмической стадии роста и разводили до конечной плотности 4×10^6 клеток/мл в YPD с добавлением 25 мМ MES (2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота) («Sigma-Aldrich», США), pH 5,5. К суспензии клеток добавляли амиодарон до конечной концентрации 60 мкМ. Инкубацию с амиодароном проводили в течение часа при 30 °С. Затем клетки разбавляли и переносили на твердую среду YPD. Через 24 ч измеряли долю выживших клеток, как соотношение колониеобразующих единиц (КОЕ) после стресса к КОЕ до стресса.

Оценка эффективности скрещивания штаммов. Клетки обоих типов спаривания выращивали 12–16 ч до логарифмической стадии роста и разводили в жидкой YPD до конечной плотности $\sim 2 \times 10^6$ клеток/мл. Далее смешивали клетки противоположных типов спаривания и инкубировали 6 ч при 30 °С. После инкубации смесь клеток микроскопировали и подсчитывали долю зигот на 250–300 клеток.

Проточная цитофлуориметрия, индукция РКС половым феромоном. Клетки выращивали 12–16 ч в жидкой среде YPD до конечной плотности 4×10^6 клеток/мл. К суспензии добавляли α -фактор до конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали 4 ч на качалке («New Brunswick Scientific», США) при 200 об./мин 30 °С. В качестве отрицательного контроля использовали суспензию клеток, не обработанную α -фактором, которую также инкубировали 4 ч на качалке при 30 °С. В качестве положительного контроля (мертвые клетки) использовали суспензию клеток, которую инкубировали 3 ч при 50 °С. После инкубации все образцы разводили в 8 раз в фосфатно-солевом буфере PBS («Gibco», США) и окрашивали пропидий йодидом в концентрации 0,5 мкг/мл в течение 10 мин. Пропидий йодид — флуоресцентный зонд, не способный проникать в живые клетки и окрашивающий мертвые клетки [22]. Флуоресценцию клеток, окрашенных пропидий йодидом, анализировали с помощью проточных цитофлуориметров CytoFlex («Beckman», США) и Beckman Coulter FC 500 («Beckman», США) при длине волны возбуждения 488 нм и эмиссионном фильтре 690/50 нм. Каждый эксперимент был выполнен не менее чем в трех независимых повторях, полученных в разные дни. В каждом эксперименте анализировали не менее 10 000 событий (клеток).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Делеция гена *LAM2* частично предотвращает гибель клеток, вызванную избытком полового феромона, и не проявляет аддитивность с делециями генов *LAM1*, *LAM3* и *LAM4*.

Как отмечалось выше, в геноме дрожжей содержатся четыре гена *LAM* (*LAM1–LAM4*). Кодированные ими белки (*Lam1–Lam4*) локализованы в местах контакта ПМ и ЭР. Ген *LAM2* (*YSP2*) был ранее найден нами в результате генетического скрининга, направленного на поиск мутаций, снижающих чувствительность к амиодарону [14]. Этот ген является паралогом гена *LAM1* (*YSP1*) [15], делеция которого частично предотвращает гибель клеток, вызванную высокой

Штаммы, использованные в исследовании

Штамм	Генотип	Родительский штамм или источник
<i>W303-1A</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3</i>	Laboratory of A. Hyman
<i>Δlam2</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 Δlam2::TRP1</i>	[14]
<i>Δlam1Δlam2</i> <i>Δlam3Δlam4</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 Δlam3::kanMX4 Δlam2::TRP1 Δlam1::NAT Δlam4::loxP</i>	[35]
<i>UPC2-1 MATa</i>	<i>MATa UPC2-1 ura3-1 his3-11, -15 leu2-3, -112 trp1-1</i>	<i>UPC2-1 MATalpha</i>
<i>UPC2-1 Δlam2</i>	<i>MATa UPC2-1 ura3-1 his3-11, -15 leu2-3, -112 trp1-1 Δlam2::HIS3</i>	<i>UPC2-1 MATa</i>
<i>PGAL-LAM2</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 PGAL-LAM2::kanMX4</i>	<i>W303-1A</i>
<i>cmd1-6</i>		[10]
<i>BY4741</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
<i>BY4742</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
<i>Δerg2MATa</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg2::kanMX4</i>	<i>Δerg2 MATalpha</i> EUROSCARF
<i>Δerg3MATa</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg3::kanMX4</i>	<i>Δerg3 MATalpha</i> EUROSCARF
<i>Δerg4MATa</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg4::kanMX4</i>	<i>Δerg4 MATalpha</i> EUROSCARF
<i>Δerg5MATa</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg5::kanMX4</i>	<i>Δerg5 MATalpha</i> EUROSCARF
<i>Δerg6MATa</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg6::kanMX4</i>	<i>Δerg6 MATalpha</i> EUROSCARF
<i>Δerg2 Δlam2</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg2::kanMX4 Δlam2::HIS3</i>	<i>Δerg2 MATa</i>
<i>Δerg3 Δlam2</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg3::kanMX4 Δlam2::HIS3</i>	<i>Δerg3 MATa</i>
<i>Δerg4 Δlam2</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg4::kanMX4 Δlam2::HIS3</i>	<i>Δerg4 MATa</i>
<i>Δerg5 Δlam2</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg5::kanMX4 Δlam2::HIS3</i>	<i>Δerg5 MATa</i>
<i>Δerg6 Δlam2</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg6::kanMX4 Δlam2::HIS3</i>	<i>Δerg6 MATa</i>

концентрацией α -фактора [10]. Мы проверили, будет ли делеция остальных трех генов (*LAM1*, *LAM3* и *LAM4*) ингибировать РКС, вызванную феромоном. Для этого мы сравнили соотношение живых и мертвых клеток в суспензионной культуре клеток дрожжей, подверженных действию α -фактора (100 мкг/мл, 4 ч). Мы различали живые и мертвые клетки по накоплению ими пропидий йодида с помощью проточной цитофлуориметрии (рис. 1, а, б). Пропидий йодид способен проникать только в мертвые клетки, в то время как живые клетки с целостной плазматической мембраной остаются неокрашенными. Добавление α -фактора приводило к гибели

~45% клеток (рис. 1, в), а мутация в гене кальмодулина увеличивала чувствительность клеток к воздействию α -фактора (рис. 1, г), что соответствует данным литературы [23]. Мы обнаружили, что делеция гена *LAM2* частично предотвращала гибели клеток под действием α -фактора (рис. 1, д). Одновременно с оценкой сигнала от пропидий йодида мы оценивали линейные размеры клеток по светорассеянию. Как видно из рис. 1, α -фактор вызывал значительное увеличение линейного светорассеяния (FSC-A). Это увеличение размера индивидуальных клеток, по всей видимости, обусловлено образованием «шму» — половых выростов и увеличением объ-

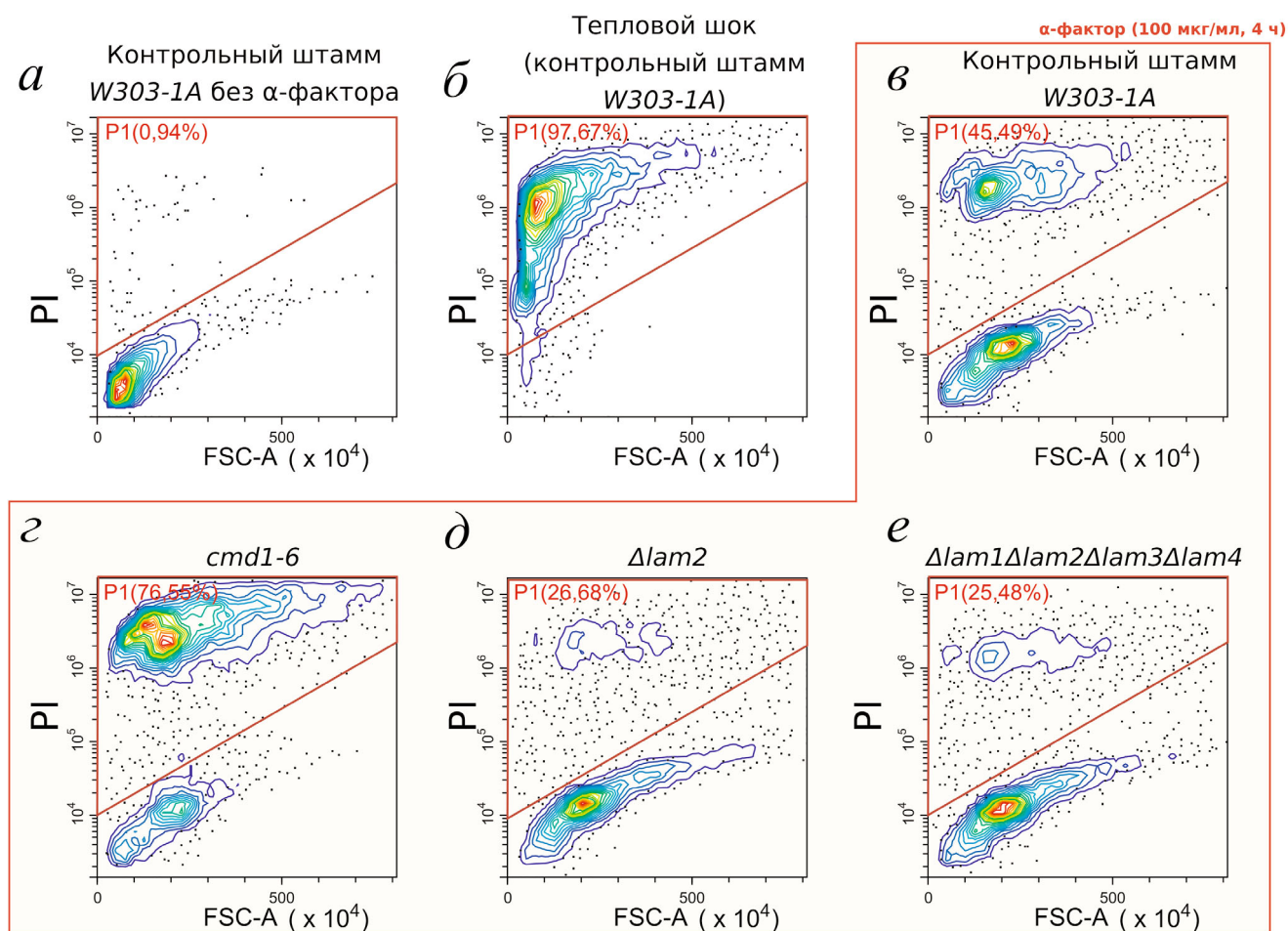


Рис. 1. Распределение линейных размеров (FSC-A) клеток и интенсивности сигнала от пропидия йодида (PI). *а* – Контрольные клетки W303-1A в отсутствие стресса (отрицательный контроль на мертвые клетки); *б* – клетки W303-1A подвергнутые действию теплового шока – 50°C, 3 ч (положительный контроль на мертвые клетки); *в–е* – клетки, подвергнутые действию α -фактора (100 мкг/мл, 4 ч) различных штаммов: родительский штамм (*в*); штамм с мутацией в гене кальмодулина *cmd1-6* (*г*); штамм с делецией гена *LAM2* (*д*); штамм с делециями всех четырех генов *LAM* (*LAM1–LAM4*) (*е*). На графиках обозначена зона (gate), событие в которой расценивались нами как мертвые клетки. Для каждого из условий указан процент мертвых клеток от общего числа клеток. Данные репрезентативных экспериментов, по 10 000 событий в каждом эксперименте.

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

ема клеток. Делеция гена *LAM2* не препятствовала увеличению линейного светорассеяния, что свидетельствует о чувствительности клеток к половому феромону.

Как видно из рис. 2, делеция *LAM2* оказывает наибольший эффект из проверенных генов *LAM* на устойчивость к α -фактору, делеция дополнительно трех генов *LAM* на фоне делеции *LAM2* не привела к увеличению выживаемости клеток в присутствии полового феромона. Аналогичный результат мы получили в случае с другим индуктором РКС дрожжей – амиодароном. Ранее мы показали, что добавление амиодарона к клеткам вызывает каскад событий, что и при добавлении избытка полового феромона [10].

Также, как и в случае с α -фактором, нарушение *LAM2* оказывало максимальный эффект, и мы не обнаружили значимой разницы в резистентности к амиодарону между штаммом *Δlam2* и штаммом *Δlam1Δlam2Δlam3Δlam4* с делецией четырех генов *LAM* (рис. 3, а).

РКС, вызванная половым феромоном, снижена в штамме UPC2-1. Штамм с частично доминантным аллелем *UPC2-1* демонстрирует повышенную скорость захвата стерина клетками [24] и активирует транскрипцию генов *ERG*, что приводит к увеличению содержания стерина в клетке и ПМ в частности [25]. Делеция генов *LAM* также приводит к увеличению концентрации эргостерина в плазматической мембране

[15, 25]. Если резистентность делеционных штаммов по генам *LAM* обусловлена изменениями концентрации эргостерина в ПМ, то аллель *UPC2-1* также должен предотвращать гибель клеток, вызванную половым феромоном. Что-

бы проверить это предположение мы исследовали гибель дрожжей штамма *UPC2-1* и дикого типа под действием α -фактора (100 мкг/мл). На рис. 4 приведена типичная контурная диаграмма, где по одной оси отложена интенсивность

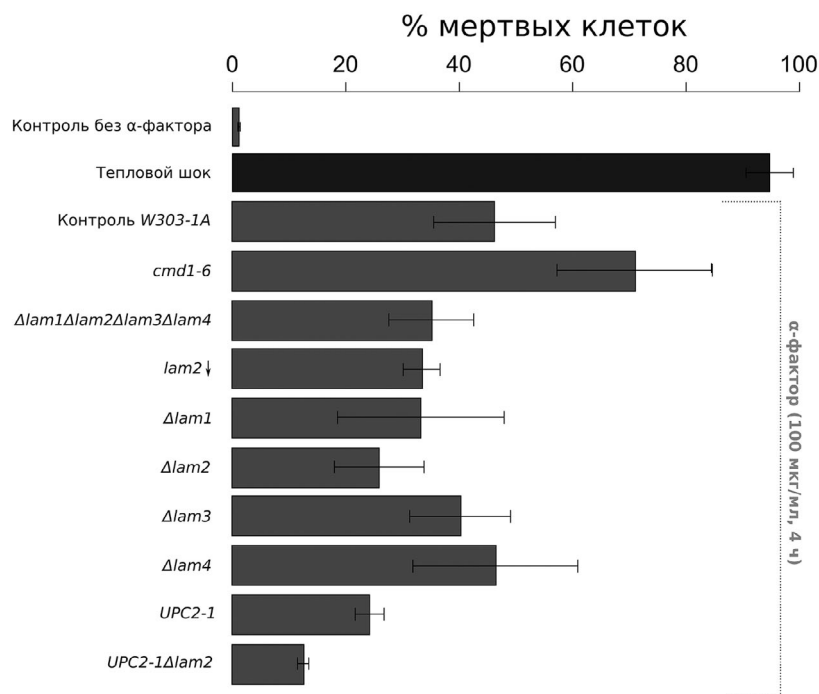


Рис. 2. РКС клеток дрожжей с нарушенным транспортом и накоплением эргостерина, вызванным добавлением α -фактора (100 мкг/мл). Соотношение мертвых и живых клеток оценивали с помощью пропидий йодида и проточной цитофлуориметрии. На столбчатых диаграммах указано среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n = 3$)

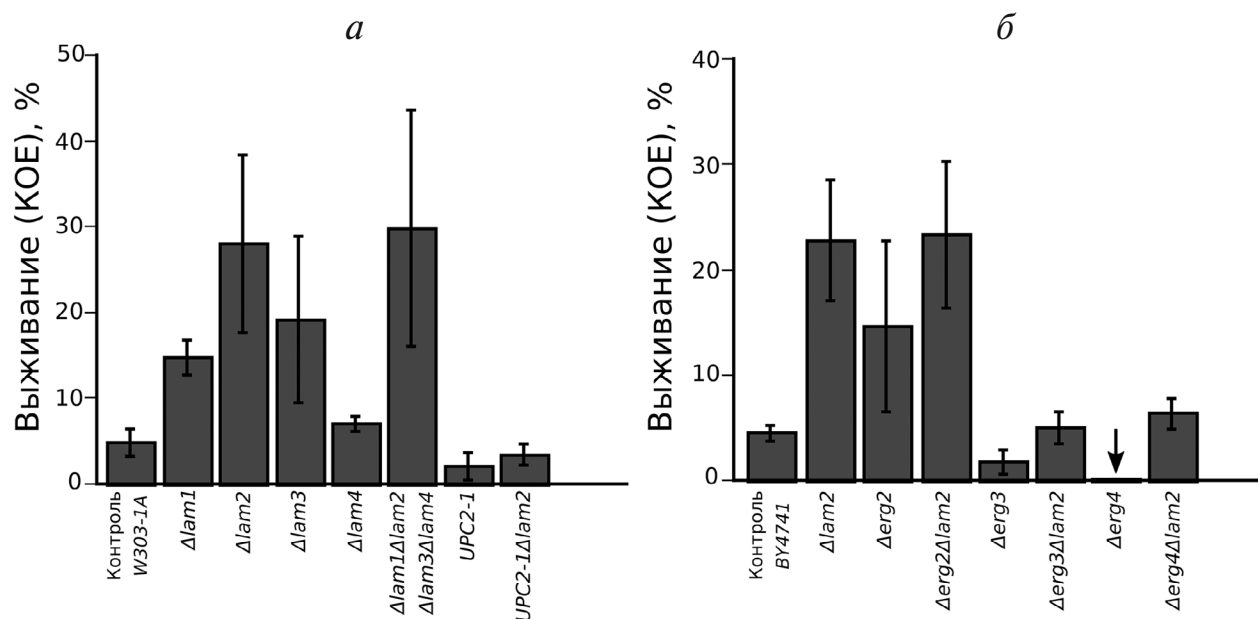


Рис. 3. Выживание клеток в присутствии индуктора РКС дрожжей амиодарона (60 мкМ, 1 ч инкубации). За 100% принимали количество клеток (КОЕ) в начальный момент времени (до добавки амиодарона)

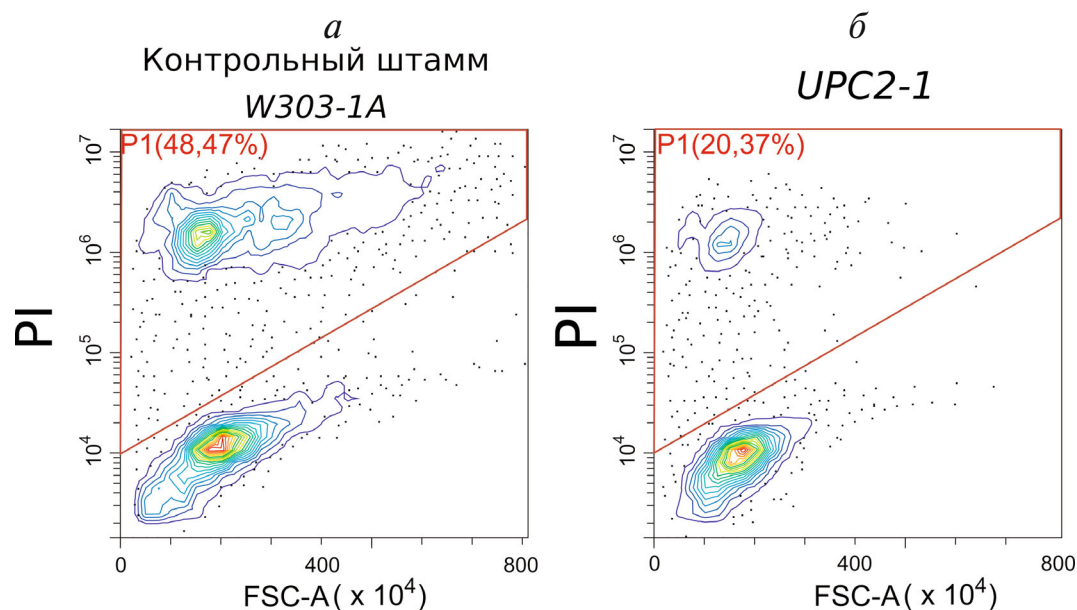


Рис. 4. Распределение линейных размеров (FSC-A) клеток и интенсивности сигнала от пропидий йодида (PI) в клетках дрожжей дикого типа (а) и мутантного штамма *UPC2-1* (б). Клетки инкубировали 4 ч в присутствии 100 мкг/мл α -фактора. Данные репрезентативных экспериментов, 10 000 событий в каждом эксперименте. С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

сигнала от пропидий йодидом, а по другой оси — линейный размер клеток, который мы оценивали по амплитуде линейного светорассеяния (FSC-A). Как видно из рисунка, мутация *UPC2-1* приводила к снижению относительного числа клеток, окрашенных пропидий йодидом,

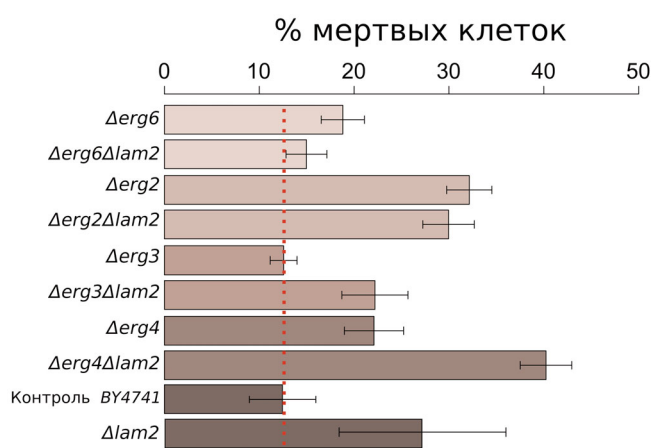


Рис. 5. РКС клеток дрожжей с мутациями по генам биосинтеза эргостерина, вызванная добавлением α -фактора (100 мкг/мл). Соотношение мертвых и живых клеток оценивали с помощью пропидий йодида и проточной цитофлуориметрии. На столбчатых диаграммах указано среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n = 3$). С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

значит эта мутация ингибирует гибель клеток, вызванную α -фактором (см. также рис. 2, где представлены усредненные данные трех экспериментов). В отношении амиодарона штамм с мутацией *UPC2-1* напротив демонстрировал повышенную чувствительность (рис. 3, а). Сравнение частоты образования зигот при скрещивании штаммов *UPC2-1 MATa* с *UPC2-1 MATalpha* (2,2%), $\Delta lam1\Delta lam2\Delta lam3\Delta lam4 MATa$ с $\Delta lam1\Delta lam2\Delta lam3\Delta lam4 MATalpha$ (1,8%) и дикого типа *BY4741 (MATa)* с *BY4742 (MATalpha)* (2,3%) не выявило различий, а значит повышенная устойчивость *UPC2-1* и $\Delta lam1\Delta lam2\Delta lam3\Delta lam4$ к α -фактору не связана со снижением ответа клеток на него.

Генетические взаимодействия *LAM2* и генов биосинтеза эргостерина. В следующей серии экспериментов мы исследовали РКС дрожжей, вызванную феромоном и амиодароном, на клетках дрожжей с делециями генов *ERG2–ERG6*. Эти гены кодируют ферменты, катализирующие терминальные этапы биосинтеза эргостерина. Нарушение биосинтеза эргостерина, как правило, летально [26], однако делеция генов, которые кодируют ферменты терминальных стадий биосинтеза от ланостерина до эргостерина, не приводит к потере клетками жизнеспособности [26]. Из нашего анализа мы исключили ген *ERG5*, так как штамм *Δerg5* с высокой частотой (до 80%) терял митохондриальную ДНК, а поте-

ря митохондриальной ДНК значительно снижает чувствительность клеток к α -фактору [9, 10]. Следует также отметить, что в этой серии опытов мы использовали другой родительский штамм (*BY4741*), тогда как эксперименты с *UPC2-1* проводили на штаммах, полученных на основе лабораторного штамма *W303*. Чувствительность этих лабораторных штаммов к феромону значительно различалась.

Мы оценили процент мертвых клеток дрожжей в штамме дикого типа и в штаммах с делецией генов: *ERG6*, *ERG2*, *ERG3* и *ERG4* (рис. 5). На рис. 5 результаты с разными делеционными мутантами по генам *ERG* приведены в последо-

вательности, соответствующей реакциям биосинтеза эргостерина ферментами, закодированными этими генами. Как видно из рисунка, делеция генов *ERG* не снижала, а иногда даже увеличивала долю мертвых клеток в присутствии α -фактора. При этом делеция *LAM2* в штаммах $\Delta erg6$ и $\Delta erg2$ не оказывала значительного эффекта на РКС, индуцированную феромоном (рис. 5). В то же время мы не наблюдали снижения РКС дрожжей от делеции в штаммах с нарушенным синтезом эргостерина. Делеция *LAM2* в штамме $\Delta erg4$ и в контрольном штамме *BY4741* приводила к существенному увеличению доли мертвых клеток в присутствии α -фактора.

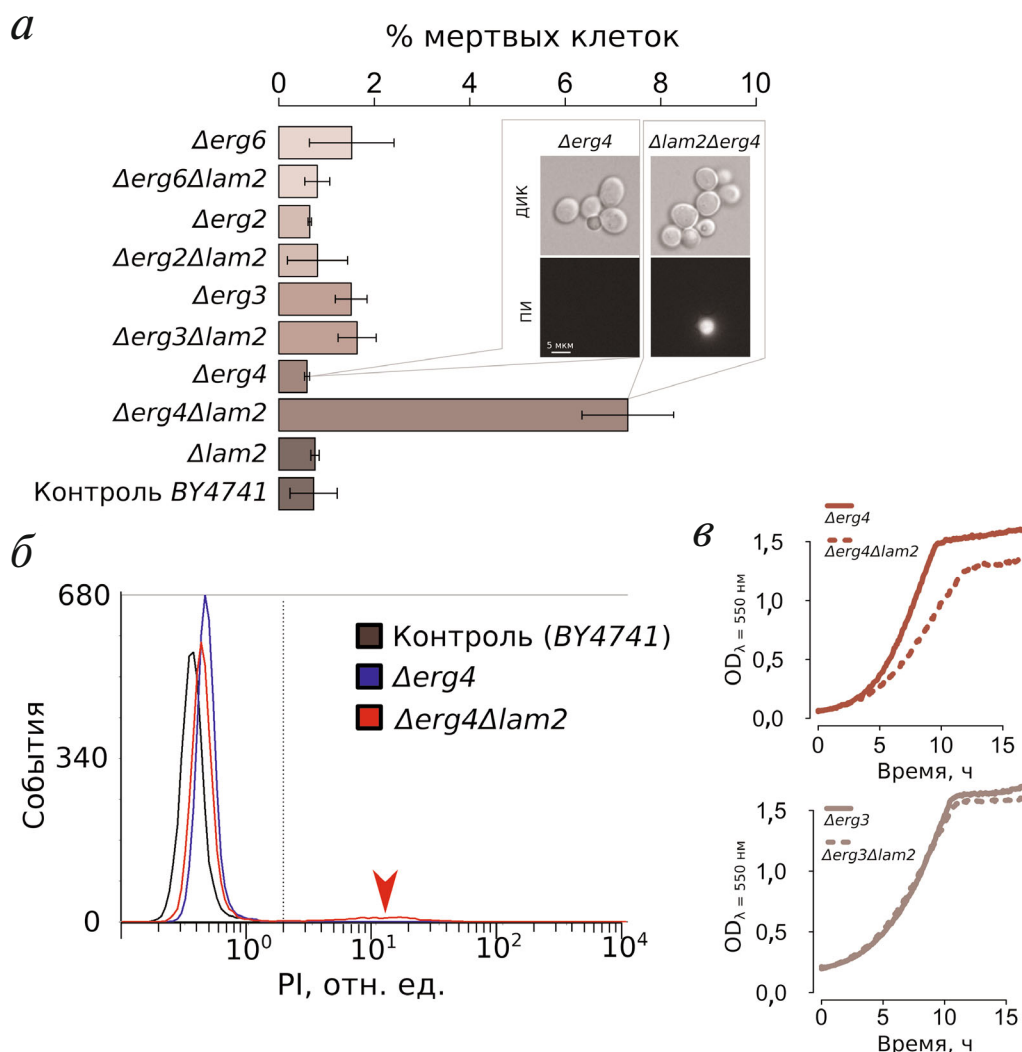


Рис. 6. Штамм $\Delta erg4\Delta lam2$ с двойной делецией содержит субпопуляцию мертвых клеток, окрашиваемых пропидий йодидом, и обладает сниженной скоростью роста. **а** – Анализ выживаемости штаммов в контрольных условиях (среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n = 3$); во вставке представлена фотография клеток штаммов $\Delta erg4\Delta lam2$ и $\Delta erg4$, окрашенных пропидий йодидом. **б** – Репрезентативная гистограмма эксперимента с проточного цитофлуориметра. **в** – Сравнение скорости роста штаммов $\Delta erg4$ и $\Delta erg4\Delta lam2$ (сверху), $\Delta erg3$ и $\Delta erg3\Delta lam2$ (снизу) по увеличению светорассеяния (длина волны $\lambda = 550$ nm).

С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

Мы обратили внимание, что в штамме *Δerg4Δlam2* с двойной делецией даже в отсутствии полового феромона количество мертвых (пропидий йодид положительных) клеток значительно увеличено по сравнению с родительским штаммом и со всеми другими исследованными нами двойными и одиночными мутантами (рис. 6, а, б). Мы показали, что делеция *LAM2* существенно снижает скорость роста штамма, в котором делетирован ген *ERG4*, в то время как при делеции гена *ERG3*, находящегося на один шаг выше по каскаду в метаболическом пути биосинтеза стерина, такого эффекта не наблюдается (рис. 6, в). Таким образом, наши данные указывают на эпистаз между геном *LAM2* и геном *ERG4*.

Исследование устойчивости к амиодарону показало, что делеция *LAM2* повышает выживаемость клеток на фоне всех испытанных мутаций (*Δerg2*, *Δerg3*, *Δerg4* и *UPC2-1*) (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование генов *LAM* в пекарских дрожжах затруднено из-за того, что они представлены паралогичными парами [20]. В связи с этим до сих пор было описано довольно мало фенотипов для штаммов, в которых нокаутированы отдельные гены *LAM*. Так, например, нами ранее было показано, что делеция *LAM2* приводит к увеличению раздробленности митохондриальной сети в клетках, находящихся в стационарной фазе роста [27]. Исключениями являются устойчивость к амиодарону, показанная нами ранее для *Δlam1* и *Δlam2* [10, 14], и устойчивость к α -фактору, которая показана для штамма *Δlam1* [10]. В этой работе мы показали, что делеция *LAM2* также демонстрирует заметное снижение чувствительности штамма *W303 S. cerevisiae* к РКС, вызванной α -фактором (рис. 1, 2). Далее, воспользовавшись этим выраженным фенотипом в качестве тест-системы для изучения генетических взаимодействий, мы исследовали РКС, вызванную феромоном в штамме *Δlam1Δlam2Δlam3Δlam4* с четверной делецией. Делеция дополнительных генов *LAM* не привела к снижению чувствительности штамма к α -фактору дополнительно к тому, что наблюдалось в штамме с одиночной делецией *Δlam2*. Полученный результат говорит о том, что другие белки Lam не проявляют функции, связанной с клеточным ответом на половой феромон, если нокаутирован ген *LAM2*. Можно предположить, что белки Lam функционируют в качестве гетеродимеров и наличие *LAM2* является необходимым фактором для их работы, однако проверка

этого предположения требует дополнительных исследований. С другой стороны, штаммы с одиночными делециями *Δlam3* и *Δlam4* не вызвали устойчивости к α -фактору (рис. 2). Учитывая данные широкомасштабных масс-спектрометрических протеомных анализов, что Lam2p содержится в клетках в больших количествах, чем другие белки Lam [28, 29], можно предположить, что отсутствие эффекта делеций *LAM3* и *LAM4* на резистентность к РКС, вызванной α -фактором, связано с разницей в концентрации этих белков в стандартных условиях. Однако в этих анализах количество Lam2p не превышало суммарного количества его трех паралогов, а в другой работе с упрощенным протоколом подготовки проб к масс-спектрометрии Lam1p даже был обнаружен в больших количествах [30]. Таким образом, мы считаем, что отсутствие эффекта от делеции генов *LAM1*, *LAM3*, *LAM4* в штамме *Δlam2* не связано с низким содержанием этих белков в клетке, а отражает их функциональную взаимосвязь. Распределение вклада делеций генов *LAM* в устойчивость к амиодарону оказалось сходным: *LAM2* вносит основной вклад, а дополнительное нарушение генов *LAM1*, *LAM3*, *LAM4* не увеличивает устойчивость.

Лабораторный штамм *BY4741* оказался значительно более резистентным к РКС, вызванной α -фактором, чем штамм *W303*. При этом делеция гена *LAM2* не уменьшала, а наоборот увеличивала долю мертвых клеток в нашей экспериментальной модели с половым феромоном (рис. 5). В то же время эффект делеции *LAM2* на резистентность к амиодарону не зависел от генетического фона, который мы использовали (рис. 4). Считается, амиодарон вызывает тот же каскад событий в клетке, что и половой феромон, но на более поздних стадиях — амиодарон стимулирует вход избытка кальция в цитоплазму клетки [10, 12]. По-видимому, это происходит из-за гиперполяризации ПМ вследствие нарушения функционирования ионных каналов [31]. Вероятно, вызванное делецией *LAM2* повышение эргостерина на ПМ влияет как на активность ионных каналов ПМ, так и на активность феромонового рецептора. При этом эффект гена *LAM2* на каскад событий, вызванный половым феромоном, сильно зависит от генетического фона. Картирование мутаций, обеспечивающих различие штаммов *BY4741* и *W303* по отношению к РКС, вызванной половым феромоном, требует дополнительных исследований. Однако на основании представленных в этой работе результатов можно заключить, что роль генов *LAM* в РКС, вызванной феромоном, не консервативна и зависит от других генетических факторов.

Мы обнаружили аддитивность между эффектами от делеций генов *LAM2* и *ERG4* (рис. 5, 6). *ERG4* кодирует С-24(28) стерин редуктазу, которая катализирует последнюю реакцию метаболического пути биосинтеза эргостерина в дрожжах [32]. При этом в штамме *Δerg3*, где отсутствует фермент, катализирующий предпоследнюю реакцию этого же пути, эффект от делеции *LAM2* был меньше в абсолютном выражении. На фоне делеций генов *ERG2* и *ERG6* изменений резистентности к феромону мы не обнаружили. Делеция генов биосинтеза эргостерина приводит к изменению стеринового состава клеточных мембран — эргостерин замещается на интермедиаты его биосинтеза [33]. Делеция *ERG6* и *ERG2* обрывает биосинтез на зимостерине и фекостерине соответственно [34], однако нам не известны работы, в которых бы определяли количественное распределение интермедиатов биосинтеза стерина в делеционных штаммах. Мы предполагаем, что отсутствие эффекта от делеции *LAM2* в штаммах *Δerg2* и *Δerg6* связано с тем, что *LAM2* не способен полностью или частично транспортировать зимостерин, фекостерин и ланостерин — ранние интермедиаты биосинтеза. В этом случае делеция гена *LAM2* никак не может повлиять на фенотип клеток. В то же время согласно предлагаемой нами модели, поздние интермедиаты биосинтеза и эргостерин транспортируются *LAM2*.

Сам факт того, что делеции *LAM* снижают смерть дрожжевых клеток от высоких концентраций полового феромона и амиодарона, известен уже более десяти лет [10, 14]. Тем не менее молекулярный механизм участия белков Lam в этих типах РКС оставался неясен. Планируя наше исследование, мы рассматривали две возможности: (1) мутации по генам *LAM* влияют на РКС опосредованно, влияя на эргостерин ПМ; (2) белки Lam непосредственно взаимодействуют с сигнальными молекулами ПМ. Наши данные указывают на первую возможность, так как все другие вмешательства в гомеостаз стерина в клетке также сильно влияли на устойчивость клеток к этим типам РКС. Вероятно, делеции генов *LAM* приводят к увеличению эргостерина в ПМ. Это следует из приведенных выше данных по чувствительности к амфотерицину В, а также из наших недавних работ по чувствительности к липофильным катионам [35] и изучению влияния генов *LAM* на устойчивость к стрессу [18].

Как повышенный эргостерин ПМ может влиять на РКС? Известно, что высокий эргостерин предотвращает перемещение Upr2 в ядро. При этом Upr2 активирует транскрипцию как

минимум двух генов MAP-киназного каскада, инициируемого также феромоном [36]. Возникает предположение, что в мутантах по *LAM* повышенный эргостерол ПМ предотвращает РКС, снижая активность Upr2. Наши данные свидетельствуют против этого предположения. Действительно, гиперактивация Upr2 (мутация *UPC2-1*) не увеличивает, а снижает феромон-зависимую РКС (рис. 1, 2). Поскольку Upr2 является основным активатором синтеза эргостерина, можно предположить, что увеличение концентрации эргостерина в ПМ влияет на ионные потоки через ПМ, и это приводит к устойчивости. Действительно, известно, что мутации по генам биосинтеза эргостерина приводят к нарушениям работы различных транспортеров ПМ [37].

Повышенная чувствительность клеток штамма *UPC2-1* к амиодарону также хорошо согласуется с данными литературы. Амиодарон вызывает увеличение концентрации кальция в цитоплазме [12], что вызывает дальнейший каскад событий, приводящий к гибели клеток [10]. При этом повышение уровня эргостерина вызывает нарушения в вакуолях [38]. Нормальное функционирование вакуолей, в свою очередь, обеспечивает устойчивость к амиодарону: вакуоли способны удалять избыточный Ca^{2+} из цитоплазмы, и это их свойство критично для устойчивости к амиодарону — токсичность амиодарона опосредована подъемом Ca^{2+} [39].

Таким образом, по нашему мнению, наиболее предпочтительным объяснением роли генов *LAM* в РКС, вызванной феромоном, является следующее: гены *LAM* влияют на процессы, протекающие внутри клетки опосредованно. Эффекты их делеций связаны с изменением содержания эргостерина в плазматической мембране, которое, в свою очередь, меняет активность мембранных белков и обусловленных ими ионных потоков между внешней средой и цитоплазмой.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00151) (рис. 1, 2, 4, 5, 6) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-01183) (рис. 3).

Благодарности. Выражаем благодарность Василине Ефимовой за участие в получении двойных *Δerg Δlam2* мутантов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nagata, S. (2018) Apoptosis and clearance of apoptotic cells, *Annu. Rev. Immunol.*, **36**, 489–517, doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053010.
- Fuchs, Y., and Steller, H. (2015) Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 329–344, doi: 10.1038/nrm3999.
- Carmona-Gutierrez, D., Bauer, M.A., Zimmermann, A., Aguilera, A., Austriaco, N., et al. (2018) Guidelines and recommendations on yeast cell death nomenclature, *Microb. Cell Fact.*, **5**, 4–31, doi: 10.15698/mic2018.01.607.
- Gordeeva, A.V., Labas, Y.A., and Zvyagilskaya, R.A. (2004) Apoptosis in unicellular organisms: mechanisms and evolution, *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 1055–1066, doi: 10.1023/b:biry.0000046879.54211.ab.
- Severin, F.F., Meer, M.V., Smirnova, E.A., Knorre, D.A., and Skulachev, V.P. (2008) Natural causes of programmed death of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 1350–1353, doi: 10.1016/j.bbamer.2008.02.001.
- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., and Madeo, F. (2010) Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines, *Cell Death Differ.*, **17**, 763–773, doi: 10.1038/cdd.2009.219.
- Sukhanova, E.I., Rogov, A.G., Severin, F.F., and Zvyagilskaya, R.A. (2012) Phenoptosis in yeasts, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 761–775, doi: 10.1134/S0006297912070097.
- Aouacheria, A., Cunningham, K.W., Hardwick, J.M., Palková, Z., Powers, T., Severin, F.F., and Váchová, L. (2018) Comment on «Sterilizing immunity in the lung relies on targeting fungal apoptosis-like programmed cell death», *Science*, **360**, doi: 10.1126/science.aar6910.
- Severin, F.F., and Hyman, A.A. (2002) Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*, *Curr. Biol.*, **12**, R233–R235, doi: 10.1016/j.cellbi.2005.10.023.
- Pozniakovsky, A.I., Knorre, D.A., Markova, O.V., Hyman, A.A., Skulachev, V.P., and Severin, F.F. (2005) Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast, *J. Cell Biol.*, **168**, 257–269, doi: 10.1083/jcb.200408145.
- Ohsumi, Y., and Anraku, Y. (1985) Specific induction of Ca^{2+} transport activity in MATa cells of *Saccharomyces cerevisiae* by a mating pheromone, alpha factor, *J. Biol. Chem.*, **260**, 10482–10486.
- Gupta, S.S., Ton, V.-K., Beaudry, V., Rulli, S., Cunningham, K., and Rao, R. (2003) Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis, *J. Biol. Chem.*, **278**, 28831–28839, doi: 10.1074/jbc.M303300200.
- Zhang, N.-N., Dudgeon, D.D., Paliwal, S., Levchenko, A., Grote, E., and Cunningham, K.W. (2006) Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones, *Mol. Biol. Cell*, **17**, 3409–3422, doi: 10.1091/mbc.e06-03-0177.
- Sokolov, S., Knorre, D., Smirnova, E., Markova, O., Pozniakovsky, A., Skulachev, V., and Severin, F. (2006) Ysp2 mediates death of yeast induced by amiodarone or intracellular acidification, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1366–1370, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.07.005.
- Gatta, A.T., Wong, L.H., Sere, Y.Y., Calderón-Noreña, D.M., Cockcroft, S., Menon, A.K., and Levine, T.P. (2015) A new family of StART domain proteins at membrane contact sites has a role in ER-PM sterol transport, *Elife*, **4**, doi: 10.7554/eLife.07253.
- Sandhu, J., Li, S., Fairall, L., Pfisterer, S.G., Gurnett, J.E., Xiao, X., Weston, T.A., Vashi, D., Ferrari, A., Orozco, J.L., Hartman, C.L., Strugatsky, D., Lee, S.D., He, C., Hong, C., Jiang, H., Bentolila, L.A., Gatta, A.T., Levine, T.P., Ferng, A., Lee, R., Ford, D.A., Young, S.G., Ikonen, E., Schwabe, J.W.R., and Tontonoz, P. (2018) Aster proteins facilitate nonvesicular plasma membrane to ER cholesterol transport in mammalian cells, *Cell*, **175**, 514–529.e20, doi: 10.1016/j.cell.2018.08.033.
- Huang, W., Zhang, Z., Han, X., Tang, J., Wang, J., Dong, S., and Wang, E. (2002) Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy, *Biophys. J.*, **83**, 3245–3255, doi: 10.1016/S0006-3495(02)75326-5.
- Sokolov, S., Vorobeva, M., Smirnova, E., Smirnova, A., Trushina, N., Galkina, K., Severin, F., and Knorre, D. (2020) LAM genes contribute to environmental stress tolerance but sensitize yeast cells to azoles, *Front. Microbiol.*, **11**, 38, doi: 10.3389/fmicb.2020.00038.
- Alli-Balogun, G.O., and Levine, T.P. (2019) Regulation of targeting determinants in interorganelle communication, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **57**, 106–114, doi: 10.1016/j.cceb.2018.12.010.
- Sokolov, S.S., Trushina, N.I., Severin, F.F., and Knorre, D.A. (2019) Ergosterol turnover in yeast: an interplay between biosynthesis and transport, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 346–357, doi: 10.1134/S0006297919040023.
- Herskowitz, I., and Jensen, R.E. (1991) Putting the HO gene to work: practical uses for mating-type switching, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, pp. 132–146, doi: 10.1016/0076-6879(91)94011-z.
- Sträuber, H., and Müller, S. (2010) Viability states of bacteria – specific mechanisms of selected probes, *Cytometry A*, **77**, 623–634, doi: 10.1002/cyto.a.20920.
- Moser, M.J., Geiser, J.R., and Davis, T.N. (1996) Ca^{2+} -calmodulin promotes survival of pheromone-induced growth arrest by activation of calcineurin and Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase, *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4824–4831, doi: 10.1128/mcb.16.9.4824.
- Crowley, J.H., Leak, F.W. Jr., Shianna, K.V., Tove, S., and Parks, L.W. (1998) A mutation in a purported regulatory gene affects control of sterol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **180**, 4177–4183.
- Joshua, I.M., and Höfken, T. (2017) From lipid homeostasis to differentiation: old and new functions of the zinc cluster proteins Ecm22, Upc2, Sut1 and Sut2, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, doi: 10.3390/ijms18040772.
- Daum, G., Lees, N.D., Bard, M., and Dickson, R. (1998) Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **14**, 1471–1510, doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1471::AID-YEA353>3.0.CO;2-Y.
- Knorre, D.A., Ojovan, S.M., Saprunova, V.B., Sokolov, S.S., Bakeeva, L.E., and Severin, F.F. (2008) Mitochondrial matrix fragmentation as a protection mechanism of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1254–1259, doi: 10.1134/s0006297908110126.
- de Godoy, L.M.F., Olsen, J.V., Cox, J., Nielsen, M.L., Hubner, N.C., Fröhlich, F., Walther, T.C., and Mann, M. (2008) Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast, *Nature*, **455**, 1251–1254, doi: 10.1038/nature07341.
- Peng, M., Taouatas, N., Cappadona, S., van Breukelen, B., Mohammed, S., Scholten, A., and Heck, A.J.R. (2012) Protease bias in absolute protein quantitation, *Nat. Methods*, **9**, 524–525, doi: 10.1038/nmeth.2031.
- Kulak, N.A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014) Minimal, encapsulated proteomic sam-

- ple processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells, *Nat. Methods*, **11**, 319–324, doi: 10.1038/nmeth.2834.
31. Maresova, L., Muend, S., Zhang, Y.-Q., Sychrova, H., and Rao, R. (2009) Membrane hyperpolarization drives cation influx and fungicidal activity of amiodarone, *J. Biol. Chem.*, **284**, 2795–2802, doi: 10.1074/jbc.M806693200.
 32. Zweytick, D., Hrastnik, C., Kohlwein, S.D., and Daum, G. (2000) Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24(28) reductase, *erg4p*, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.*, **470**, 83–87, doi: 10.1016/S0014-5793(00)01290-4.
 33. Liu, G., Chen, Y., Færgeman, N.J., and Nielsen, J. (2017) Elimination of the last reactions in ergosterol biosynthesis alters the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple stresses, *FEMS Yeast Res.*, **17**, doi: 10.1093/femsyr/fox063.
 34. Parks, L.W., and Casey, W.M. (1995) Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast, *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**, 95–116, doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.000523.
 35. Jiménez-Munguía, I., Volynsky, P.E., Batishchev, O.V., Akimov, S.A., Korshunova, G.A., Smirnova, E.A., Knorre, D.A., Sokolov, S.S., and Severin, F.F. (2019) Effects of sterols on the interaction of SDS, benzalkoniumchloride, and anovel compound, Kor105, with membranes, *Biomolecules*, **9**, doi: 10.3390/biom9100627.
 36. Höfken, T. (2017) Ecm22 and Upc2 regulate yeast mating through control of expression of the mating genes PRM1 and PRM4, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **493**, 1485–1490, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.005.
 37. Kodedová, M., and Sychrová, H. (2015) Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS One*, **10**, e0139306, doi: 10.1371/journal.pone.0139306.
 38. Hongay, C., Jia, N., Bard, M., and Winston, F. (2002) Mot3 is a transcriptional repressor of ergosterol biosynthetic genes and is required for normal vacuolar function in *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.*, **21**, 4114–4124, doi: 10.1093/emboj/cdf415.
 39. Zhang, Y.-Q., Gamarra, S., Garcia-Effron, G., Park, S., Perlin, D.S., and Rao, R. (2010) Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs, *PLoS Pathog.*, **6**, e1000939, doi: 10.1371/journal.ppat.1000939.

THE ROLE OF *LAM* GENES IN SEX PHEROMONE-INDUCED *S. cerevisiae* YEAST CELL DEATH*

S. S. Sokolov^{1**}, K. V. Galkina¹, E. A. Litvinova², D. A. Knorre^{1,3}, and F. F. Severin¹

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: sviatoslav.sokolov@gmail.com

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

³ Sechenov First Moscow State Medical University Ministry of Health of the Russian Federation, 119992 Moscow, Russia

Received November 3, 2019

Revised January 21, 2020

Accepted January 21, 2020

Lam1–Lam4 proteins shuttle sterols between plasma membrane and endoplasmic reticulum. Disruption of their function presumably increases plasma membrane sterol content. While in mammals the homologs of Lam proteins are responsible for the internalization of cholesterol from blood plasma, the biological role of Lam proteins in yeast remains unclear, since the deletions of individual *LAM* genes do not produce pronounced phenotypes. However, the deletion of *LAM1* (*YSP1*) interferes with regulated cell death (RCD) of *Saccharomyces cerevisiae* yeast caused by sex pheromone. Here we studied the role of *LAM2* deletion in pheromone-induced RCD and the genetic interactions between *LAM2* and the genes of ergosterol biosynthesis. The deletion of *LAM2* gene partially prevented the pheromone-induced cell death in the *W303* laboratory yeast strain. Additional deletions of *LAM1*, *LAM3*, and *LAM4* did not increase the effect of *LAM2* deletion. A mutation in the Upc2 transcription factor gene (*UPC2-1*), leading to increased accumulation of sterols in cells, also inhibited pheromone-induced RCD, the effect being additive with the effect of *LAM2* deletion. On the contrary, *LAM2* deletion in another yeast laboratory strain, *BY4741*, stimulated pheromone-induced RCD. Next, the deletions of ergosterol biosynthesis genes *ERG2* and *ERG6* decreased the effect of the *LAM2* deletion. Interestingly, in *Δerg4* strain (with deletion of the gene encoding Erg4 protein catalyzing the terminal stage of ergosterol biosynthesis), the deletion of *LAM2* significantly increased the proportion of dead cells and reduced the growth rate of cells in suspension even in the absence of pheromone. Possibly, the lack of the *LAM2* deletion phenotype in *Δerg6* and *Δerg2* strains indicates the inability of Lam2 protein to transport upstream ergosterol biosynthesis intermediates, such as lanosterol. Together, our data suggest that the role of Lam proteins in pheromone-induced yeast RCD is mediated by their effect on the sterol composition of plasma membrane.

Keywords: *LAM* genes, yeast, regulated cell death, pheromone, sterols

УДК 578.32; 578.865; 539.26

ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРИОНОВ И РЕПОЛИМЕРОВ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ В РАСТВОРЕ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ*

© 2020 А.Л. Ксенофонтов^{1**}, М.В. Петухов^{2,3},
А.Н. Прусов¹, Н.В. Федорова¹, Э.В. Штыкова²

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

² Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН,
119333 Москва, Россия; электронная почта: shtykova@ns.crys.ras.ru

³ Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
119071 Москва, Россия; электронная почта: maxim@embl-hamburg.de

Поступила в редакцию 07.11.2019

После доработки 20.12.2019

Принята к публикации 22.12.2019

Структурный анализ вирионов и реполимеров белка оболочки вируса табачной мозаики (ВТМ) в водно-солевом растворе был проведен по данным синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с негативным контрастом. Частицы реполимеров белка оболочки обладают уникальной стабильностью и не имеют спиральной симметрии. По данным ПЭМ, такие частицы содержат гетерогенные по длине поперечно исчерченные палочковидные «стопки дисков» длиной 300–800 Å. Структурное моделирование этих частиц было выполнено с использованием элемента кристаллографической модели четырехслойного агрегата (PDB: 1EI7). Получившиеся модели «стопки дисков» представляли собой полые цилиндры, и мы сравнили их расчетное рассеяние с экспериментальным на всем измеряемом диапазоне. Показана лучшая корреляция данных МУРР с моделью из повторяющейся центральной пары дисков. Кривые МУРР практически совпадали для образцов «стопки дисков» ВТМ независимо от метода выделения белка. Положения максимумов интенсивности на кривых рассеяния могут быть использованы в качестве специфической характеристики образцов, некоторые из них соотнесены с реальными элементами четвертичной структуры частиц (периодичность структуры реполимера, шаг спирали вириона). Впервые структурные данные низкого разрешения реполимеров ВТМ были получены в растворе в условиях, близких к естественным. Анализ подобных наноразмерных объектов важен для их возможного биомедицинского и биотехнологического применения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ВТМ, белок оболочки, реполимеры, вирионы, малоугловое рентгеновское рассеяние.

DOI: 10.31857/S0320972520030069

Вирус табачной мозаики (ВТМ) является хорошо охарактеризованным растительным вирусом, состоящим из 2130 идентичных субъединиц белка оболочки, расположенных спирально вокруг одноцепочечной РНК [1]. ВТМ широко изучался с использованием методов кристаллографии и электронной микроскопии. Из-за стабильности и доступности ВТМ в электронной микроскопии в качестве эталона

длины используется его диаметр, а также длина шага спирали 22,92 Å, которые измерены очень точно методом рентгеновской дифракции ориентированных волокон [2]. Субъединицы белка оболочки образуют полый цилиндр длиной 3000 Å и диаметром 180 Å. Особенностью выделенного белка оболочки ВТМ является его способность образовывать в растворе большое число упорядоченных агрегатов с различной структурой. В зависимости от pH, ионной силы, температуры и концентрации белок ВТМ находится в двух основных состояниях: дисковом и спиральном [3]. К числу агрегатов дискового типа относятся двухслойные 20S-диски с коэффициентом седиментации 20S и агрегаты дисков, уложенных попарно в «стопки дисков», которые образуются при выдерживании препара-

Принятые сокращения: ВТМ – вирус табачной мозаики, МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние, ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-321, 03.02.2020.

** Адресат для корреспонденции.

та в растворе с рН 7–9. К спиральному типу относятся прежде всего сами вирионы ВТМ и идентичный им спиральный реполимеризованный белок при $\text{pH} \leq 6,0$, а также двухвитковые фрагменты спирали [3]. Двухслойная структура 20S-диска определена кристаллографическим анализом с разрешением $2,8 \text{ \AA}$ [4]. 20S-Диски состоят из 34 белковых субъединиц (17 субъединиц на слой). Два слоя диска соединены на его периферии на больших радиусах и не соприкасаются на малых [4], образуя щель около сайта связывания РНК. Именно эти данные рентгеноструктурного анализа послужили основанием для построения модели самосборки ВТМ *in vitro* «изнутри» [5, 6], в соответствии с которой сборка инициируется связыванием диска 20S со специфическим участком РНК со стороны центрального канала, при этом происходит трансформация цилиндрического диска до спиральной структуры [6].

Необычные рентгенограммы, полученные Франклин в 1955 г. [7] для полимеризованного белка оболочки ВТМ, выделенного из инфицированных растений, дали первое указание на образование полимера из дисков, уложенных попарно в «стопки дисков» («stacked discs»). Долгое время предполагалось наличие равновесия и возможность трансформации между «стопками дисков» и спиральными агрегатами, и это подразумевало, что «стопки дисков», подобно спирали вируса, должны быть полярной структурой, в которой все субъединицы ориентированы в одном направлении [8]. Доказательство биполярности «стопок дисков» было получено с помощью моноклональных антител, которые связывались лишь с одним концом вириона ВТМ, однако эти антитела реагировали с обоими концами реполимера [9]. Дальнейшее изучение их структуры методом криоэлектронной микроскопии с разрешением $9\text{--}12 \text{ \AA}$ [10, 11] показало, что большая часть двухслойных дисков имеет четвертичную структуру, аналогичную центральной паре колец закристаллизованного четырехслойного дискового агрегата [12].

В настоящей работе с помощью синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) впервые охарактеризована структура в растворе и выполнено моделирование вирионов и реполимеров белка оболочки ВТМ, сформированных в «стопки дисков». Мы представили набор моделей, которые были построены с использованием атомарных координат четырехслойного агрегата [12], и сравнили их расчетное рассеяние с экспериментальным, полученным с помощью метода МУРР.

Реполимеры «стопки дисков» ВТМ являются интригующим объектом из-за их амилоидопо-

добной степени стабильности: после того как молекулы белка собраны в такую структуру, для ее разборки требуются денатурирующие условия [13, 14]. Подобные наноразмерные объекты — нановолокна и наностержни — могут найти широкое применение в нанoeлектронике и различных биомедицинских приложениях. Ранее нами с помощью МУРР были охарактеризованы другие вирусоподобные частицы — ассоциаты белка оболочки спирального потивируса А вируса картофеля — и изучена их диссоциация [15, 16].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение белка оболочки и реполимеров ВТМ. Препарат ВТМ (штамм U1) был любезно предоставлен В.В. Макаровым. Образцы реполимеров ВТМ получали двумя методами: 1) белок ВТМ, выделенный литиевым методом [17], диализовали в 10 мМ Tris-HCl-буфер (рН 8,0) с 0,1 М NaCl; 2) белок ВТМ, полученный ацетатным методом [18], диализовали в 10 мМ фосфатный буфер (рН 8,0) с 0,1 М NaCl. В обоих случаях диализ проводили в течение суток при $+8^\circ\text{C}$, далее препараты белка (1,5–5 мг/мл) выдерживали 5–7 суток при $+8^\circ\text{C}$ для формирования «стопок дисков» и центрифугировали 10 мин при 14 000 об/мин (Benchtop Microfuge 22R; «Beckman Coulter», США). Выход белка ВТМ составлял 50–70% от расчетного.

Определение концентрации препаратов реполимеров и вируса ВТМ. Концентрацию препаратов определяли с помощью спектрофотометра UV-2600 («Hitachi», Япония), используя спектры поглощения в УФ-диапазоне 240–340 нм. В связи с большим вкладом рассеяния в поглощение реполимера (40–50%) вычисляли истинные спектры поглощения (Е) суспензий частиц методом экстраполяции [19], применяя для экстраполяции область 320–338 нм. Коэффициенты поглощения препаратов белка и вируса принимали равными $E_{280}^{0,1\%} = 1,3$ и $E_{260}^{0,1\%} = 2,3$ соответственно. Контроль чистоты образцов осуществляли с помощью электрофореза по методу Лэммли [20], используя 15%-ный ПААГ, в камере Mini-PROTEAN 3 Cell («Bio-Rad», США). Гели окрашивали 0,22%-ным Кумасси G-250 («Serva», Германия).

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Препараты помещали на сетки с углеродным покрытием. Образцы инкубировали 1 мин при 20°C , промывали дистиллированной водой в течение 30 с, контрастировали 2%-ным уранилацетатом в течение 10–30 с, снова промывали дистиллированной водой и высушивали. Образцы исследовали в просвечивающем

электронном микроскопе JEM-1400 («JEOL», Япония) при увеличении в 60 000 раз.

Эксперимент и анализ данных МУРР. Исследование структуры образцов ВТМ и их реполимеров с помощью малоуглового рассеяния синхротронного излучения проводили на синхротроне PetraIII (DESY, Гамбург) на линии P12. Линия P12 оснащена оборудованием для автоматической смены образцов и двумерным детектором Pilatus 2M («DECTRIS», Швейцария). Интенсивность рассеяния $I(s)$ измеряли в области значений волновых векторов $0,003 < s < 0,5 \text{ \AA}^{-1}$, где $s = (4\pi \sin \theta) / \lambda \leq 2\pi/d$ – модуль вектора рассеяния; 2θ – угол рассеяния; $\lambda = 1,24 \text{ \AA}$ – длина волны [21]; d – размер рассеивающих неоднородностей, период структуры. Измерения проводили при температуре 10°C , за 1 с регистрировали 20 отдельных кривых рассеяния для каждого образца с целью отслеживания возможного радиационного повреждения. Первичную обработку данных проводили с помощью программы PRIMUS [22]. Чтобы учесть концентрационную зависимость, анализировали препарат вируса и белка при нескольких различных концентрациях в диапазоне 2,0–7,0 мг/мл. Программу MASSHA [23] использовали для моделирования структур вириона и реполимера, программу CRY SOL [24] – для расчета кривых рассеяния моделей атомного разрешения и определения их радиусов инерции (R_g).

Размеры в кристаллографической модели (PDB: 1EI7) четырехслойного дискового агрегата измеряли с помощью инструментов программы RasMol (<http://www.rasmol.org/>). Для сравнения модельных структур реполимера с реальной структурой в растворе использовали усредненную величину относительных отклонений ($\bar{O}$)

максимумов интенсивности вектора рассеяния s_m^i модели от экспериментальных величин s_{exp}^i :

$$\bar{O} = 1/n \times \sum (|s_m^i - s_{\text{exp}}^i| / s_{\text{exp}}^i).$$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электронно-микроскопический анализ препаратов. Белок оболочки, выделенный из ВТМ, способен легко самоассоциироваться в определенных условиях в 20S-диски, которые при дальнейшей инкубации трансформируются в стабильные реполимеры, так называемые «стопки дисков» [13, 14, 25]. На первом этапе мы изучили структуру и длину образованных частиц с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Результаты ПЭМ с негативным контрастом показали, что полученные разными методами препараты реполимеров содержали гетерогенные по длине поперечно исчерченные палочковидные частицы (рис. 1, а, б). Распределение частиц по размерам (рис. 1, б) показывает, что основная объемная доля в препарате приходится на частицы длиной 300–800 Å (~70% от всех частиц). На рис. 1 видно, что фрагмент длиной 400 Å содержит ~15–16 колец «стопки» ($15,5 \pm 0,5$), что соответствует ранее полученным данным ПЭМ [8, 9, 14] (рис. 1, врезка), и осевая периодичность структуры реполимера составляет ($26,0 \pm 0,9$) Å. Таким образом, сформированные «стопки дисков» содержали 6–16 20S-дисков. Кроме того, в образце можно видеть также кластеры латерально связанных реполимеров.

В следующей части работы с помощью синхротронного МУРР мы охарактеризовали структуру в растворе и выполнили моделирование вирионов и реполимеров белка оболочки ВТМ.

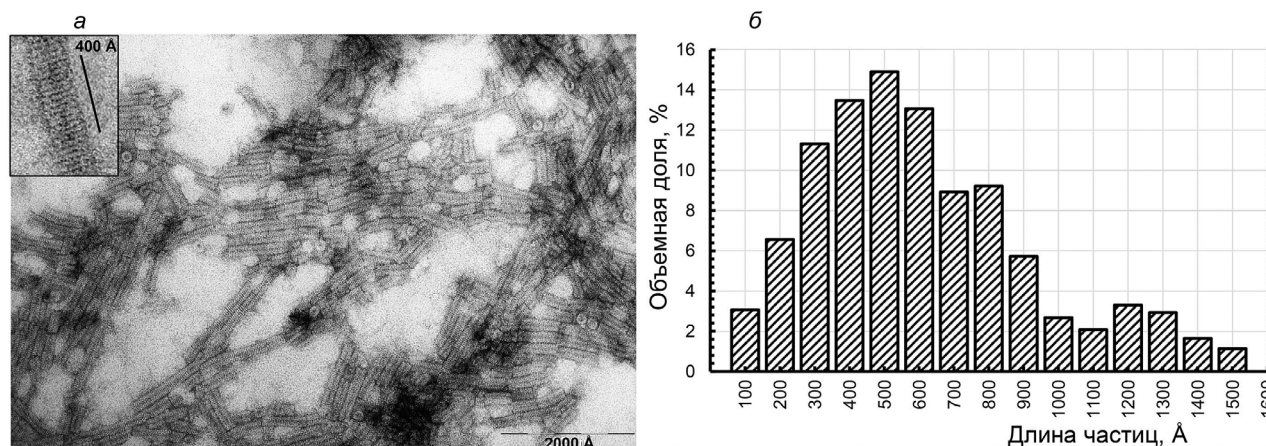


Рис. 1. Электронно-микроскопический анализ препаратов реполимеров ВТМ (а) и распределение по размерам частиц (б). Измерена длина ~250 частиц. Препараты получали из белка ВТМ, выделенного литиевым методом [17]. ПЭМ (JEM-1011, «JEOL», Япония), контрастирование 2%-ным уранилацетатом. Увеличение $\times 60\,000$ (а) и $\times 150\,000$ (врезка)

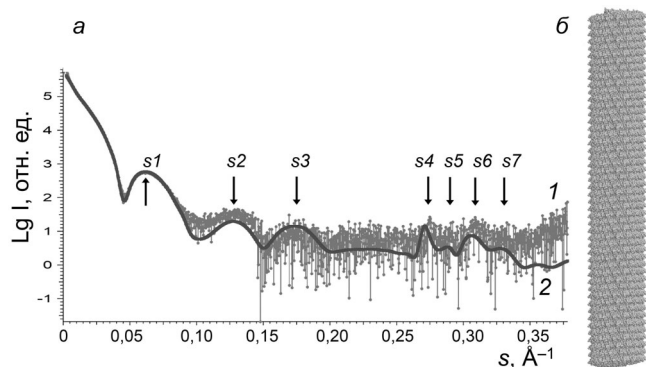


Рис. 2. Экспериментальные и модельные кривые МУРР (а), модельная структура вириона ВТМ (б); 1 – экспериментальные данные, приведенные к нулевой концентрации; 2 – рассеяние, рассчитанное с помощью программы CRY SOL, модельной структуры вириона, смоделированной с помощью программы MASSHA

Структурное моделирование вирионов ВТМ в растворе. Были получены профили рассеяния от образцов вирионов ВТМ с концентрацией 3–6 мг/мл. В качестве структурного элемента для моделирования вириона была выбрана структура PDB: 2OM3 с разрешением 4,4 $\text{\AA}$, полученная методом криоэлектронной микроскопии и содержащая фрагмент со спиральной симметрией из трех витков [26]. Затем этот фрагмент был воспроизведен 16 раз вдоль винтовой оси для построения модели вириона (длина ~ 1200 $\text{\AA}$, 784 субъединицы). Рассчитанная кривая рассеяния модели вириона с использованием программы CRY SOL [24] (рис. 2, кривая 2) коррелирует с экспериментальными данными по всем пикам и минимумам кривой рассеяния на интервале вектора рассеяния $0,03 < s < 0,35$ (рис. 2, кривая 1).

Для более точного сравнения в табл. 1 сопоставили величины вектора рассеяния s и размера рассеивающих неоднородностей d для всех семи пиков ($s1$ – $s7$) экспериментальной и модельной кривых. Анализ табл. 1 показывает, что некоторые максимумы интенсивности вектора рассеяния s хорошо соответствуют известным размерам в вирионе, например, $d4$ (линейный размер 22,9 $\text{\AA}$) равен длине шага спирали 22,9 $\text{\AA}$,

измеренной методом рентгеновской дифракции ориентированных волокон [2].

Структурное моделирование реполимеров белка ВТМ в растворе. По данным ПЭМ, препараты реполимеров белка ВТМ содержали смесь гетерогенных по длине частиц с повторяющимися элементами структуры. Профили рассеяния от препаратов «стопок дисков» из белка ВТМ, выделенного разными методами [17, 18], практически совпадали (отклонение $< 0,2\%$ максимумов векторов рассеяния $s1$ – $s6$) на всем интервале измерения (рис. 3, врезка), и в дальнейшем мы приводим данные МУРР для реполимеров белка, полученного литиевым методом.

В качестве структурного элемента для построения модели вначале была выбрана кристаллографическая структура PDB: 1EI7, состоящая из двух сложенных парных колец БА по 17 субъединиц белка в каждом [12]. Нижнее и верхнее кольцо обозначали символом Б, а центральные кольца – символом А. Структурный элемент БААБ был размножен посредством пространственной трансформации. Профиль интенсивности рассеяния структуры (БААБ) $_8$ значительно отличался от профиля, полученного в эксперименте (рис. 3, а, б; табл. 2).

В дальнейшем для моделирования реполимеров ВТМ использовали две другие модели на основе пары колец кристаллографической модели (PDB: 1EI7): 1) нижняя пара колец (БА; рис. 3, з) или 2) центральная пара (АА; рис. 3, е). Эти элементы были размножены посредством пространственной трансформации с поворотом каждого элемента на $6,35^\circ$ в соответствии с данными структуры PDB: 1EI7. В результате были получены модели структур «стопок дисков» в виде полых цилиндров, содержащих по 16 двухслойных дисков. Данные модели содержали 544 субъединицы и имели размер длинной оси ~ 820 $\text{\AA}$. Обе модели – (БА) $_{16}$ и (АА) $_{16}$ – имели неплохую корреляцию между экспериментальными данными $I_{\text{exp}}(s)$ и теоретическими кривыми рассеяния, рассчитанными для этих моделей. Положения максимумов интенсивности на кривых рассеяния ($s1$ – $s6$) могут быть использо-

Таблица 1. Сравнение характеристик рассеяния вирионов ВТМ в растворе с рассеянием от модели вириона

Вирион ВТМ*	$s1$	$d1$	$s2$	$d2$	$s3$	$d3$	$s4$	$d4$	$s5$	$d5$	$s6$	$d6$	$s7$	$d7$
Эксперимент	0,062	101	0,129	48,7	0,175	36,0	0,274	22,9	0,290	21,6	0,309	20,4	0,330	19,0
Модель	0,062	101	0,129	48,7	0,175	36,0	0,271	23,2	0,288	21,9	0,306	20,6	0,330	19,0
Costa, 2016**	0,062	101	0,130	48,7	0,175	35,9	0,275	23,2	0,294	21,8	0,311	20,5	0,336	19,0

* Использовали модель PDB: 2OM3; s ($\text{\AA}^{-1}$) – модуль вектора рассеяния; $d = 2\pi/s$ ($\text{\AA}$) – период структуры, размер рассеивающих неоднородностей.

** Экспериментальные данные, приведенные в статье Costa et al. [29].

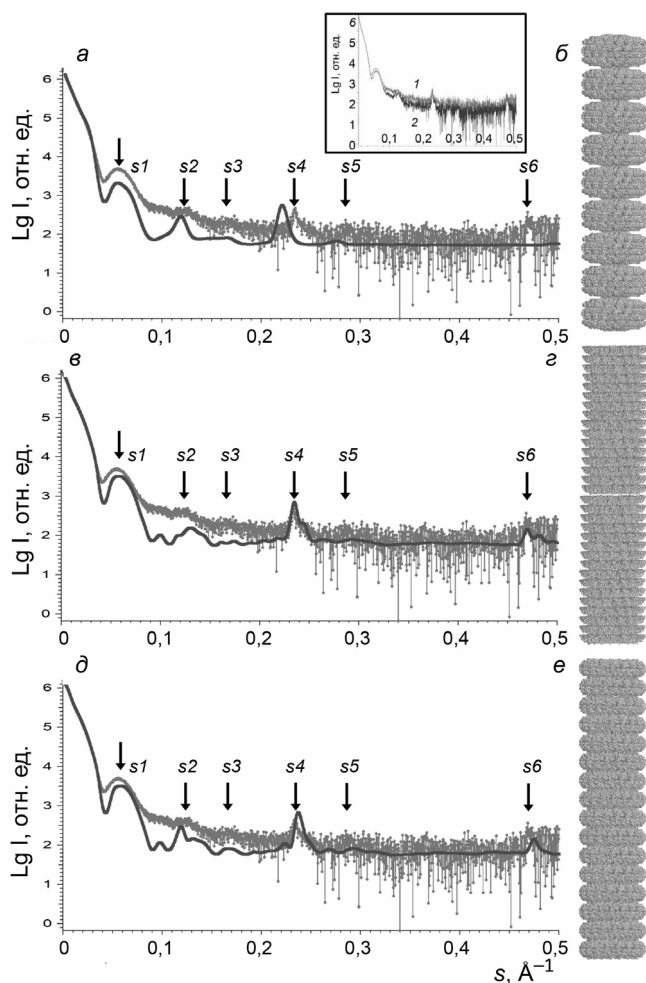


Рис. 3. Малоугловое рентгеновское рассеяние реполимеров BTM в виде «стопок дисков»; *a, б, д* — экспериментальные и рассчитанные данные МУРР от модельных структур (*б, з, е*). Рассеяние рассчитывали с помощью программы CRY SOL. Модели структур — (БААБ)₈ (*б*), (БА)₁₆ (*з*) и (АА)₁₆ (*е*) — были получены в программе MASSHA. Экспериментальные данные показаны точками, рассеяние моделей — сплошными линиями. Стрелки указывают на максимумы интенсивности векторов рассеяния. Врезка — кривые МУРР для препаратов реполимера из белка оболочки, полученного литиевым (кривая 1) или ацетатным (кривая 2) методом

ваны в качестве специфической характеристики образцов. Для количественной оценки сходства моделей реполимеров с реальной структурой в растворе использовали усредненную величину относительных отклонений максимумов интенсивности вектора рассеяния s_m^i модели от экспериментальных величин: $\bar{O} = 1/n \times \sum (|s_m^i - s_{\text{exp}}^i| / s_{\text{exp}}^i)$. Наименьшая величина $\bar{O}$ оказалась у модели (АА)₁₆ ($\bar{O} = 0,02 \pm 0,01$), что указывало на наилучшее сходство с реальной структурой в растворе в сравнении с другими моделями — (БА)₁₆ ($\bar{O} = 0,03 \pm 0,01$) или (БААБ)₈ ($\bar{O} = 0,04 \pm 0,01$). Однако ни одна из модельных кривых

полностью не совпала с экспериментальной кривой.

Влияние длины модельных реполимеров на расчетные кривые МУРР. Чтобы оценить влияние длины реполимера на кривые рассеяния, мы рассчитали с помощью программы CRY SOL [24] характеристики ряда смоделированных структур: А, (АА)₁, (АА)₂, (АА)₄, (АА)₈, (АА)₁₆ кристаллической модели PDB: 1E17 [12], где А — одно кольцо из 17 субъединиц белка (рис. 4).

На кривых рассеяния моделей кольца А и диска (АА)₁ полностью отсутствуют брэгговские максимумы (рис. 4, кривые 1 и 2), тогда как в моделях реполимера (АА)₂ и (АА)₄ интенсивность рассеяния возрастает в положениях угловых векторов *s1, s4* и *s5* (кривые 3, 4). В моделях реполимера (АА)₈ и (АА)₁₆ интенсивность рассеяния значительно увеличивается в положениях угловых векторов *s2, s4* и *s6* (кривые 5, 6), которые соответствуют рассеивающим размерам в препарате реполимера: $d2 = 51 \text{ \AA}$, $d4 = 26,9 \text{ \AA}$ и $d6 = 13,4 \text{ \AA}$ (табл. 2). Размер $d4$ близок к определенной нами методом ПЭМ величине осевой периодичности колец реполимера ($26,0 \pm 0,9 \text{ \AA}$). Удвоенная величина ($52 \text{ \AA}$) соответствует периодичности дисков в реполимерах и близка к рассеивающему размеру $d2$. Определенная методом рентгеновской дифракции ориентированных волокон Франклин и Коммонером [7], эта величина составляла $53 \text{ \AA}$. В табл. 3 приведены расчетные инварианты (молекулярные массы M_r и радиусы инерции R_g) для этих моделей и препарата реполимера. Величины R_g для моделей от 1 до 32 колец в реполимере находились в диапазоне $64,2\text{--}253,4 \text{ \AA}$. Инварианты для модели (АА)₁₆ оказались близки к значениям препарата реполимера в растворе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Современные методы интерпретации данных синхротронного МУРР вместе с комплементарным методом электронной микроскопии позволили нам в данной работе провести детальный структурный анализ образцов реполимеров белка оболочки BTM в форме «стопок дисков». По данным МУРР можно определять в многокомпонентном растворе молекулярную архитектуру белков [27] и белков с гибкими неструктурированными фрагментами [28]. Новые подходы к анализу данных МУРР позволяют получать информацию о четвертичной структуре биологических объектов. Метод способен визуализировать структуру исследуемых объектов в широком диапазоне размеров в зависимости от энергии рентгеновского излучения и анализируемого углового диапазона, который соответствует

Таблица 2. Сравнение характеристик рассеяния реполимеров ВТМ в растворе с рассеянием от моделей

Препарат	$s1$	$d1$	$s2$	$d2$	$s3$	$d3$	$s4$	$d4$	$s5$	$d5$	$s6$	$d6$
	0,054	114	0,124	51,0	0,168	37,4	0,234	26,9	0,287	21,90	0,47	13,4
Модель (БААБ) ₈ *	0,057	110	0,119	53,0	0,168	37,4	0,221	28,5	0,278	22,60	—	—
Модель (БА) ₁₆	0,058	108	0,130	48,0	0,177	35,6	0,236	26,7	0,290	21,60	0,47	13,4
Модель (АА) ₁₆	0,058	109	0,119	52,7	0,168	37,4	0,237	26,5	0,290	21,60	0,48	13,2

* Использовали кристаллографическую структуру PDB: 1E17; величины s (Å⁻¹) и d (Å) — как в табл. 1. Препарат реполимера был получен литиевым методом.

определяемому размеру частиц ~10–2100 Å. Поскольку длинная ось вириона ВТМ составляет ~3000 Å, его длина не может быть измерена непосредственно при данном угловом диапазоне ($0,003 < s < 0,5$ Å⁻¹). Экспериментальные и рассчитанные кривые после $s = 0,35$ Å⁻¹ расходятся (рис. 2), что может быть связано с низкой точностью определения МУРР размеров менее 15 Å или некоторым различием структур трехвиткового фрагмента (PDB: 2OM3) и аналогичного элемента вириона в растворе. Недавно в работе Costa et al. [29] методом МУРР был измерен препарат вирионов ВТМ на малоугловой линии BM29 (ESRF, Гренобль, $\lambda = 0,99$ Å) и получена кривая рассеяния вириона при концентрации вируса в 4 раза выше используемой нами (26 мг/мл). Из табл. 1 видно, что величины s и d хорошо совпадают с данными нашей работы (относительное отклонение не превышает 1,5%). Приближение геометрических моделей было выполнено авторами с использованием программы Genfit [30]. С помощью трехцилиндровой модели вириона им удалось воспроизвести лишь первые два максимума пиков $s1$ и $s2$ из семи на экспериментальной кривой рассеяния.

Ранее в работе Hiragi et al. [31] методом МУРР изучали препарат агрегатов белка ВТМ, сформированных в растворе с pH 7,2, ионной силе 0,1–0,2 М при температуре 15–25 °С на малоугловой линии («Photon Factory», Япония; $\lambda = 1,49$ Å). Приближение было выполнено авторами с использованием цилиндрической модели 20S-диска с наружным и внутренним диаметрами 180 и 40 Å соответственно, с двумя слоями толщиной 23 Å, с радиусом инерции R_g , равным 66,5 Å. Препарат оказался в значительной степени полидисперсным, содержащим в основном двух-, четырехслойные агрегаты и небольшое количество более длинных агрегатов. Радиус инерции образца увеличивался с ростом ионной силы, температуры и концентрации и достигал 85,6 Å в 100 мМ фосфатном буфере при 25 °С и 12 мг/мл, что близко к нашей модели реполимера (АА)₄ с R_g , равным 88,7 Å (табл. 3).

В последующей работе данной лаборатории с помощью МУРР сравнивали кинетику реконструкции из белка и РНК вирионов ВТМ и вируса зеленой крапчатой мозаики огурца по изменению величины R_g и показали, что для ВТМ скорость сборки значительно выше [32]. Кинетику образования спиральных «завитков», возможных интермедиатов сборки ВТМ, и длинных спиральных реполимеров в кислой среде изучали в работе Potschka et al. [33] на линии DORIS-I (DESY, Гамбург; $\lambda = 1,50$ Å).

В настоящей работе с помощью МУРР впервые охарактеризована структура в растворе и выполнено моделирование кривой МУРР во всем измеряемом диапазоне для вирионов и реполимеров ВТМ. По данным ПЭМ, препарат реполимеров содержал набор длинных и гетерогенных по длине частиц в виде «стопок дисков» (рис. 1). Основная часть частиц препарата включала 6–16 20S-дисков. Измеренные величины усредненного радиуса инерции $R_g = 244,1$ Å и молекулярного веса $M_r = 8308$ кДа оказались близкими к модели (АА)₁₆: $R_g = 253,4$ Å и $M_r = 9505$ кДа (табл. 3).

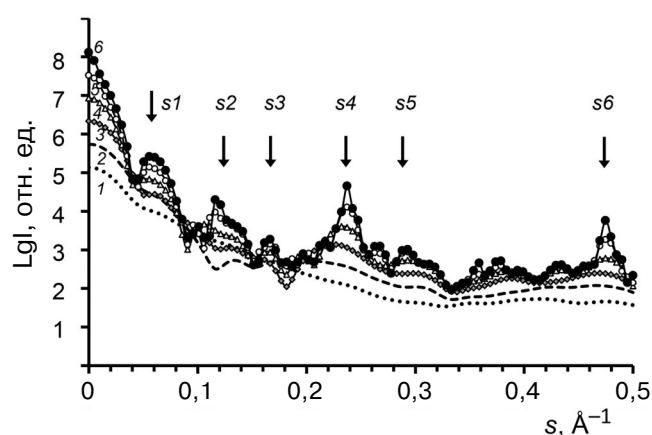


Рис. 4. Модельные кривые МУРР. Расчет модельных интенсивностей проводили с помощью программы CRY SOL [24] для ряда моделей: А, (АА)₁, (АА)₂, (АА)₄, (АА)₈, (АА)₁₆, кривые 1–6 соответственно. Стрелки указывают на максимумы интенсивности векторов рассеяния (см. рис. 3, кривая 1)

Таблица 3. Сравнение инвариант модельных структур и препарата реполимера ВТМ

Инварианты	Модели «стопок дисков»*						Образец
	A	(AA) ₁	(AA) ₂	(AA) ₄	(AA) ₈	(AA) ₁₆	реполимер
$M_{\text{г aa}}$, кДа	297,5	595	1190	2380	4760	9520	–
$M_{\text{г Crys}}$, кДа	297,0	594	1188	2376	4752	9505	8308
$R_{\text{г}}$, Å	64,2	65,5	70,8	88,7	138,4	253,4	244,1

* Величины молекулярных масс ($M_{\text{г Crys}}$) и радиусов инерции ($R_{\text{г}}$) для ряда смоделированных структур: A, (AA)₁, (AA)₂, (AA)₄, (AA)₈, (AA)₁₆ – рассчитывали с помощью программы CRY SOL [24], используя кристаллографическую структуру PDB: 1EI7; величины $M_{\text{г aa}}$ – из данных аминокислотной последовательности.

Ранее с помощью криоэлектронной микроскопии «стопок дисков» белка ВТМ было показано, что их структура подобна ассоциату двух центральных колец закристаллизованного четырехслойного агрегата, определен размер толщины одного кольца 26,8 Å [10, 11], что близко к определенной нами величине периода структуры $d_4 = 26,9$ Å реполимера (табл. 2).

Причиной низкой корреляции модельных и экспериментальных кривых МУРР может быть различие в длинах используемой модели (AA)₁₆ (~820 Å) и частиц в препарате реполимера (300–800 Å). На рис. 4 хорошо видно, что увеличение длины частиц приводит к возрастанию интенсивности пиков s_2 , s_4 и s_6 , соответствующих упаковке дисков в структуре реполимера. Различная гидратация 20S-дисков в кристалле и растворе реполимера также может быть одной из причин несовпадения данных. Франклин и Коммонер [7] обнаружили значительную гидратацию дисков в растворе и уменьшение размера осевой периодичности в «стопках дисков» с 53 до 43 Å при удалении воды в препаратах. Можно предположить также, что атомарные структуры белка в кристаллической модели PDB: 1EI7 несколько отличаются от их структуры реполимера в растворе. Это различие в структуре может быть причиной необычной стабильности реполимера ВТМ в растворе и объяснять связывание некоторых красителей, характерное для амилоидов [13, 14].

Одним из преимуществ МУРР является возможность характеристики всех частиц в раство-

ре при условиях, близких к физиологическим, тогда как более трудоемкий метод рентгеноструктурного анализа позволяет определять структуру в кристалле, а с помощью криоэлектронной микроскопии можно проанализировать выборку замороженных частиц. Нами впервые были охарактеризованы структуры в растворе и выполнено структурное моделирование по данным МУРР во всем измеряемом диапазоне для вирионов и реполимеров белка оболочки ВТМ. Ряд максимумов интенсивности на кривых рассеяния соотнесен с реальными элементами четвертичной структуры (периодичность структуры, шаг спирали в вирионе), и наилучшее совпадение с экспериментальными данными оказалось у модели реполимера из повторяющихся 20S-дисков центральной пары колец кристаллической модели PDB: 1EI7.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (18-04-00525а) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части проведения экспериментов МУРР.

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

1. Caspar, D.L., and Namba, K. (1990) Switching in the self-assembly of tobacco mosaic virus, *Adv. Biophys.*, **26**, 157–185, doi: 10.1016/0065-227x(90)90011-h.
2. Kendall, A., McDonald, M., and Stubbs, G. (2007) Precise determination of the helical repeat of tobacco mosaic virus, *Virology*, **369**, 226–227, doi: 10.1016/j.virol.2007.08.013.
3. Butler, P.J. (1999) Self-assembly of tobacco mosaic virus: the role of an intermediate aggregate in generating both specificity and speed, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **354**, 537–550, doi: 10.1098/rstb.1999.0405.
4. Bloomer, A.C., Champness, J.N., Bricogne, G., Staden, R., and Klug, A. (1978) Protein disk of tobacco mosaic virus at

- 2.8 Å resolution showing the interactions within and between subunits, *Nature*, **276**, 362–368, doi: 10.1038/276362a0.
5. Klug, A. (1999) The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **354**, 531–535, doi: 10.1098/rstb.1999.0404.
 6. Butler, P.J. (1984) The current picture of the structure and assembly of tobacco mosaic virus, *J. Gen. Virol.*, **65** (Pt 2), 253–279, doi: 10.1099/0022-1317-65-2-253.
 7. Franklin, R.E., and Commoner, B. (1955) Abnormal protein associated with tobacco mosaic virus; X-ray diffraction by an abnormal protein (B8) associated with tobacco mosaic virus, *Nature*, **175**, 1076–1077, doi: 10.1038/1751076a0.
 8. Unwin, P.N., and Klug, A. (1974) Electron microscopy of the stacked disk aggregate of tobacco mosaic virus protein. I. Three-dimensional image reconstruction, *J. Mol. Biol.*, **87**, 641–656, doi: 10.1016/0022-2836(74)90075-8.
 9. Dore, I., Ruhlmann, C., Oudet, P., Cahoon, M., Caspar, D.L., and Van Regenmortel, M.H. (1990) Polarity of binding of monoclonal antibodies to tobacco mosaic virus rods and stacked disks, *Virology*, **176**, 25–29, doi: 10.1016/0042-6822(90)90226-h.
 10. Diaz-Avalos, R., and Caspar, D.L. (1998) Structure of the stacked disk aggregate of tobacco mosaic virus protein, *Biophys. J.*, **74**, 595–603, doi: 10.1016/S0006-3495(98)77818-X.
 11. Diaz-Avalos, R., and Caspar, D.L. (2000) Hyperstable stacked-disk structure of tobacco mosaic virus protein: electron cryomicroscopy image reconstruction related to atomic models, *J. Mol. Biol.*, **297**, 67–72, doi: 10.1006/jmbi.1999.3481.
 12. Bhyravbhata, B., Watowich, S.J., and Caspar, D.L. (1998) Refined atomic model of the four-layer aggregate of the tobacco mosaic virus coat protein at 2.4-Å resolution, *Biophys. J.*, **74**, 604–615, doi: 10.1016/S0006-3495(98)77819-1.
 13. Raghavendra, K., Adams, M.L., and Schuster, T.M. (1985) Tobacco mosaic virus protein aggregates in solution: structural comparison of 20S aggregates with those near conditions for disk crystallization, *Biochemistry*, **24**, 3298–3304, doi: 10.1021/bi00334a034.
 14. Raghavendra, K., Salunke, D.M., Caspar, D.L., and Schuster, T.M. (1986) Disk aggregates of tobacco mosaic virus protein in solution: electron microscopy observations, *Biochemistry*, **25**, 6276–6279, doi: 10.1021/bi00368a066.
 15. Ksenofontov, A.L., Dobrov, E.N., Fedorova, N.V., Arutyunyan, A.M., Golanikov, A.E., Jarvekul, L., and Shtykova, E.V. (2018) Structure of potato virus A coat protein particles and their dissociation, *Molecular Biology*, **52**, 913–921, doi: 10.1134/S0026893318060109.
 16. Ksenofontov, A.L., Dobrov, E.N., Fedorova, N.V., Serebryakova, M.V., Prusov, A.N., Baratova, L.A., Paalme, V., Jarvekul, L., and Shtykova, E.V. (2018) Isolated potato virus A coat protein possesses unusual properties and forms different short virus-like particles, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **36**, 1728–1738, doi: 10.1080/07391102.2017.1333457.
 17. Goodman, R.M. (1975) Reconstitution of potato virus X *in vitro*. I. Properties of the dissociated protein structural subunits, *Virology*, **68**, 287–298, doi: 10.1016/0042-6822(75)90272-x.
 18. Fraenkel-Conrat, H. (1957) Degradation of tobacco mosaic virus with acetic acid, *Virology*, **4**, 1–4, doi: 10.1016/0042-6822(57)90038-7.
 19. Ksenofontov, A.L., Kozlovskii, V.S., Kordiukova, L.V., Radiukhin, V.A., Timofeeva, A.V., and Dobrov, E.N. (2006) Determination of concentration and aggregate size in influenza virus preparations from true UV absorption spectra, *Molecular Biology*, **40**, 152–158.
 20. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685, doi: 10.1038/227680a0.
 21. Blanchet, C.E., Spilotros, A., Schwemmer, F., Graewert, M.A., Kikhney, A., Jeffries, C.M., Franke, D., Mark, D., Zengerle, R., Cipriani, F., Fiedler, S., Roessle, M., and Svergun, D.I. (2015) Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY), *J. Appl. Crystallogr.*, **48**, 431–443, doi: 10.1107/S160057671500254X.
 22. Konarev, P.V., Volkov, V.V., Sokolova, A.V., Koch, M.H.J., and Svergun, D.I. (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Crystallogr.*, **36**, 1277–1282, doi: 10.1107/S0021889803012779.
 23. Konarev, P.V., Petoukhov, M.V., and Svergun, D.I. (2001) MASSHA – a graphics system for rigid-body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data, *J. Appl. Crystallogr.*, **34**, 527–532, doi: 10.1107/S0021889801006100.
 24. Svergun, D., Barberato, C., and Koch, M.H. (1995) CRYSol – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Crystallogr.*, **28**, 768–773, doi: 10.1107/S0021889895007047.
 25. Durham, A.C., Finch, J.T., and Klug, A. (1971) States of aggregation of tobacco mosaic virus protein, *Nat. New Biol.*, **229**, 37–42, doi: 10.1038/newbio229037a0.
 26. Sachse, C., Chen, J.Z., Coureux, P.D., Stroupe, M.E., Fandrich, M., and Grigorieff, N. (2007) High-resolution electron microscopy of helical specimens: a fresh look at tobacco mosaic virus, *J. Mol. Biol.*, **371**, 812–835, doi: 10.1016/j.jmb.2007.05.088.
 27. Blanchet, C.E., and Svergun, D.I. (2013) Small-angle X-ray scattering on biological macromolecules and nanocomposites in solution, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **64**, 37–54, doi: 10.1146/annurev-physchem-040412-110132.
 28. Shtykova, E.V., Baratova, L.A., Fedorova, N.V., Radyukhin, V.A., Ksenofontov, A.L., Volkov, V.V., Shishkov, A.V., Dolgov, A.A., Shilova, L.A., Batishchev, O.V., Jeffries, C.M., and Svergun, D.I. (2013) Structural analysis of influenza A virus matrix protein M1 and its self-assemblies at low pH, *PLoS One*, **8**, e82431, doi: 10.1371/journal.pone.0082431.
 29. Costa, L., Andriatis, A., Brennich, M., Teulon, J.M., Chen, S.W., Pellequer, J.L., and Round, A. (2016) Combined small angle X-ray solution scattering with atomic force microscopy for characterizing radiation damage on biological macromolecules, *BMC Struct. Biol.*, **16**, 18, doi: 10.1186/s12900-016-0068-2.
 30. Spinozzi, F., Ferrero, C., Ortore, M.G., Antolinos, A.D., and Mariani, P. (2014) GENFIT: software for the analysis of small-angle X-ray and neutron scattering data of macromolecules in solution, *J. Appl. Crystallogr.*, **47**, 1132–1139, doi: 10.1107/S1600576714005147.
 31. Hiragi, Y., Inoue, H., Sano, Y., Kajiwar, K., Ueki, T., Kataoka, M., Tagawa, H., Izumi, Y., Muroga, Y., and Amemiya, Y. (1988) Temperature dependence of the structure of aggregates of tobacco mosaic virus protein at pH 7.2. Static synchrotron small-angle X-ray scattering, *J. Mol. Biol.*, **204**, 129–140, doi: 10.1016/0022-2836(88)90604-3.
 32. Sano, Y., Inoue, H., and Hiragi, Y. (1999) Differences of reconstitution process between tobacco mosaic virus and cucumber green mottle mosaic virus by synchrotron small angle X-ray scattering using low-temperature quenching, *J. Protein Chem.*, **18**, 801–805, doi: 10.1023/a:1020689720082.
 33. Potschka, M., Koch, M.H., Adams, M.L., and Schuster, T.M. (1988) Time-resolved solution X-ray scattering of tobacco mosaic virus coat protein: kinetics and structure of intermediates, *Biochemistry*, **27**, 8481–8491, doi: 10.1021/bi00422a028.

CHARACTERIZATION OF TOBACCO MOSAIC VIRUS VIRIONS AND REPOLYMERIZED COAT PROTEIN AGGREGATES IN SOLUTION BY SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING*

A. L. Ksenofontov^{1**}, M. V. Petukhov^{2,3}, A. N. Prusov¹, N. V. Fedorova¹, and E. V. Shtykova²

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

² Shubnikov Institute of Crystallography, Federal Scientific Research Centre «Crystallography and Photonics»,
Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russia; E-mail: shtykova@ns.crys.ras.ru

³ Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia; E-mail: maxim@embl-hamburg.de

Received November 7, 2019

Revised December 20, 2019

Accepted December 22, 2019

The structure of tobacco mosaic virus (TMV) virions and stacked disk aggregates of TMV coat protein (CP) in solution was analyzed by synchrotron-based small-angle X-ray scattering (SAXS) and negative contrast transmission electron microscopy (TEM). TMV CP aggregates had a unique stability but did not have helical symmetry. According to the TEM data, they were stacked disks associated into transversely striated rod-shaped structures 300 to 800 Å long. According to modeling based on the crystallographic model of the 4-layer TMV CP aggregate (PDB: 1E17), the stacked disks represented hollow cylinders. The calculated SAXS pattern for the disks was compared to the experimental one over the entire measured range. The best correlation with the SAXS data was found for the model with the repeating central pair of discs; the SAXS curves for the stacked disks were virtually identical irrespectively of the protein isolation method. The positions of maxima on the scatter curves could be used as characteristic features of the studied samples; some of the peaks were assigned to the existing elements of the quaternary structure (periodicity of aggregate structure, virion helix pitch). Low-resolution structural data for the repolymerized TMV CP aggregates in solution under conditions similar to natural were produced for the first time. Analysis of such nano-size objects is essential for their application in biomedicine and biotechnology.

Keywords: TMV, coat protein, stacked disk aggregates, virions, small-angle X-ray scattering

УДК 577.112

АНТИРЕСТРИКЦИОННЫЙ БЕЛОК ArdV (R64) ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С ДНК*

© 2020 А.А. Кудрявцева^{1**}, И.С. Охрименко¹, В.С. Дидина¹,
Г.Б. Завильгельский², И.В. Манухов^{1,2}

¹ Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),
141707 Долгопрудный Московской обл., Россия; электронная почта: kudryavtseva@phystech.edu

² Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 117545 Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.11.2019

После доработки 14.01.2020

Принята к публикации 17.01.2020

Антирестрикционные белки ArdV ингибируют *in vivo* рестрикционную (эндонуклеазную) активность ферментов рестрикции-модификации I типа, но в настоящее время механизм ингибирования остается неизвестен. В данной работе показано, что при выделении и очистке белка ArdV из рекомбинантных клеток *Escherichia coli* происходит совместное выделение (совыделение) ArdV с ДНК. В условиях суперпродукции часть белка ArdV образует в клетке нерастворимые агрегаты, которые не содержат ДНК. Показано, что со-выделение ДНК как при выделении белка с использованием ионообменной и аффинной хроматографии, так и при выделении тотальной ДНК из клеток, предварительно обработанных формальдегидом, имеет место лишь с нативным ArdV, но не с его мутантным вариантом ArdVΔD141, не обладающим антирестрикционной активностью. Получено подтверждение гипотезы блокирования белком ArdV процесса транслокации ДНК через R-субъединицы комплекса R₂M₂S фермента рестрикции-модификации I типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антирестрикция, трансмиссивная плаزمид, R64, ArdV.

DOI: 10.31857/S0320972520030070

Антирестрикционные белки семейства ArdV специфически ингибируют рестрикционную (эндонуклеазную) активность ферментов рестрикции-модификации I типа, таким образом позволяя конъюгативным плазмидам преодолевать рестрикционный барьер. Впервые ген *ardV*, кодирующий антирестрикционный белок ArdV, был обнаружен в трансмиссивной плазмиде pKM101 (группа несовместимости IncN) [1]. Оказалось, что белок ArdV *in vivo* ингибирует только рестрикционную (эндонуклеазную) активность ферментов рестрикции-модификации I типа [1, 2] и не образует комплекс с ферментами рестрикции-модификации I типа *in vitro* [2]. Была показана ключевая роль С-концевого аспартата (D141) в антирестрикционной активности ArdV [3]. В работе Balabanov et al. [4] было показано, что ArdV теряет способность защищать немодифицированный фаг λ.0 в УФ-облученных клетках *E. coli* K12 от рестрикции EcoKI при условии образования в клетках значитель-

ного количества немодифицированной хромосомальной ДНК. Феномен влияния немодифицированной ДНК на антирестрикционную активность ArdV позволил нам выдвинуть гипотезу о блокировании белком ArdV процесса транслокации немодифицированной ДНК через R-субъединицы комплекса R₂M₂S фермента рестрикции-модификации I типа [4].

В настоящей работе исследована способность связывания белка ArdV, кодируемого геном *ardV*, расположенным в трансмиссивной плазмиде R64 (группа несовместимости IncI1), с ДНК *in vivo* и, как следствие, возможность их совместного выделения при различных условиях.

МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы и условия культивирования. Штаммы *Escherichia coli* K-12: *E. coli* AB1157; *E. coli* TG1 (*thi relA supE44 hsdR17 hsdM Δ(lac-proAB)* [*F' traD36 proAB lacI^qZ ΔM15*]) и *E. coli* BL21(DE3) — были получены из коллекции ВКПМ «ГосНИИгенетика».

Бактерии выращивали в колбах (150 мл) со средой LB на качалке («New Brunswick

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-326, 02.03.2020.

** Адресат для корреспонденции.

Scientific», США) при 37 °C и 200 об/мин. Для получения агаризованной среды использовали 1,5% агара. Трансформированные штаммы культивировали на средах с добавлением ампицилина в конечной концентрации 100 мкг/мл. Оптическую плотность (OD) бактериальной суспензии измеряли при 590 нм с помощью фотокolorиметра КФК-2МП («ПрофМТ», Россия). Биосинтез ArdV в штамме *E. coli* BL21(DE3) осуществляли в индукционной среде с добавлением лактозы, как описано в работах Pokrovsky et al. [5] и Studier [6].

Экспрессию гена химерного белка GST-ArdV (глутатионтрансфераза слита с ArdV) осуществляли с плазмиды pGEX-ArdV в штамме *E. coli* AB1157 в среде LB с добавлением IPTG (1 мМ) при достижении OD₅₉₀ 0,8.

Экспрессию генов химерных белков ArdV и ArdBAD141, слитых с антигеном Flag, проводили с плазмид pFlag-ArdV и pFlag-ArdBAD141 в штамме *E. coli* AB1157 в среде LB без добавления индуктора.

Плазмиды. В качестве источника гена *ardB* использовали трансмиссивную плазмиду R64 (IncI1). Эндонуклеолитическое расщепление, лигирование фрагментов ДНК, электрофорез в агарозном геле, выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили согласно общепринятым методикам [7]. Полученные конструкции представлены в таблице.

В качестве отрицательного контроля при экспрессии гена *ardB* с промотора T7 использовали клетки *E. coli* BL21(DE3) с плазмидой pET15b («Novagen», США).

Измерение антирестрикционной активности белка ArdB. Антирестрикционную активность белков ArdB, кодируемых в конструкциях pGST-ArdB, pFlag-ArdV и pFlag-ArdBAD141, измеряли с использованием фаговой методики. Фаг λ.0 (содержащий немодифицированную ДНК) титровали, используя в качестве хозяйского штамма *E. coli* K12 AB1157 с активной системой рестрикции-модификации I типа – EcoKI. Эффективность посева (EOP – efficiency of plating) фага λ.0 определяли как соотношение титра фага на штамме *E. coli* AB1157 с плазмидой, содержащей ген *ardB*, и на том же штамме без плазмиды или содержащем вектор без вставки.

Ионообменная хроматография. Клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) pET-YfeV лизировали с помощью микрофлюидизера M-100P («Microfluidics International Corporation», США) в 50 мМ Tris-HCl-буфере (pH 8,0) при давлении 1500 бар. Клеточные лизаты центрифугировали 10 мин при 15 000 g. Супернатант после центрифугирования наносили на хроматографическую колонку, заполненную ионообменными сорбентами

Q Sepharose® Fast Flow («GE Healthcare», США) или СПС-био-Q («Техносорбент», Россия) при 4 °C методом batch. Осадок диспергировали в нетитрованном 20 мМ Tris-ОН-буфере (pH ~ 10,0). Полученный раствор центрифугировали в течение 10 мин при 15 000 g. Переход агрегированного ArdV из телец включения в растворимую фазу контролировали методом электрофореза в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) с окрашиванием Кумасси G-250. У супернатанта, содержащего солюбилизированный ArdV, доводили pH до 8,0 титрованием HCl. Ионообменную хроматографию нативного и солюбилизированного ArdV проводили на колонке, заполненной сорбентами Q Sepharose® Fast Flow («GE Healthcare», США) или СПС-био-Q («Техносорбент», Россия). Элюцию ArdV проводили при 4 °C, пропуская через колонку 50 мМ Tris-HCl-буфер (pH 8,0) со скоростью 6 мл/мин при линейном росте концентрации NaCl от 0 до 1 М в 20 объемах сорбента в хроматографической колонке. Результаты хроматографии анализировали методом SDS-PAGE.

Аффинная хроматография. Химерный белок Flag-ArdV выделяли с помощью набора Anti-FLAG® M2 Magnetic Beads (M8823, «Sigma-Aldrich», США) согласно рекомендациям производителя; образцы наносили в 50 мМ Tris-HCl-буфере (pH 8,0), 150 мМ NaCl. Раствор целевого химерного белка добавляли к сорбенту и инкубировали в течение часа при комнатной температуре при постоянном медленном перемешивании на орбитальной мешалке. Магнитные частицы сорбента с адсорбированным белком осаждали с помощью магнита, супернатант удаляли, частицы сорбента промывали буфером для нанесения в 20 объемах сорбента. Элюцию проводили, добавляя к частицам сорбента 100 мМ глицин (pH 3,0). К раствору элюированного целевого химерного белка добавляли равный объем 100 мМ Tris-HCl-буфера (pH 8,0), 300 мМ NaCl и доводили pH до 8,0.

Конструкция pET-His-ArdV определяет синтез белка ArdV в слитной полипептидной цепи с полигистидиновым тагом 6xHis на N-конце, соединенным с ArdV через линкер Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly. Целевой белок выделяли с помощью сорбента TALON® Metal Affinity Resin («Clontech», США). Клеточные лизаты (в 20 мМ фосфатном буфере, pH 8,0; 300 мМ NaCl), содержавшие растворимую фракцию ArdV, наносили на колонку, промывали буфером (20 мМ фосфатный буфер, pH 8,0; 300 мМ NaCl) с добавлением 10 мМ имидазола. Целевой белок элюировали с колонки фосфатным буфером, содержащим 300 мМ NaCl и 500 мМ имидазола.

Плазмиды, использованные в настоящей работе, содержащие ген *ardB* и его варианты

Плазмида, источник	Описание	Последовательности праймеров
pET-YfeB	ген <i>ardB</i> (R64), встроенный в вектор pET15b под контроль промотора pT7 по сайтам NcoI/BamHI [8]	5'-AAGGAGATATACCATGCATCATCACCATCACCACGGAG-GCTCCGGCGGGGATCCGGTCAATATGCGAAACCTGT-3' 5'-AGCAGCCGGATCCTTAGTCCAGAGCCGCGTAAATC-3'
pET-His-ArdB	ген <i>ardB</i> (R64), содержащий последовательность, кодирующую 6xHis-таг на N-конце целевого белка His-ArdB; встроен в вектор pET15b под контроль промотора pT7 по сайтам NcoI/BamHI	5'-AGGAGATATACCATGGGACATCATCACCATCACCACGGAG-GCTCCGGCGGGGATCCGGTCAATATGCGAAACCTGT-3' 5'-AGCAGCCGGATCCTTAGTCCAGAGCCGCGTAAATC-3'
pET-His-ArdBAD141	то же, что и pET-His-ArdB, но кодирует мутантный белок His-ArdBAD141, содержащий 6xHis-таг на N-конце	5'-AGGAGATATACCATGGGACATCATCACCATCACCACGGAG-GCTCCGGCGGGGATCCGGTCAATATGCGAAACCTGT-3' 5'-AGCAGCCGGATCCTTACAGAGCCGCGTAAATC-3'
pGEX-ArdB	ген <i>ardB</i> (R64) встроен в вектор pGEX-KG [9] по сайтам BamHI/EcoRI; конструкция содержит ген <i>ardB</i> под контролем промотора <i>tac</i> и определяет экспрессию химерного белка GST-ArdB [4]	5'-GGATCCATGCAATATGCGAAACCTGTC-3' 5'-GAATTCTCAGTCCAGAGCCGCGTAAAT-3'
pFlag-ArdB	ген <i>ardB</i> (R64), содержащий последовательность, кодирующую Flag-таг на N-конце целевого белка Flag-ArdB; встроен в коммерческий вектор pTZ57R под промотор <i>lac</i>	5'-GAGGAATACATCATGGACTACAAAGACGATGACGACAA-GAATGTTGAAG-3' 5'-GCGGATCCCGTCCGTTAATCAGTCCAGAGCC-3'
pFlag-ArdBAD141	то же, что и pFlag-ArdB, но кодирует мутантный белок Flag-ArdBAD141, содержащий Flag-таг на N-конце	5'-GAGGAATACATCATGGACTACAAAGACGATGACGACAA-GAATGTTGAAG-3' 5'-GCGGATCCCCGTTAATCACAGAGCCGCGTA-3'

Для выделения белка GST-ArdB, в котором глутатион-S-трансфераза (GST) соединена с N-концом ArdB через гидролиземый тромбином линкер Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-Pro-Gly [9], использовали набор реактивов Pierce™ GST Protein Interaction Pull-Down Kit («Thermo Scientific», США). Клетки лизировали в PBS (pH 7,5), 150 mM NaCl. После центрифугирования осветленные лизаты, содержавшие растворимую фракцию ArdB, добавляли к GST-сорбенту, медленно перемешивали в течение часа при 4 °C, промывали PBS трижды. Целевой белок элюировали 50 mM Tris-HCl с 50 mM глутатионом.

Результаты выделения белков с помощью аффинной хроматографии анализировали методом SDS-PAGE и масс-спектрометрическим фингер-принт-анализом. Наличие ДНК в образцах контролировали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле с окрашиванием этидиум бромидом с добавлением в электродный буфер РНКазы А.

Расчет содержания целевого белка в образце. Расчет содержания целевого белка в каждой фракции элюата после хроматографического разделения белков осуществляли с помощью

денситометрического анализа результатов гелеэлектрофореза в программе TotiLab. Для этого определяли интенсивность окрашивания полос ArdB на фотографии геля для каждой фракции, нормированной на ее объем. Сумму интенсивностей окрашивания полос ArdB принимали за 100%.

Получение ковалентных конъюгатов ДНК–белок с использованием формальдегида. Суспензию клеток *E. coli* BL21(DE3) без плазмиды или с плазмидами, содержащими гены *ardB* (нативный ArdB) или *ardB*-ΔD141 (мутантный ArdBAD141) под контролем промотора pT7, выдерживали 40 мин при комнатной температуре в 30%-ном формальдегиде [10, 11]. После этого выделяли тотальную ДНК с помощью набора реактивов Wizard® Genomic DNA Purification Kit («Promega», США). Полученные образцы анализировали в 1%-ном агарозном и 15%-ном полиакриламидном гелях.

Масс-спектрометрический анализ. Идентификацию белков ArdB проводили с помощью масс-спектрометрии. Белки, выделенные из геля после SDS-PAGE, идентифицировали мето-

дом MALDI-TOF (matrix-assisted laser description ionization-time of flight). Образцы перед анализом обрабатывали трипсином [12–16]. Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе MALDI-TOF Reflex III («Bruker», Германия) в Центре протеомных исследований при Институте биомедицинской химии РАН им. В.Н. Ореховича. Полученные масс-фингерпринты анализировали с помощью базы данных Swiss-Prot [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты выделения белка ArdV с помощью ионообменной хроматографии представлены на рис. 1. Клетки *E. coli* BL21(DE3) pET-YfeV культивировали при 37 °C на индукционной среде с лактозой в течение 20 ч. При экспрессии *ardB* с промотора фага T7 значительная часть белка агрегирует (образует неклассические тельца включения — нерастворимые агрегаты). Ионообменную хроматографию проводили как для растворимой фракции белка ArdV, так и для агрегированной формы, предварительно растворенной с помощью нетитрованного 20 mM Tris.

Как видно из рис. 1, белок ArdV, переведенный в растворимую форму из агрегатов, элюируется с сорбента при сравнительно невысокой концентрации соли (максимум концентрации 200 mM NaCl), что вполне ожидаемо для белка с расчетной изоэлектрической точкой, равной 4,97. Стоит отметить сравнительную компактность пика при элюции, что может свидетельствовать о гомогенности белка. Однако белок ArdV, выделяемый из фракции растворимых белков клеточного лизата, т.е. находящийся в растворимой форме, элюируется с хроматографического ионообменного сорбента более широким пиком при концентрации NaCl 200–700 mM. Полученные профили элюции свидетельствуют о том, что изначально растворимый белок ArdV в клетке может быть связан с ДНК, что, во-первых, приводит к увеличению распределенного электростатического отрицательного заряда и к повышенной сорбции комплекса белка ArdV с ДНК на ионообменном сорбенте и, следовательно, требует большей концентрации NaCl для элюции; во-вторых, гетерогенность ДНК в комплексе ArdV с ДНК может приводить к значительному уширению хроматографических пиков при элюции. Следствие обоих этих процессов мы наблюдаем при проведении ионообменной хроматографии ArdV.

На рис. 2 представлены результаты анализа фракций белка ArdV, полученных при хромато-

графической очистке на ионообменном сорбенте с помощью электрофореза в полиакриламидном и агарозном гелях. После хроматографической очистки на ионообменном сорбенте во фракциях с ArdV содержится сравнительно малое количество примесных белков штамма-продуцента. Анализ с помощью электрофореза в агарозном геле (рис. 2, б) показал присутствие ДНК во фракциях белка ArdV, полученных в процессе ионообменной хроматографии при нанесении белка из растворимой фракции клеточного лизата (дорожки 1–3), но не во фракциях, полученных из агрегатов (дорожки 4–7).

Для подтверждения гипотезы о связывании ArdV с ДНК были поставлены эксперименты с выделением ArdV и его мутантной формы ArdBAD141, не обладающей антирестрикционной активностью, с помощью разных видов аффинной хроматографии.

Поскольку плаزمид с активно экспрессирующимся геном *ardB* нередко теряется клетками, антирестрикционная активность химерных белков была предварительно подтверждена *in vivo* с помощью посевов немодифицированного фага λ.

На рис. 3 приведены результаты аффинной хроматографии химерных белков Flag-ArdB, Flag-ArdBAD141, GST-ArdB, His-ArdB и His-ArdBAD141. Содержание ArdV и ArdBAD141 в полосах на ПААГ (рис. 3, левая часть) после аффинной хроматографии было подтверждено масс-спектрометрическим фингерпринт-анализом. Наличие ДНК в элюатах было показано с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с окрашиванием этидиум бромидом.

Как видно из рис. 3, ДНК совыделяется с ArdV при использовании разных носителей и сорбентов: магнитных частиц с антителами anti-Flag, глутатионового сорбента и кобальтовой смолы. ДНК совыделяется лишь с нативными формами белка Flag-ArdB и His-ArdB (дорожки 1), но не с мутантами Flag-ArdBAD141 и His-ArdBAD141 (дорожки 2). Отметим, что ДНК в образцах представлена различными фрагментами в пределах 1000 п.н.

Для проверки взаимодействия ArdV с ДНК были получены ковалентные конъюгаты ArdV с ДНК, т.е. были зафиксированы взаимодействия белок–ДНК за счет образования ковалентных связей между первичной аминокислотой белка и нуклеиновой кислотой с использованием формальдегида [10, 11]. Клетки *E. coli* трех штаммов BL21(DE3) (без плазмиды), BL21(DE3) (pET-YfeV) с нативным геном *ardB* и BL21(DE3) (pET-YfeBAD141) с мутантным геном *ardBAD141* культивировали до OD₅₉₀ 0,8, затем обрабатывали формальдегидом и выделяли тотальную ДНК. Выделение хромосомальной ДНК

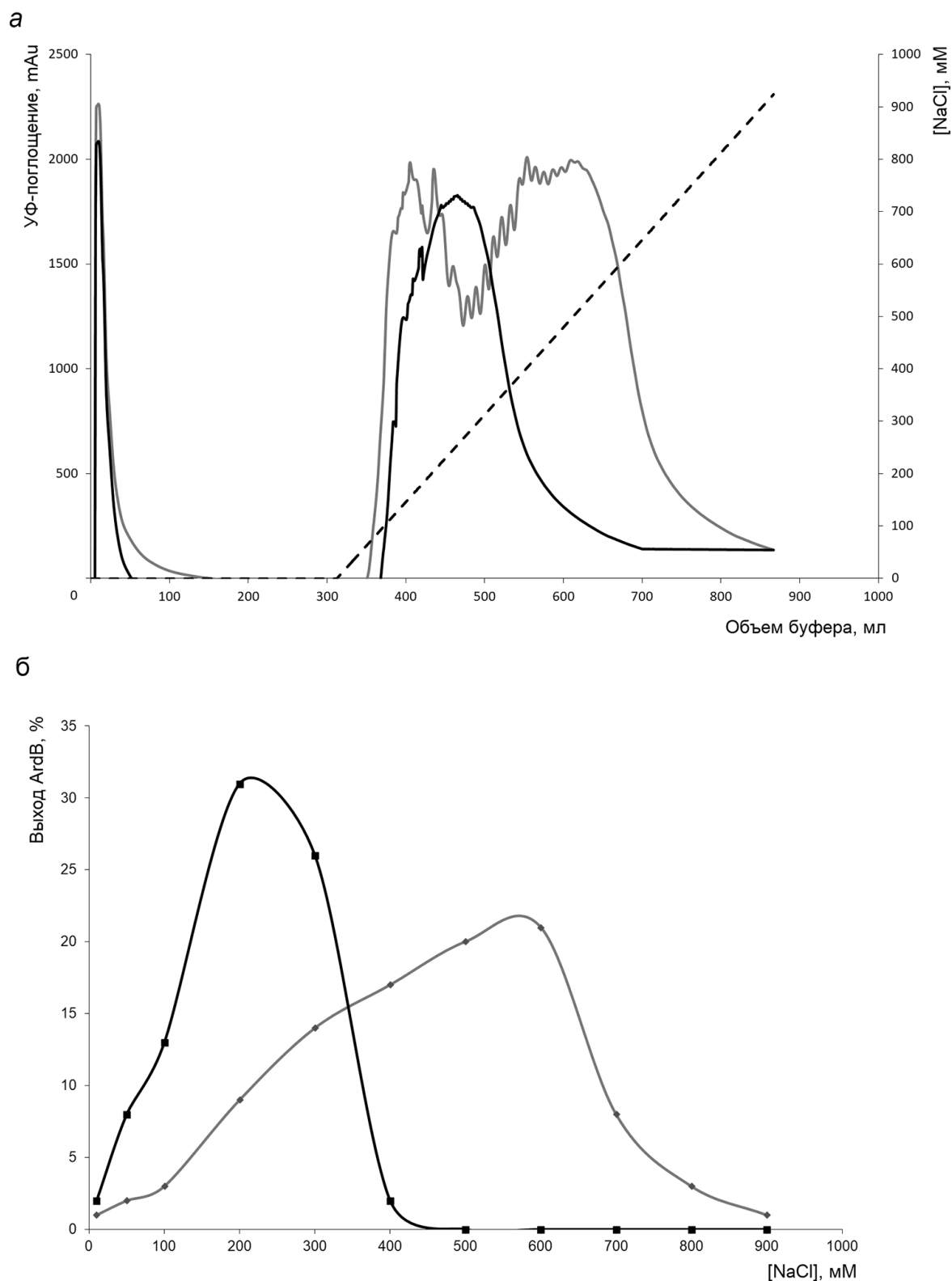


Рис. 1. Профиль элюции растворимой и нерастворимой форм белка ArdV с ионообменного сорбента (заряженная группа ионообменного сорбента — четвертичный амин). *а* — Зависимость УФ-поглощения при 280 нм элюата от объема буфера, прошедшего через колонку; *б* — содержание белка ArdV во фракциях, полученных в процессе очистки на ионообменном сорбенте, при различных концентрациях NaCl. Серая кривая — профиль элюции растворимой фракции белка ArdV, черная кривая — профиль элюции белка ArdV, переведенного в растворимую форму из телец включения. Пунктирная линия — линейный градиент концентрации NaCl в элюенте

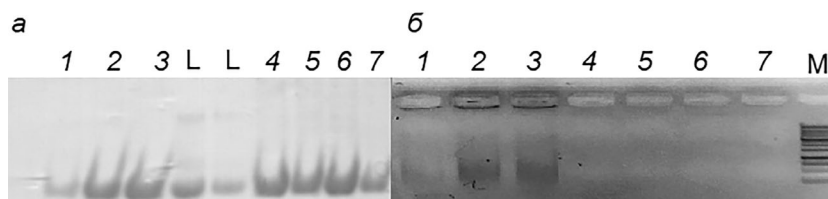


Рис. 2. Анализ фракций белка ArdB, полученных в результате ионообменной хроматографии, с помощью электрофореза в SDS-PAGE (а) и 1%-ном агарозном геле (б). Дорожки 1–3 – фракции белка ArdB, полученные при очистке ArdB, изначально присутствовавшего в клеточном лизате в растворимой форме, элюированные с сорбента 200, 500 и 600 мМ NaCl соответственно; дорожки 4–7 – фракции, полученные при очистке белка ArdB из растворенных агрегатов, элюированные с сорбента 150, 200, 300 и 350 мМ NaCl соответственно. L – маркер 14,5 кДа (РНКазы А, «Евроген», Россия), М – маркер ДНК (1 kb, «Евроген», Россия)

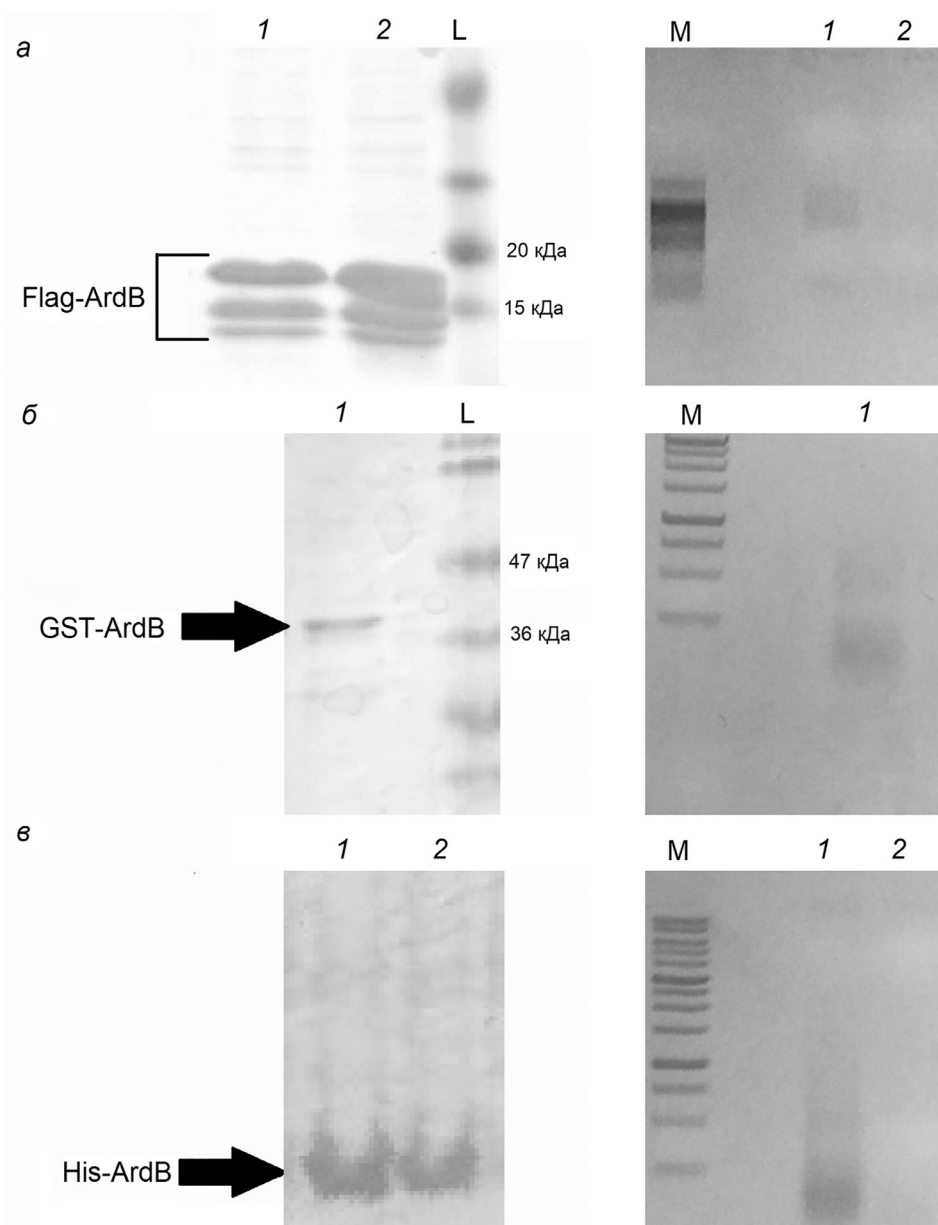


Рис. 3. Результаты аффинной хроматографии химерных белков ArdB. Слева – анализ полученных фракций в SDS-PAGE, справа – в 1%-ном агарозном геле. а – Flag-ArdB (дорожки 1) и Flag-ArdBAD141 (дорожки 2); б – GST-ArdB (дорожки 1); в – His-ArdB (дорожки 1) и His-ArdBAD141 (дорожки 2). L – Prestained Protein MW marker (а) и PageRuler Plus (б) («Thermo Scientific», США); М – 100+ bp (а) и 1 kb (б, в) («Евроген», Россия)

контролировали методом электрофореза в агарозном геле. Совыделяющиеся с ДНК белки определяли с помощью SDS-PAGE (рис. 4, дорожки 4–6), предварительно обработав образцы ультразвуком для деградации длинных фрагментов ДНК. Полосы с массой 14 кДа вырезали из геля, обрабатывали трипсином, элюировали полученные пептиды и идентифицировали по распределению и составу пептидных фингерпринтов и сравнению с базой данных Swiss-Prot как белок ArdB.

После обработки клеток формальдегидом совместно с ДНК совыделяется большое количество разнообразных белков. Однако ArdB выделяется вместе с тотальной ДНК только в варианте нативного белка (рис. 4, дорожка 4), а не мутантной формы, не обладающей антирестрикционной активностью (рис. 4, дорожка 5). Вместе с тотальной ДНК, выделенной из клеток, несущих плазмиду с мутантным геном *ardB-ΔD141*, не выделяется белок массой 14 кДа, соответствующий ArdBΔD141. Мутантный по C-концевому аспартату белок ArdBΔD141, по-видимому, не способен взаимодействовать с ДНК и поэтому не обладает антирестрикционной активностью.

Для доказательства непосредственной связи ArdB с ДНК был поставлен эксперимент с проверкой торможения в геле (рис. 5). Для этого на одном полиакриламидном геле (SDS-PAGE) были проанализированы результаты выделения ДНК из клеток, обработанных формальдегидом (рис. 4, дорожка 4), и результаты выделения и

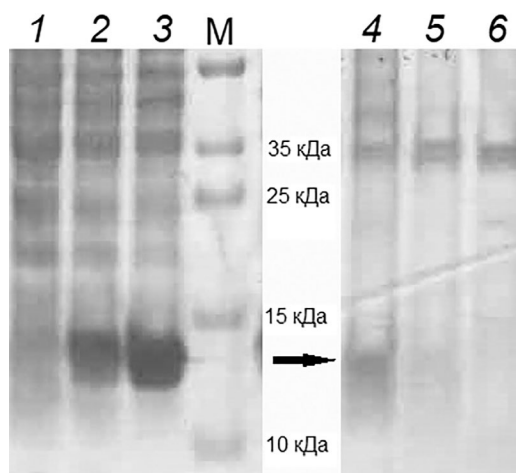


Рис. 4. Электрофоретическое разделение в ПААГ белков клеточных лизатов штаммов *E. coli* BL21(DE3) и выделенной хромосомальной ДНК. 1–3 – Лизаты из клеток, не обработанных формальдегидом: 1 – BL21(DE3) pET15, 2 – BL21(DE3) pET-YfeB с геном *ardB*, 3 – BL21(DE3) pET-YfeBAD141 с мутантным геном *ardB-ΔD141*; 4–6 – хромосомальная ДНК, выделенная из клеток, обработанных формальдегидом: 4 – BL21(DE3) pET-YfeB, 5 – BL21(DE3) pET-YfeBAD141, 6 – BL21(DE3) pET15; М – маркер PageRuler Plus («Thermo Scientific», США)

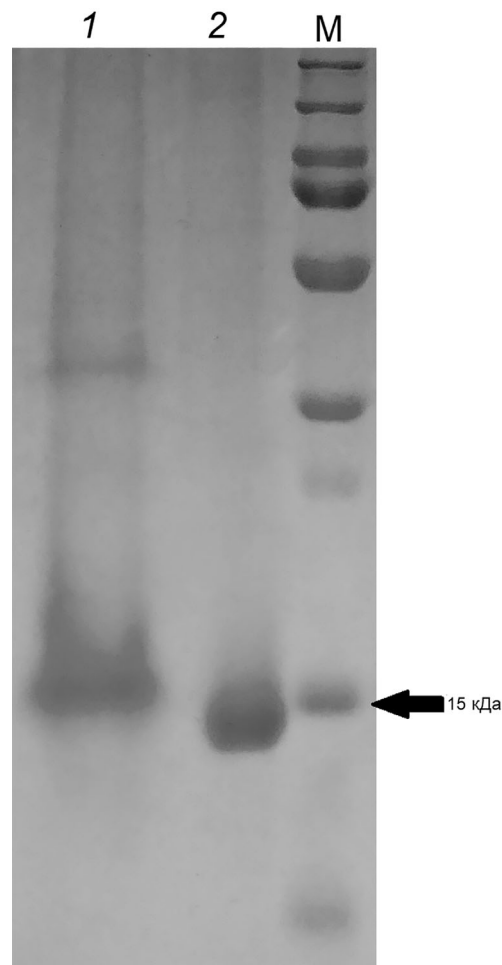


Рис. 5. Электрофоретическое разделение в ПААГ белков после выделения ДНК из клеток, обработанных формальдегидом (1), и после выделения и очистки белка ArdB из агрегатов (2). М – маркер PageRuler Plus («Thermo Scientific», США)

очистки белка ArdB из агрегатов (рис. 2, дорожка 5), которые не содержат в своем составе ДНК.

Как видно из рис. 5, белок ArdB, содержащийся в образце после выделения тотальной ДНК, несколько отстаёт от белка, выделенного с помощью ионообменной хроматографии из белковых агрегатов. Принадлежность полос размером 15 кДа к белку ArdB подтверждена масс-спектрометрическим фингерпринт-анализом. Данный результат можно считать прямым указанием на взаимодействие между ДНК и белком ArdB *in vivo*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При выделении ArdB с использованием ионообменной хроматографии во фракциях с белком была обнаружена ДНК. Этот же результат под-

тверждался и при выделении ArdB с помощью различных методов аффинной хроматографии: выделение с помощью Flag-тага, 6xHis-тага и в химерной конструкции с GST. Во всех случаях были использованы совершенно разные носители и сорбенты, поэтому элюция ДНК вместе с целевым белком не может объясняться связыванием ДНК с сорбентом. В экспериментах с выделением тотальной ДНК из клеток, обработанных формальдегидом, было проведено сравнение ArdB дикого типа и мутанта по C-концевому аспартату ArdBAD141, не обладающего антирестрикционной активностью. Показано, что ArdBAD141 не связывается с ДНК, и, по-видимому, это служит причиной отсутствия у данного белка антирестрикционной активности. Поскольку белок ArdB, содержащийся в образце, после выделения тотальной ДНК при миграции в ПААГ отстает от белка, выделенного с помощью ионообменной хроматографии из белковых агрегатов, можно считать доказанным взаимодействие между ДНК и ArdB *in vivo*.

В работе Завильгельского с соавт. [18] была определена K_d ДНК-мимикрирующего белка ArdA. Измерения проводили по ингибированию рестрикционной активности ферментов рестрикции-модификации I типа *in vivo*. Показано, что K_d для белка ArdA составляет $\sim 10^{-8}$ М. В работе Балабанова с соавт. [19] было проведено сравнительное измерение K_d также *in vivo* для белков ArdA и ArdB, гены которых расположены в плазмиде R64. Показано, что K_d , характеризую-

щая антирестрикционную активность белка ArdB, в ~ 50 раз превышает таковую белка ArdA, т.е. равна $\sim 5 \cdot 10^{-7}$ М. По данным Serfiotis-Mitsa et al. [2], *in vitro* активность ArdB не обнаруживается, и, следовательно, связывание белка с ДНК не происходит. Однако надо отметить, что в этой работе проводили сравнение ArdA и ArdB в эквимоллярных концентрациях, и, возможно, требуются дополнительные эксперименты *in vitro* с большими концентрациями ArdB.

Полученные в настоящей работе данные о наличии комплексов белка ArdB с хромосомальной ДНК подтверждают гипотезу о блокировании белком ArdB процесса транслокации немодифицированной ДНК через R-субъединицы комплекса R_2M_2S фермента рестрикции-модификации I типа, высказанную в работе Balabanov et al. [4]. В результате ингибируется лишь рестрикционная (эндонуклеазная), но не модификационная (метиلاзная) активность фермента.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты 18-34-00753 и 19-04-00495), а также за счет средств Госзадания № 6.9899.2017/БЧ.

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 исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Belogurov, A.A., Delver, E.P., and Rodzevich, O.V. (1993) Plasmid pKM101 encodes two nonhomologous antirestriction proteins (ArdA and ArdB) whose expression is controlled by homologous regulatory sequences, *J. Bacteriol.*, **175**, 4843–4850, doi: 10.1128/jb.175.15.4843-4850.1993.
- Serfiotis-Mitsa, D., Herbert, A.P., Roberts, G.A., Soares, D.C., White, J.H., Blakely, G.W., Uhrin, D., and Dryden, D.T. (2010) The structure of the KlcA and ArdB proteins reveals a novel fold and antirestriction activity against type I DNA restriction systems *in vivo* but not *in vitro*, *Nucl. Acids Res.*, **38**, 1723–1737, doi: 10.1093/nar/gkp1144.
- Кудрявцева А.А., Осетрова М.С., Ливинюк В.Я., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. (2017) C-концевой остаток аспарагиновой кислоты (D141) необходим для антирестрикционной активности белка ArdB (R64), *Молекулярная биология*, **51**, 831–835.
- Balabanov, V.P., Kudryavtseva, A.A., Melkina, O.E., Pustovoi, K.S., Khrulnova, S.A., and Zavilgelsky, G.B. (2019) ArdB protective activity for unmodified λ phage against EcoKI restriction decreases in UV-treated *Escherichia coli*, *Curr. Microbiol.*, **76**, 1374–1378, doi: 10.1007/s00284-019-01755-z.
- Pokrovsky, V.S., Anisimova, Yu.N., Davydov, Z.D., Bazhenov, S.V., Bulushova, N.V., Zavilgelsky, G.B., Kotova, V.Y., and Manukhov, I.V. (2019) Methionine gamma lyase from *Clostridium sporogenes* increases the anticancer effect of doxorubicin in A549 cells and human cancer xenografts, *Invest New Drugs*, **37**, 201–209, doi: 10.1007/s10637-018-0619-4.
- Studier, F.W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures, *Protein Expr. Purif.*, **41**, 207–234, doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Goryanin, I.I., Kudryavtseva, A.A., Balabanov, V.P., Biryukova, V.S., Manukhov, I.V., and Zavilgelsky, G.B. (2018) Antirestriction activities of KlcA (RP4) and ArdB (R64) proteins, *FEMS Microbiol. Lett.*, **365**, doi: 10.1093/femsle/fny227.
- Guan, K.L., and Dixon, J.E. (1991) Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion protein with glutathione S-transferase, *Anal. Biochem.*, **192**, 262–267, doi: 10.1016/0003-2697(91)90534-z.
- Solomon, M.J., and Varshavsky, A. (1985) Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for *in vivo* chromatin structures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6470–6474, doi: 10.1073/pnas.82.19.6470.

11. Hoffman, E.A., Frey, B.L., Smith, L.M., and Auble, D.T. (2015) Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes, *J. Biol. Chem.*, **290**, 26404–26411, doi: 10.1074/jbc.R115.651679.
12. Han, M.J., Yoon, S.S., and Lee, S.Y. (2001) Proteomic analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* producing poly(3-hydroxybutyrate), *J. Bacteriol.*, **183**, 301–308, doi: 10.1128/JB.183.1.301-308.2001.
13. Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemoi, J., and Ferrara, P. (1992) In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis, *Anal. Biochem.*, **203**, 173–179, doi: 10.1016/0003-2697(92)90061-b.
14. Patterson, S.D., and Aebersold, R. (1995) Mass-spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins, *Electrophoresis*, **16**, 1791–1814, doi: 10.1002/elps.11501601299.
15. Bazhenov, S.V., Khrulnova, S.A., Konopleva, M.N., and Manukhov, I.V. (2019) Seasonal changes in luminescent intestinal microflora of the fish inhabiting the Bering and Okhotsk seas, *FEMS Microbiol. Lett.*, **366**, pii: fnz040, doi: 10.1093/femsle/fnz040.
16. Manukhov, I.V., Melkina, O.E., Goryanin, I.I., Baranova, A.V., and Zavilgelsky, G.B. (2010) The N-terminal domain of the *Aliivibrio fischeri* LuxR is a target of the GroEL chaperonin, *J. Bacteriol.*, **192**, 549–551, doi: 10.1128/JB.00754-10.
17. Bairoch, A., and Apweiler, R. (2000) The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000, *Nucl. Acids Res.*, **28**, 45–48, doi: 10.1093/nar/28.1.45.
18. Zavilgelsky, G.B., Kotova, V.Yu., and Rastorguev, S.M. (2008) Comparative analysis of antirestriction activity of ArdA (CollbP9) and Ocr (T7) proteins, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1124–1130.
19. Balabanov, V.P., Pustovoi, K.S., and Zavilgelsky, G.B. (2012) Comparative analysis of antirestriction activity of R64 ArdA and ArdB proteins, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **46**, 269–275.

ANTI-RESTRICTION PROTEIN ArdB (R64) BINDS TO DNA*

A. A. Kudryavtseva^{1**}, I. S. Okhrimenko¹, V. S. Didina¹,
G. B. Zavilgelsky², and I. V. Manukhov^{1,2}

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, Laboratory of Molecular Genetics,
141707 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia; E-mail: kudryavtseva@phystech.edu

² State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms,
National Research Center “Kurchatov Institute”, Laboratory of Genetics of Bacteria, 117545 Moscow, Russia

Received November 15, 2019

Revised January 14, 2020

Accepted January 17, 2020

Anti-restriction ArdB protein inhibits restriction (endonuclease) activity of restriction-modification (RM) type I enzymes *in vivo*, however the mechanism of the inhibition is still unknown. In this study it was shown that isolation and purification of ArdB from the recombinant *Escherichia coli* cells results in co-isolation of ArdB with DNA. Though under conditions of superproduction, part of ArdB protein forms in cells insoluble DNA-free aggregates. Only native ArdB, but not the ArdBΔD141 mutant which does not reveal anti-restriction activity, could be co-isolated with DNA both during protein isolation by anion-exchange and affinity chromatography and during the total DNA isolation from formaldehyde-treated cells. This confirms the hypothesis that ArdB blocks the DNA translocation via the R-subunits of the RM type I enzyme R₂M₂S complex.

Keywords: anti-restriction, transmissible plasmid, R64, ArdB

УДК 577.151

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЗОНЕ КОНТАКТА СУБЪЕДИНИЦ НА АКТИВНОСТЬ И АЛЛОСТЕРИЧЕСКУЮ РЕГУЛЯЦИЮ ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ *Mycobacterium tuberculosis**

© 2020 Р.С. Романов^{1,2}, С.А. Курилова^{1,2}, А.А. Байков^{1,2}, Е.В. Родина^{1,2**}

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

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.12.2019

После доработки 14.01.2020

Принята к публикации 14.01.2020

Гексамерная неорганическая пирофосфатаза из *Mycobacterium tuberculosis* (Mt-PPаза) имеет ряд структурных и функциональных особенностей, выделяющих ее среди гомологов, широко распространенных в живом мире. В частности, в ней иные контактные зоны субъединиц и отсутствует *N*-концевой участок полипептидной цепи. В данной работе мы сконструировали две мутантные формы фермента (Ec-Mt-PPазу и R14Q-Mt-PPазу), в первой из которых недостающая часть цепи достроена фрагментом РРазы *Escherichia coli*, а во второй произведена точечная замена в зоне контакта двух тримеров внутри гексамера. Обе модификации значительно улучшили каталитические свойства фермента и устранили его ингибирование избытком кофактора, иона магния. Обнаружена активация Mt-PPазы малыми (~10 мкМ) концентрациями АТР, фруктозо-1-фосфата, L-малата и негидролизуемого аналога субстрата, метиленбисфосфоната (PCP). При концентрации 100 мкМ и выше три первых соединения выступали в роли ингибиторов. Активирующее действие PCP отсутствовало у обеих мутантных форм, а ингибирующее действие фруктозо-1-фосфата отсутствовало у Ec-Mt-PPазы. Эффекты остальных модуляторов изменялись только количественно. Полученные данные свидетельствуют о наличии у Mt-PPазы аллостерических центров регуляции, которые находятся в зонах контакта субъединиц или структурно связаны с ними.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пирофосфатаза, сайт-направленный мутагенез, аллостерическая регуляция, фруктозо-1-фосфат, L-малат.

DOI: 10.31857/S0320972520030082

Растворимые неорганические пирофосфатазы семейства I (РРазы) катализируют гидролиз неорганического пирофосфата с образованием двух молекул ортофосфата. РРазы присутствуют в большинстве живых организмов, где выполняют важную задачу — гидролизуют пирофосфат, смещают множество биохимических процессов, протекающих с его образованием, в сторону генерации продуктов [1]. Для РРаз различных ор-

ганизмов характерны не только сходство строения активного центра и механизма действия, но и высокая консервативность аминокислотных последовательностей и пространственных структур субъединиц [2]. Все РРазы активны только в присутствии ионов магния, которые активируют как фермент, так и субстрат. Всего для катализа необходимы три иона магния на один активный центр: один из них образует с пирофосфатом истинный субстрат (комплекс MgPP_i), а два других формируют на ферменте центр связывания субстрата и, кроме того, активируют нуклеофильную молекулу воды [3]. Ферментативная реакция протекает без образования ковалентного интермедиата, как прямая атака молекулы воды, активированной двумя ионами магния, на атом фосфора [4].

РРаза из *Mycobacterium tuberculosis* (Mt-РРаза) обладает рядом структурных и функциональных особенностей, отличающих ее от большинства известных РРаз, и поэтому входит в группу пер-

Принятые сокращения: РРаза — неорганическая пирофосфатаза; Mt-РРаза — неорганическая пирофосфатаза из *Mycobacterium tuberculosis*; Ec-РРаза — неорганическая пирофосфатаза из *Escherichia coli*; Ec-Mt-РРаза — химерный фермент, в котором полипептидная цепь Mt-РРазы продолжена на *N*-конце остатками 1–12 Ec-РРазы; R14Q-Mt-РРаза — мутантный вариант Mt-РРазы с заменой Arg14 на Gln; PCP — метиленбисфосфонат.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-352, 24.02.2020.

** Адресат для корреспонденции.

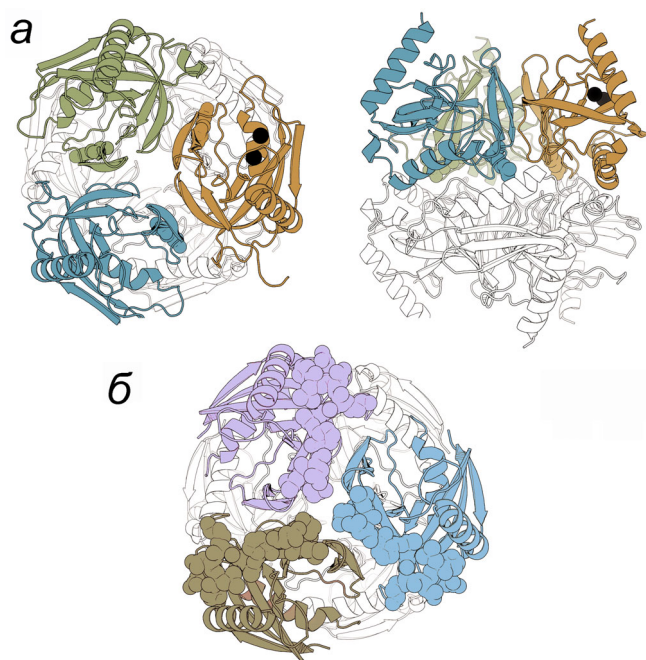


Рис. 1. Пространственные структуры гексамерных Mt-PPазы и Ec-PPазы (коды PDB: 4Z71 и 1OBW соответственно) [8, 9]. *a* — Два вида на Mt-PPазу — вдоль оси третьего порядка (слева) и перпендикулярно ей (справа). Субъединицы верхнего тримера окрашены в разные цвета, нижний тример не окрашен. *N*-концевые остатки каждой цепи указаны соответствующим цветом. Заменяемый остаток Arg14 приведен в виде шаростержневых моделей во всех субъединицах окрашенного тримера. Ионы магния, локализованные в активном центре, показаны в виде черных сфер. *б* — Вид вдоль оси третьего порядка на молекулу Ec-PPазы. Субъединицы верхнего тримера окрашены в разные цвета, нижний тример не окрашен. Остатки 1–12, отсутствующие в Mt-PPазе, показаны более насыщенным цветом в субъединицах верхнего тримера. Рисунок создан с помощью программы UCSF Chimera (UCSF Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, США) [10]. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

спективных мишеней для лечения туберкулеза животных и человека [5]. Кроме того, гибридные наноматериалы на основе иммобилизованной Mt-PPазы в качестве активного агента перспективны для лечения пирофосфатной артропатии человека [6]. Фермент представляет собой гексамер, образованный как димер тримеров (рис. 1, *a*). К структурным особенностям этого фермента относится отсутствие 12 аминокислотных остатков на *N*-конце полипептидной цепи по сравнению с PPазой *Escherichia coli* (Ec-PPазы) (рис. 1, *б*) и многих других представителей прокариотических PPаз и, как следствие, измененные межсубъединичные контакты. Кроме того, в активном центре Mt-PPазы присутствуют два остатка гистидина (в положениях 21 и 86) вместо обычных остатков аланина и лизина [7].

В настоящей работе с целью определения путей регуляции Mt-PPазы и поиска структурно-функциональных соотношений в молекуле фермента мы сконструировали мутантные варианты Mt-PPазы с модифицированными межсубъединичными контактами в областях, которые отличаются Mt-PPазу от других прокариотических PPаз. Мы определили влияние этих модификаций на каталитические свойства и взаимодействие Mt-PPазы с аналогом субстрата и тремя потенциальными аллостерическими регуляторами активности фермента в клетке. Полученная информация о путях регуляции Mt-PPазы может быть использована для конструирования специфических ингибиторов этого фермента.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение генетических конструкций. Генетическая конструкция Mt-PPазы/pUC-19 для экспрессии Mt-PPазы дикого типа без дополнительных вставок была получена нами ранее [11]. Мутацию Arg14Gln вводили двустадийной ПЦР с использованием праймеров №1 (прямого) и №2 (обратного) («Евроген», Россия). Последовательности праймеров приведены в табл. 1. Полученный фрагмент вырезали эндонуклеазами рестрикции («Thermo Fisher Scientific», США) по сайтам NdeI и BglII и лигировали в линейаризованный вектор pET-42a для экспрессии («Thermo Fisher Scientific», США).

Для присоединения фрагмента 1–12 Ec-PPазы (SLLNVPAGKDLP) к *N*-концу Mt-PPазы использовали описанные ранее плазмиды Mt-PPазы/pET-28a и NdeI-Ec-PPазы/pUC-18 [11]. Вторая плазида содержит ген пирофосфатазы из *E. coli* и сайт рестрикции эндонуклеазой NdeI на 5'-конце. В качестве праймеров на разных стадиях использовали три олигонуклеотида: №3 (кодирует аминокислотные остатки 9–13 Ec-PPазы и 1–5 Mt-PPазы), №4 (M13/pUC — «обратный» праймер) и №5 (для введения сайта

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных для оценки количества импортированных ДНК-субстратов

Название праймера	5'–3' последовательность праймеров
1	CCAAGGGCCAGCAGAACAATACGAG
2	CTCGTATTTGTTCTGCTGGCCCCTTGG
3	ATGGTCACGTCGAATTGTTCCGGCAGATCTTTA
4	GTTTTCCAGTCACGAC
5	GAGGAGAATTCGCGTTATCAG

рестрикции EcoRI на 3'-конец гена Mt-PPазы). Последовательности праймеров приведены в табл. 1. Первую полимеразную цепную реакцию проводили с праймерами №3 и №4 и плазмидой NdeI-Ec-PPаза/pUC-18 (получена нами ранее). Полученный фрагмент использовали с праймерами №4 и №5 во второй полимеразной цепной реакции с плазмидой Mt-PPаза/pET-28a (получена нами ранее). Полученный фрагмент ДНК гидролизовали рестриктазами NdeI и EcoRI и лигировали в плазмиду pET23a.

Получение и очистка белков. Вышеописанные генетические конструкции были экспрессированы в клетках *E. coli* BL21(DE3), и рекомбинантные белки были выделены с помощью гидрофобной хроматографии, как описано ранее для Mt-PPазы дикого типа [11]. Выход белков составил 20–30 мг/литр культуры. Чистота ферментов, определенная методом гель-электрофореза по Лэмбли [12], составила 99%. Масс-спектрометрическую идентификацию белков проводили с использованием масс-спектрометра типа MALDI TOF/TOF («Bruker Daltonics», США).

Полученные препараты хранили при 4 °C в виде суспензий в растворе сульфата аммония (90% насыщения). Непосредственно перед использованием ферменты растворяли в 50 мМ буфере Tris-HCl, pH 7,5, содержащем 5 мМ MgCl₂, и отделяли сульфат аммония гель-фильтрацией на колонке с Sephadex G-50 («GE Healthcare», США). Концентрацию белков определяли спектрофотометрически, используя следующие величины $A_{280}^{0.1\%}$, рассчитанные из аминокислотного состава с помощью программы ProtParam: для Mt-PPазы дикого типа и R14Q-Mt-PPазы — 1,04; для Ec-Mt-PPазы — 0,98. Теоретическая молекулярная масса субъединицы, рассчитанная с помощью программы ProtParam, составила: для Mt-PPазы дикого типа и R14Q-Mt-PPазы — 18,3 кДа, для Ec-Mt-PPазы — 19,5 кДа.

Определение скорости гидролиза пироглутамата. Каталитическую активность PPазы определяли по скорости образования продукта (фосфата) по описанной ранее методике, основанной на реакции фосфомолибдатного комплекса с малахитовым зеленым и цитратом натрия [13]. К 25 мкл 50 мМ буфера Tris-HCl, pH 7,5, содержащего, если не указано иначе, 5 мМ Mg²⁺ и 50 мкМ комплекс MgPP_i (общая концентрация PP_i — 74,5 мкМ), добавляли 0,5–1,5 мкл раствора PPазы (конечная концентрация белка 0,2–0,4 мкг/мл) и инкубировали смесь при 20 °C. Через фиксированные промежутки времени в интервале 15–60 с реакцию останавливали добавлением окрашивающего раствора: малахитовый зеленый («Sigma Aldrich», США), молибдат аммония («Реахим», Россия), соляная

кислота («СигмаТек», Россия), поливиниловый спирт («ЛенРеактив», Россия), вода деионизованная, через 15 с добавляли водный раствор цитрата натрия («Sigma Aldrich», США) и измеряли светопоглощение при 590 нм с использованием планшетного спектрофотометра Victor x5 («Perkin Elmer», США).

Определение зависимости стабильности Mt-PPазы от pH и температуры. Раствор фермента (0,1 мг/мл) в буфере с pH в диапазоне 2,6–11, содержащем 5 мМ Mg²⁺, инкубировали в течение суток при 4 °C, после чего измеряли остаточную активность, как описано выше. В качестве буферов для различных диапазонов pH использовали 50 мМ лимонную кислоту/50 мМ цитрат натрия (pH 2,6–4,6); 50 мМ MES (pH 5,6–6,6); 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5–8,6); 50 мМ CAPSO (pH 9,6) и CAPS 50 мМ (pH 10,6–11). Для характеристики термостойкости PPазы (0,1 мг/мл) инкубировали 10 мин при 25–75 °C в 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5 (измерено при 25 °C), содержащем 5 мМ Mg²⁺, и затем измеряли остаточную активность.

Аналитическое ультрацентрифугирование. Для седиментационного анализа использовали аналитическую ультрацентрифугу Spinco E («Beckman», США) со сканированием при 280 нм при скорости вращения 48000 об./мин. Перед седиментацией образцы, содержащие фермент, 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5 и 5 мМ MgCl₂, преинкубировали ночь при 4 °C.

Математическая обработка результатов и моделирование структуры. Кривые ингибирования ионами фтора и кальция, а также влияние метиленисфосфоната (PCP) описывали простой гиперболической функцией. Для описания колоколообразной зависимости активности Mt-PPазы от концентрации модулирующего соединения использовали схему.

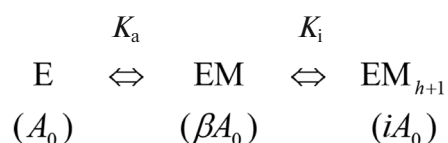


Схема. Активация и ингибирование активности PPазы при последовательном связывании ионов модулятора. М — модулятор (ион магния, PCP или аллостерический эффектор), K_a и K_i — кажущиеся константы диссоциации комплекса фермента с активирующим и ингибирующим ионом модулятора соответственно, A_0 — активность в отсутствие модулятора, β и i — коэффициенты активации и ингибирования соответственно. Для модуляции ионами магния $\beta = \infty$, $i = 0$, поскольку активность в отсутствие Mg²⁺ и при его бесконечной концентрации равна нулю. Параметры в скобках под формами фермента обозначают их активности. Максимальная активность соответствует комплексу EM

Определение скорости для схемы представлено уравнением (1), в котором A — измеряемая активность, h — эмпирический коэффициент (аналог коэффициента Хилла). Величина h меньше или равна числу ионов модулятора, связывание которых вызывает ингибирование и может иметь нецелые значения.

$$A = A_0(1 + \beta[M]/K_a + i[M]^{h+1}/K_a K_i^h) / (1 + [M]/K_a + [M]^{h+1}/K_a K_i^h). \quad (1)$$

Для описания колоколообразной рН-зависимости стабильности РРазы использовали уравнение (2), которое предполагает наличие основных и кислотных групп с pK_{a1} и pK_{a2} в количестве m и n соответственно:

$$A = A_{\max} / [1 + 10^{m(pK_{a1} - pH)} + 10^{n(pH - pK_{a2})}]. \quad (2)$$

Для определения температуры полуинактивации РРазы ($T_{1/2}$) из зависимости активности от температуры (T) преинкубации использовали уравнение (3), где a — эмпирический коэффициент.

$$A = A_{\max} / [1 + (T/T_{1/2})^a]. \quad (3)$$

Для аппроксимации данных методом нелинейной регрессии использовали программу SigmaPlot («Systat Software Inc», США). Коэффициент седиментации ($s_{20,w}$) рассчитывали из профиля седиментации с помощью программы SedFit [14]. Гомологическое моделирование проводили с помощью программы SWISS-MODEL со стандартными значениями параметров и структурой Ес-РРазы (PDB ID 1OBW) в качестве шаблона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор направлений мутагенеза. Мт-РРазы отличается от Ес-РРазы и большинства других РРаз семейства I отсутствием N -концевого фрагмента из 12 а.о. [7]. В Ес-РРазе в этот фрагмент (SLLNVPAGKDLР) входят несколько остатков, формирующих водородные связи и гидрофобные контакты между различными субъединицами внутри тримера (Ser1-Ser36, Leu2-Ala38) [11]. Вследствие отсутствия указанного фрагмента в Мт-РРазе открыта полость во внутритримерном интерфейсе, в которой могут связываться низкомолекулярные лиганды — потенциальные аллостерические эффекторы.

Для проверки этого предположения было решено сконструировать химерный белок Ес-Мт-

РРазу, в котором полипептидная цепь Мт-РРазы продолжена на N -конце остатками 1–12 Ес-РРазы. Методом гомологического моделирования было показано, что добавленный фрагмент может занимать то же положение, что и в Ес-РРазе (рис. 1, б), и затруднять связывание аллостерических эффекторов в полости внутритримерного интерфейса.

Остаток Arg14 экспонирован в межтримерную полость Мт-РРазы (рис. 1, а) и входит в положительно заряженный кластер Lys11-Arg14-Arg101, образованный остатками трех субъединиц. Сеть контактов Arg14 различной природы удерживает петлю Tyr31–Met36, участвующую в формировании межтримерного контакта. В Ес-РРазе расположенный в другом участке субъединицы аналогичный кластер остатков Lys112, Lys115 и Lys146 представляет собой аллостерический центр, связывающий активатор АТР и ингибитор фруктозо-1-фосфат [15, 16].

Получение и характеристика мутантных форм Мт-РРазы. Две мутантные формы Мт-РРазы, R14Q-Мт-РРазы и Ес-Мт-РРазы, были продуцированы в *E. coli*. Идентичность белков была подтверждена методом MALDI-масс-спектрометрии по массам полноразмерных белков и наборам пептидов после гидролиза белков трипсином (данные не приведены).

Четвертичная структура трех форм Мт-РРазы была определена методом скоростной седиментации (рис. 2). Во всех случаях основная масса белка представляла собой гексамерный белок (табл. 2). Во всех препаратах присутствовало также малое количество более тяжелой формы (предположительно додекамера).

Для мутантных форм Мт-РРазы были определены каталитические параметры гидролиза $MgPP_i$, максимальная активность и K_m , константы диссоциации комплексов с металлом-кофактором Mg^{2+} и ингибиторами Ca^{2+} и F^- , а также параметры рН и термостабильности гексамера (табл. 3). Параметр K_a (Mg^{2+}) в табл. 3 относится к одному из двух ионов Mg^{2+} , которые активируют фермент. Второй активирующий ион Mg^{2+} связывается гораздо прочнее, и поэтому не про-

Таблица 2. Коэффициенты седиментации ($s_{20,w}$) и предполагаемая олигомерная организация пирофосфатазы

Фермент	$s_{20,w}$, S	Олигомерная форма
Мт-РРазы	6,6	гексамер
R14Q-Мт-РРазы	7,4	гексамер
Ес-Мт-РРазы	7,8	гексамер
Ес-РРазы [17]	6,0	гексамер

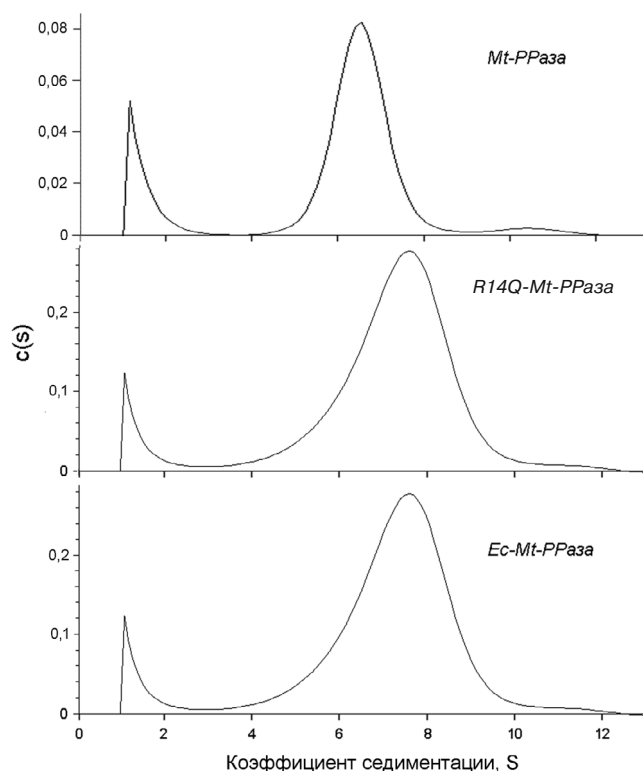


Рис. 2. Распределение величин коэффициента седиментации для трех форм Мт-РРазы при 20 °С. Концентрация белка во всех экспериментах — 0,6 мг/мл

является в использованном диапазоне концентраций Mg^{2+} . Как следует из полученных данных, мутации значительно «улучшали» каталитические характеристики Мт-РРазы — увеличивали максимальную активность (каталитическую константу) и уменьшали K_m , приближая ее по этим параметрам к Ес-РРазе. Кроме того, мутации снимали ингибирующий эффект металлофактора (Mg^{2+}) при его высоких концентрациях. С другой стороны, мутации снижали сродство к активирующему иону Mg^{2+} , а мутация R14Q

снижала термостойкость. Действие ингибиторов, ионов фтора и кальция, в большинстве случаев изменилось мало, кроме увеличения чувствительности химерного белка к ионам кальция.

Активация и ингибирование Мт-РРазы аналогом субстрата. Для РРаз семейства I характерно наличие аллостерических центров связывания эффекторов в зонах контакта субъединиц, которые структурно обособлены от активного центра [3]. Некоторые аналоги пирогосфата могут связываться как в активном центре, так и в аллостерических регуляторных центрах. Так, например в Ес-РРазе аллостерический регулятор АТР может гидролизаться в активном центре [15]. Свободная форма пирогосфата, связываясь в аллостерическом центре, активирует Ес-РРазу [19, 22]. Чтобы проверить наличие аллостерических центров связывания в Мт-РРазе и их взаимосвязь с областями олигомерных контактов, мы исследовали влияние негидролизующего аналога пирогосфата, РСР, на активность Мт-РРазы и ее мутантных вариантов Ес-Мт-РРазы и R14Q-Мт-РРазы с заменами в области контакта субъединиц.

Полученные данные (рис. 3, а) показывают резкое различие в поведении Мт-РРазы и Ес-РРазы. Если Ес-РРаз ингибировалась под действием РСР почти полностью, то Мт-РРаз активировалась этим аналогом пирогосфата. Мутантные формы Мт-РРазы, в отличие от нативного фермента, ингибировались под действием РСР, но снижение активности составило не более 40%.

Полученные зависимости были описаны упрощенной схемой, предполагающей связывание только активирующей или ингибирующей молекул РСР. Полученные в рамках этой схемы параметры (табл. 4) показывают, что сродство Мт-РРазы дикого типа к РСР на порядок ниже, чем у Ес-РРазы. У химерного белка, Ес-Мт-РРазы,

Таблица 3. Каталитические свойства вариантов Мт-РРазы в сравнении с Ес-РРазой

Параметр	Мт-РРаз	R14Q-Мт-РРаз	Ес-Мт-РРаз	Ес-РРаз
Максимальная активность, МЕ/мг	295 ± 7	646 ± 13	505 ± 10	754 ± 13 [7]
K_m , мкМ	6,0 ± 0,5	2,6 ± 0,3	2,9 ± 0,1	3,2 ± 0,3 [7]
K_a (Mg^{2+}), мкМ	140 ± 40	600 ± 30	360 ± 20	200 ± 40 [18]
K_i (Mg^{2+}), мМ	36 ± 4			16 ± 2 [19]
K_i (F^-), мкМ	660 ± 30	710 ± 40	500 ± 30	36 ± 0,2 [20]
K_i (Ca^{2+}), мкМ	310 ± 30	400 ± 22	160 ± 10	10 ± 1 [21]
$T_{1/2}$ инактивации, °С	60 ± 2	40 ± 1	57 ± 2	70 ± 3
pK_{a1} (рН-стабильность)	5,4 ± 0,2	4,5 ± 0,3	5,4 ± 0,02	6 ± 0,2 [7]
m	4,3 ± 1,5	4 ± 0,5	2,5 ± 0,2	6 [7]
pK_{a2} (рН-стабильность)	9,8 ± 0,2	8,7 ± 0,3	8,04 ± 0,06	> 8,5 [7]
n	4,3 ± 1,5	4 ± 0,5	2,5 ± 0,2	6 [7]

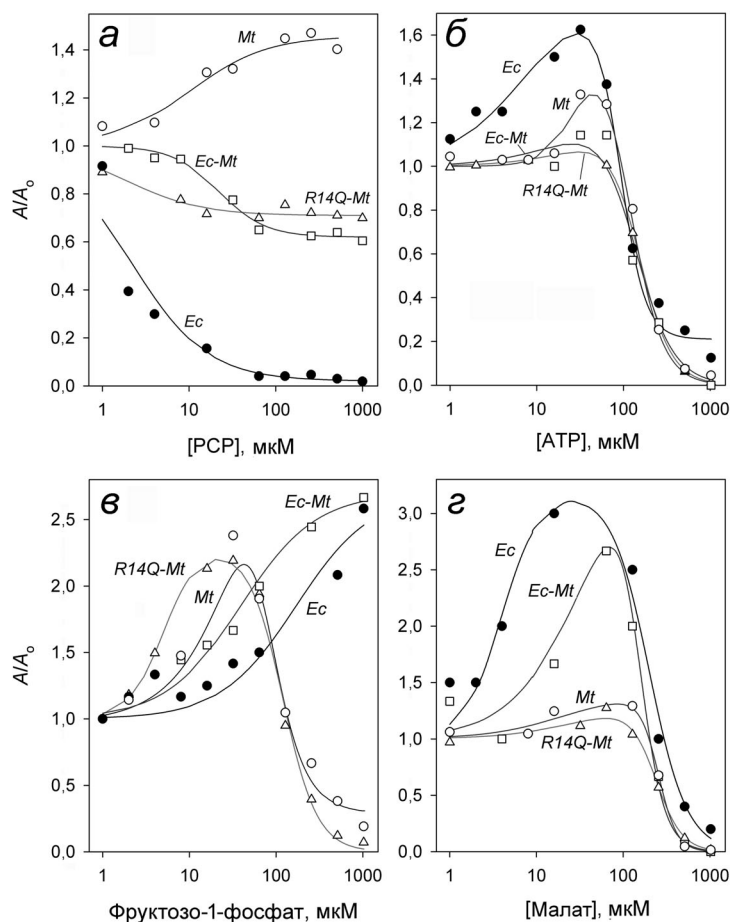


Рис. 3. Влияние PCP (а), АТР (б), фруктозо-1-фосфата (в) и L-малата (г) на активности Ec-PPазы и трех форм Mt-PPазы. Обозначения: Mt – Mt-PPаза, R14Q-Mt – Mt-PPаза с заменой R14Q, Ec-Mt – Mt-PPаза, соединенная с фрагментом Ec-PPазы, Ec – Ec-PPаза. Линиями показана наилучшая аппроксимация уравнением (1)

сродство к PCP практически не изменилось, в то время как у варианта R14Q-Mt-PPазы оно возросло на порядок.

Активация и ингибирование Mt-PPазы метаболитами. Влияние на активность Mt-PPазы было измерено также для АТР, фруктозо-1-фосфата и L-малата. Выбор этих соединений объясняется тем, что АТР и фруктозо-1-фосфат влияют на активность Ec-PPазы [15, 16], а связанный L-малат был обнаружен в кристаллической структуре PPазы из *Bartonella henselae* (PDB ID 3SW5). Все три соединения в малых концентрациях активировали, а в больших – ингибировали Mt-PPазу (рис. 3, б–г). Влияние АТР и L-малата было качественно похоже для всех исследованных белков, тогда как для фруктозо-1-фосфата отсутствовал эффект ингибирования в случае Ec-PPазы и Ec-Mt-PPазы. По профилю изменения активности под действием фруктозо-1-фосфата и L-малата химерная Ec-Mt-PPаза больше походит на Ec-PPазу, чем на Mt-PPазу, в то время как вариант R14Q-Mt-PPазы практически не отличается от Mt-PPазы дикого типа

(рис. 3, в). Рассчитанные в рамках схемы параметры активации и ингибирования приведены в табл. 4. Как видно, значения K_a для разных форм Mt-PPазы и разных модуляторов в большинстве случаев различаются не сильно. Резкое падение активности при высоких концентрациях АТР и L-малата указывает на то, что этот эффект обусловлен кооперативным связыванием нескольких молекул ингибитора. Величина h равна примерно двум для АТР и трем – для L-малата. В большинстве остальных случаев она не отличается достоверно от единицы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использованные в данной работе мутации так или иначе затрагивают олигомерные контакты в гексамерной Mt-PPазе, что позволяет объяснить большинство наблюдаемых эффектов. Повышенная активность мутантных форм может означать, что образование олигомерных контактов в гексамере природной Mt-PPазы по-

Таблица 4. Параметры схемы для взаимодействия Ес-РРазы и трех форм Мт-РРазы с РСР, АТР, фруктозо-1-фосфатом и L-малатом, полученные из рис. 3

Фермент	Активация		Ингибирование		h
	β	K_a , мкМ	i	K_i , мкМ	
Метиленбисфосфонат (PCP)					
Mt-PPаза R14Q-Mt-PPаза Ec-Mt-PPаза Ec-PPаза	1,46 ± 0,05	11 ± 3	0,71 ± 0,01 0,58 ± 0,02 <0,03	1,9 ± 0,2 22 ± 7 2,2 ± 0,6	~1 ~1 ~1
АТР					
Mt-PPаза R14Q-Mt-PPаза Ec-Mt-PPаза Ec-PPаза	1,60 ± 0,2 1,19 ± 0,03 1,25 ± 0,25 1,8 ± 0,1	30 ± 10 40 ± 10 24 ± 3 7 ± 3	<0,03 <0,03 <0,03 0,21 ± 0,05	120 ± 20 140 ± 40 130 ± 10 90 ± 10	2,3 ± 0,3 2,2 ± 0,1 1,9 ± 0,3 3 ± 1
Фруктозо-1-фосфат					
Mt-PPаза R14Q-Mt-PPаза Ec-Mt-PPаза Ec-PPаза	≥4 3,3 ± 0,4 2,5 ± 0,2 2,5 ± 0,3	≥60 14 ± 6 50 ± 10 280 ± 180	0,3 ± 0,2 <0,03	≤60 84 ± 14	1,9 ± 0,7 1,9 ± 0,2
L-Малат					
Mt-PPаза R14Q-Mt-PPаза Ec-Mt-PPаза Ec-PPаза	1,4 ± 0,1 1,30 ± 0,05 4 ± 1 3,2 ± 0,3	20 ± 10 30 ± 10 40 ± 10 4 ± 1	<0,03 <0,03 <0,03 <0,03	250 ± 10 240 ± 10 141 ± 12 230 ± 10	4 ± 1 2,8 ± 0,1 3 ± 0,7 2 ± 0,5

давляет ее потенциальную активность, т.е. вызывает своего рода «внутреннее ингибирование» («самоингибирование»). Поэтому нарушение олигомерных контактов произведенными структурными изменениями снимает внутреннее ингибирование и в определенном смысле восстанавливает каталитическую активность белка, увеличивая каталитическую константу и уменьшая K_m . При этом модификации зон контакта субъединиц не изменили олигомерное строение Мт-РРазы, а лишь сделали структуру молекулы белка менее компактной, о чем свидетельствуют данные седиментационного анализа. Так, величины $s_{20,w}$ для мутантных форм в табл. 2 значимо выше, чем для фермента дикого типа, даже при учете увеличенной на 8% массы Ес-Мт-РРазы. Кроме влияния на активность мутации уменьшили сродство фермента к ионам металла-кофактора и устранили ингибирование его избытком. Следовательно, и действие кофактора, который тоже связывается в активном центре, может зависеть от контактов субъединиц и компактности молекулы в целом.

Активация Мт-РРазы негидролизуемым аналогом субстрата, РСР, может означать, что он связывается не в активном центре. Положительная гетеротропная кооперативность действия активных центров представляется менее вероятным объяснением, поскольку субстрат взаимодействует с активными центрами не кооперативно [7, 11]. Наши данные позволяют предположить, что сайт связывания активирующей молекулы РСР расположен в межсубъединичных интерфейсах либо связан через них с активным центром, поскольку обе мутации устраняют активацию Мт-РРазы под действием РСР. Наблюдаемое в мутантных формах частичное ингибирование также трудно объяснить, если считать, что РСР связывается в активном центре. Более вероятно, что ингибирование возникает по мере заполнения аллостерических центров связывания.

В целом действие РСР на Мт-РРазу имеет принципиально иной характер, чем его действие на Ес-РРазу, которую он конкурентно ингибирует с K_i приблизительно равной K_m [22]. Отсюда следует важный практический вывод о

неперспективности конструирования селективных ингибиторов Mt-PPазы с помощью рационального дизайна на основе аналогов субстрата.

АТР, фруктозо-1-фосфат и L-малат являются важными для всех организмов метаболитами, поэтому их влияние на активность Mt-PPазы, наблюдаемое *in vitro*, может отражать их участие в регуляции PPаз *in vivo*. Константы диссоциации комплексов фермента с этими эффекторами лежат в диапазоне 10–300 мкМ, что позволяет использовать их в качестве лидерных соединений для создания высокоаффинных ингибиторов. Действие АТР и L-малата на Mt-PPазу и Ec-PPазу качественно похоже в том, что их низкие концентрации вызывают активацию, которая переходит в ингибирование при высоких концентрациях (рис. 3, б, г). Это свидетельствует о наличии нескольких центров их связывания в белке. Разнонаправленное действие на Mt-PPазу оказывает и фруктозо-1-фосфат, тогда как Ec-PPазу он только активирует. Ингибирующее действие фруктозо-1-фосфата на Mt-PPазу устраняется после присоединения к ней N-концевого фрагмента Ec-PPазы. Эта модификация Mt-PPазы делает ее похожей на Ec-PPазу и по влиянию РСР.

В совокупности полученные данные свидетельствуют о наличии в Mt-PPазе не менее одного, а возможно, двух или трех аллостерических центров связывания эффекторов. Активация всеми лигандами, а также неполное ингибирование под действием РСР не могут быть следствием их связывания в активном центре. Соответствующий аллостерический центр (условно названный «активирующим») может быть расположен в зоне межтримерных контактов субъединиц. Это следует из данных рентгеноструктурного анализа других гексамерных PPаз, в которых были обнаружены связанные L-малат и фосфат только в этой зоне (PDB ID 3SW5 и 3FQ3 соответственно), что означает, что соответствующий центр имеет наибольшее сродство к этим лигандам. Сродство «ингибирующего» центра к АТР, фруктозо-1-фосфату и L-малату значительно меньше, но связывание с ним характеризуется высокой кооперативностью. Наблюдаемые закономерности можно объяснить в рамках модели, согласно которой и активирую-

щие, и ингибирующие лиганды связываются в одном и том же аллостерическом центре, расположенном в межсубъединичном интерфейсе каждой субъединицы. Заполнение этого центра в одной субъединице вызывает активацию фермента, а его заполнение в других субъединицах вызывает ингибирование, что предполагает взаимозависимость субъединиц.

Альтернативное объяснение предполагает связывание эффекторов в двух или даже трех аллостерических центрах на субъединицу, один из которых активирующий, а другие — ингибирующие. Если ингибирующий центр один на субъединицу, то для объяснения кооперативности ингибирования следует допустить взаимовлияние ингибирующих центров разных субъединиц. Поскольку полость в межтримерном интерфейсе, вероятно, является активирующим центром, роль ингибирующего центра может выполнять полость, открытая в Mt-PPазе из-за отсутствия N-концевого фрагмента. В пользу этого говорит отсутствие ингибирования фруктозо-1-фосфатом Ec-Mt-PPазы, в чем она похожа на Ec-PPазу. В случае двух ингибирующих центров они могут быть независимыми. При этом один из ингибирующих центров может быть активным центром фермента. Возможность связывания в нем АТР следует из наличия АТР-азной активности у Mt-PPазы [11]. Экспериментально обоснованный выбор между всеми этими возможностями является целью наших дальнейших исследований.

Благодарности. Мы благодарим П. В. Калмыкова и Н. Н. Магретову за проведение скоростной седиментации, Н. Н. Воробьеву за предоставленные образцы Ec-PPазы и М. В. Серебрякову за проведение масс-спектрометрического анализа белков. MALDI-масс-спектрометр был доступен в рамках Программы развития МГУ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baykov, A.A., Cooperman, B.S., Goldman, A., and Lahti, R. (1999) *Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase*, in *Inorganic Polyphosphates*, Springer, pp. 127–150.
2. Cooperman, B.S., Baykov, A.A., and Lahti, R. (1992) Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase, *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 262–266.
3. Самыгина В.Р. (2016) Неорганические пирофосфатазы: структурная вариативность на службе функции, *Успехи химии*, **85**, 464–476.
4. Heikinheimo, P., Tuominen, V., Ahonen, A.-K., Teplyakov, A., Cooperman, B., Baykov, A., Lahti, R., and Goldman, A. (2001) Toward a quantum-mechanical description of metal-assisted phosphoryl transfer in pyrophosphatase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3121–3126.
5. Vijayan, M. (2005) Structural biology of mycobacterial proteins: the Bangalore effort, *Tuberculosis (Edinb)*, **85**, 357–366.

6. Rodina, E.V., Valueva, A.V., Yakovlev, R.Y., Vorobyeva, N.N., Kulakova, I.I., Lisichkin, G.V., and Leonidov, N.B. (2015) Immobilization of inorganic pyrophosphatase on nanodiamond particles retaining its high enzymatic activity, *Biointerphases*, **10**, 041005.
7. Tammenkoski, M., Benini, S., Magretova, N.N., Baykov, A.A., and Lahti, R. (2005) An unusual, His-dependent family I pyrophosphatase from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Biol. Chem.*, **280**, 41819–41826.
8. Pratt, A.C., Dewage, S.W., Pang, A.H., Biswas, T., Barnard-Britson, S., Cisneros, G.A., and Tsodikov, O.V. (2015) Structural and computational dissection of the catalytic mechanism of the inorganic pyrophosphatase from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Struct. Biol.*, **192**, 76–87.
9. Harutyunyan, E.H., Oganessyan, V.Y., Oganessyan, N.N., Avaeva, S.M., Nazarova, T.I., Vorobyeva, N.N., Kurilova, S.A., Huber, R., and Mather, T. (1997) Crystal structure of holo inorganic pyrophosphatase from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution. Mechanism of hydrolysis, *Biochemistry*, **36**, 7754–7760.
10. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605–1612.
11. Rodina, E.V., Vainonen, L.P., Vorobyeva, N.N., Kurilova, S.A., Sitnik, T.S., and Nazarova, T.I. (2008) Metal cofactors play a dual role in *Mycobacterium tuberculosis* inorganic pyrophosphatase, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 897–905.
12. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680.
13. Rowlands, M.G., Newbatt, Y.M., Prodromou, C., Pearl, L.H., Workman, P., and Aherne, W. (2004) High-throughput screening assay for inhibitors of heat-shock protein 90 ATPase activity, *Anal. Biochem.*, **327**, 176–183.
14. Schuck, P., Gillis, R.B., Besong, T.M., Almutairi, F., Adams, G.G., Rowe, A.J., and Harding, S.E. (2014) SEDFIT—MSTAR: molecular weight and molecular weight distribution analysis of polymers by sedimentation equilibrium in the ultracentrifuge, *Analyst*, **139**, 79–92.
15. Rodina, E.V., Vorobyeva, N.N., Kurilova, S.A., Sitnik, T.S., and Nazarova, T.I. (2007) ATP as effector of inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. The role of residue Lys112 in binding effectors, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 100–108.
16. Vorobyeva, N.N., Kurilova, S.A., Anashkin, V.A., and Rodina, E.V. (2017) Inhibition of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase by fructose-1-phosphate, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 953–956.
17. Вайнонен Ю.П., Курилова С.А., Аваева С.М. (2002) Гексамерная, тримерная, димерная и мономерная формы неорганической пирофосфатазы *Escherichia coli*, *Биоорганическая химия*, **28**, 426–433.
18. Avaeva, S.M., Rodina, E.V., Kurilova, S.A., Nazarova, T.I., Vorobyeva, N.N., Harutyunyan, E.H., and Oganessyan, V.Y. (1995) Mg²⁺ activation of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase, *FEBS Lett.*, **377**, 44–46.
19. Sitnik, T., Vainonen, J., Rodina, E., Nazarova, T., Kurilova, S., Vorobyeva, N., and Avaeva, S. (2003) Effector site in *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase is revealed upon mutation at the intertrimeric interface, *IUBMB Life*, **55**, 37–41.
20. Samygina, V.R., Moiseev, V.M., Rodina, E.V., Vorobyeva, N.N., Popov, A.N., Kurilova, S.A., Nazarova, T.I., Avaeva, S.M., and Bartunik, H.D. (2007) Reversible inhibition of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase by fluoride: trapped catalytic intermediates in cryo-crystallographic studies, *J. Mol. Biol.*, **366**, 1305–1317.
21. Avaeva, S.M., Vorobyeva, N.N., Kurilova, S.A., Nazarova, T.I., Polyakov, K.M., Rodina, E.V., and Samygina, V.R. (2000) Mechanism of Ca²⁺-induced inhibition of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase, *Biochemistry (Moscow)*, **65**, 373–387.
22. Vainonen, J.P., Vorobyeva, N.N., Rodina, E.V., Nazarova, T.I., Kurilova, S.A., Skoblov, J.S., and Avaeva, S.M. (2005) Metal-free PP_i activates hydrolysis of MgPP_i by an *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 69–78.

INFLUENCE OF STRUCTURE VARIATIONS IN THE INTERSUBUNIT CONTACTS ON ACTIVITY AND ALLOSTERIC REGULATION OF INORGANIC PYROPHOSPHATASE FROM *Mycobacterium tuberculosis**

R. S. Romanov^{1,2}, S. A. Kurilova^{1,2}, A. A. Baykov^{1,2}, and E. V. Rodina^{1,2**}

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

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119991 Moscow, Russia

Received December 26, 2019

Revised January 14, 2020

Accepted January 14, 2020

Hexameric inorganic pyrophosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* (Mt-PPase) has a number of structural and functional features that distinguish it from homologues, widely distributed in all lifeforms. In particular, it has unusual zones of intersubunit contacts, and the N-terminal region of its polypeptide chain is absent. In this work, we constructed two mutant forms of the enzyme (Ec-Mt-PPase and R14Q-Mt-PPase). In the first mutant, the missing part of the polypeptide chain is compensated by a fragment of PPase from *Escherichia coli* (Ec-PPase). In the second mutant, a single amino acid residue substitution was made in the contact interface of two trimers inside the hexamer. Both modifications significantly improved the catalytic properties of the enzyme and eliminated its inhibition by excess of the cofactor (Mg²⁺). Activation of Mt-PPase by small (~10 μM) concentrations of ATP, fructose-1-phosphate, L-malate, and a nonhydrolyzable analogue of the substrate – methylene bisphosphonate (PCP) – was found. At concentrations of 100 μM and above, the first three compounds acted as inhibitors. The activating effect of PCP was absent in both mutant forms, and the inhibitory effect of fructose-1-phosphate was absent in Ec-Mt-PPase. The effects of the other modulators varied among mutants only quantitatively. The data obtained indicate the presence of allosteric centers in Mt-PPase, which are located in the zones of intersubunit contacts or associated with them.

Keywords: pyrophosphatase, site-directed mutagenesis, allosteric regulation, fructose-1-phosphate, L-malate

УДК 571.175.722

ИНТЕРЛЕЙКИН-4 ВОССТАНАВЛИВАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ИНСУЛИНУ В ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНЫХ ОСТЕОБЛАСТАХ, ПОВЫШАЯ ЭКСПРЕССИЮ СУБСТРАТА РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНА 1

© 2020 Ж. Чао¹, Д. Ли¹, Ц. Юэ¹, Ц. Хуан¹, Ю. Коу¹,
Ц. Чжоу¹, Ю. Гао¹, Т. Хасэгава², Ц. Го¹, М. Ли^{1*}

¹ Department of Bone Metabolism, School of Stomatology Shandong University,
Shandong Provincial Key Laboratory of Oral Tissue Regeneration,
Jinan 250012, China; E-mail: liminqi@sdu.edu.cn

² Department of Developmental Biology of Hard Tissue,
Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University,
Sapporo 060-8586, Japan

Поступила в редакцию 14.10.2019

После доработки 30.11.2019

Принята к публикации 31.12.2019

Ожирение и латентные воспалительные процессы могут привести к возникновению резистентности к инсулину и развитию диабета 2-го типа (T2D – type 2 diabetes). В настоящей работе для изучения механизма восстановления чувствительности клеток к действию инсулина с помощью противовоспалительного интерлейкина-4 (IL-4 – interleukin-4) была создана модель инсулиновой резистентности с использованием остеобластов. Нами было показано, что IL-4 ингибирует пролиферацию клеток в зависимости от его концентрации и длительности воздействия. Устойчивость к действию инсулина в значительной степени понижала уровни фосфорилирования белков, выступающих в качестве субстратов инсулинового рецептора, а именно белков IRS1 (Tyr612), Akt (Ser473) и AS160 (Ser318). Добавление IL-4 в модель инсулиновой резистентности вызывало дозозависимую стимуляцию фосфорилирования белков IRS1, Akt и AS160. В концентрации 50 нг/мл IL-4 полностью восстанавливал процесс активации инсулинового каскада в резистентных к инсулину клетках. Кроме того, IL-4 способствовал повышению уровня экспрессии белка IRS1 в зависимости от продолжительности воздействия. Мы предполагаем, что IL-4 восстанавливает чувствительность остеобластов к действию инсулина путем повышения уровня экспрессии белка IRS1. Также нами было показано, что IL-4 способствует экспрессии остеопротегерина (OPG) в зависимости от продолжительности экспонирования. Этот эффект может играть важную роль в регуляции обмена энергии во всем организме.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ожирение, инсулиновая резистентность, интерлейкин-4, остеобласты.

DOI: 10.31857/S0320972520030094

Популярность системы быстрого питания (фастфуд) и продуктов быстрого приготовления и отсутствие физической нагрузки превратили ожирение в глобальную проблему здравоохранения. Ожирение увеличивает риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, скелетно-мышечных нарушений и некоторых типов рака. В частности, диабет 2-го типа (T2D – type 2 diabetes) тесным образом связан с ожирением [1]. Случаи возникновения T2D составляют ~90–95% всех заболеваний диабетом, и для больных диабетом 2-го типа в основном характерен фенотип инсулиновой резистентности [2].

Принятые сокращения: ALP – щелочная фосфатаза; IL-4 – интерлейкин-4; IR – инсулиновый рецептор; T2D – диабет 2-го типа; IRS1 – субстрат инсулинового рецептора 1; OPG – остеопротегерин; OCN – остеокальцин; PA – пальмитиновая кислота.

* Адресат для корреспонденции.

Эпидемиология воспалительных процессов при T2D, ассоциированных с ожирением, восходит к концу 50-х и 60-м годам прошлого столетия. Еще в 1876 г. Ebstein [3] пришел к заключению, что натриевая соль салициловой кислоты может привести к полной отмене симптомов диабета. Notamisliligil et al. [4] впервые показали, что противовоспалительный цитокин TNF-α может индуцировать устойчивость к действию инсулина. Резистентность к инсулину повышает уровень сахара в крови, приводя к возникновению T2D, при котором секреция инсулина не приводит к компенсации инсулиновой резистентности, ассоциированной с ожирением. Несмотря на растущую распространенность диабета во всем мире механизм резистентности к инсулину в патогенезе T2D изучен плохо. Значительно позже выхода работы Notamisliligil et al. другие исследователи, изучающие роль воспалительных про-

цессов в патогенезе инсулиновой резистентности, Hundal et al. [5] и Shoelson et al. [6], пересмотрели гипогликемическую функцию салициловой кислоты и подтвердили, что ее молекулярной мишенью является каскад I κ B-киназа- β (IKK β)/NF- κ B. Было показано, что высокие дозы салициловой кислоты могут повысить чувствительность к действию инсулина у больных с T2D, воздействуя на эту мишень.

Существование взаимных связей между воспалением и резистентностью к инсулину были продемонстрированы во многих клинических и экспериментальных исследованиях. Использование антагонистов рецепторов провоспалительных цитокинов (анакинра, этанерцепт) или неспецифических противовоспалительных лекарств (салициловая кислота) являются двумя наиболее широко применяемыми терапевтическими противовоспалительными стратегиями. Другие способы активации противовоспалительных рецепторов, такие как использование природного противовоспалительного цитокина интерлейкина-4 (IL-4), изучены в меньшей степени [7, 8]. Тем не менее Stafeev et al. [9] обнаружили, что IL-4 восстанавливает чувствительность к действию инсулина резистентных к инсулину адипоцитов через механизмы, которые не связаны с индуцированным адипогенезом или образованием *de novo* липидных отложений.

Инсулин, секретируемый островковыми бета-клетками, в основном действует на белую жировую ткань (WAT — white adipose tissue) и инсулиновые рецепторы (IR — insulin receptors) мышечных клеток и способствует усвоению глюкозы и, действуя в гепатоцитах, увеличивает синтез гликогена в печени. Инсулин играет важную роль в поддержании гомеостаза глюкозы во всем организме [10]. В то время как IR в основном экспрессируется в клетках жировой ткани, миоцитах и гепатоцитах, он также экспрессируется в других клетках, таких как остеобласты и остеокласты. Avnet et al. [11] провели измерения уровня экспрессии IR и других рецепторов в образцах, полученных у больных остеосаркомой. Полученные ими результаты указывали на то, что при остеосаркоме человека изоформа А инсулинового рецептора экспрессируется более интенсивно по сравнению с рецептором инсулиноподобного фактора роста I (IGFIR — Insulin-like growth factor receptor). Свободные жирные кислоты могут вызывать инсулиновую резистентность остеобластов, увеличивая степень убиквитинилирования IR, тем самым приводя к возникновению метаболических нарушений. Кроме того, костная ткань может рассматриваться как эндокринный

орган, регулирующий метаболизм глюкозы через секрецию остеокальцина (OCN — osteocalcin) и таким образом оказывающий влияние на системное откладывание жира и уровень сахара крови [10, 12, 13].

Поэтому в настоящей работе мы ставили целью создать остеогенную модель инсулиновой резистентности, изучить восстановление чувствительности остеобластов к действию инсулина с помощью IL-4 и выявить механизмы этого процесса. Нами также было изучено влияние IL-4 на уровень экспрессии белков остеопротегерина (OPG) и OCN в остеобластах с различной степенью дифференцировки с целью разработки новых подходов для изучения влияния IL-4 на системный обмен энергии *in vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы и антитела. В работе использовали следующие реактивы: IL-4, антитела против beta-актина («Proteintech», США); препарат инсулина, антитела против белка Akt (ab32505), Akt с фосфорилированным остатком Ser473 (ab192623), антитела против белка AS160 с фосфорилированным остатком Ser318 (ab189890), антитела против белка OPG (ab9986) и против белка OCN (ab93876) («Abcam», Великобритания); пальмитиновая кислота (PA — palmitic acid) была приобретена у Xian Kunchuang. Наборы ALP, используемые для определения активности щелочной фосфатазы (ALP), были приобретены в Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute. Процедуру иммуноблоттинга проводили с использованием первичных антител против субстрата инсулинового рецептора 1 (IRS1) из CST (#3407); против белка IRS1 с фосфорилированным остатком Tyr612 (GTX24868; «GeneTex, Inc.», США); против белка AS160 (AF2317; Affinity).

Клетки. Клетки линии MG-63 остеосаркомы человека были получены от Банка Клеток Китайской Академии Наук (Шанхай, Китай). Клетки культивировали в культуральной среде DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки («Gibco», США), 1% неэссенциальных аминокислот (NEAA — non-essential amino acid) и 1% пенициллина-стрептомицина при стандартных условиях культивирования (37 °C, 95% увлажненная атмосфера и 5% CO₂). Каждые 3 дня производили смену культуральной среды.

Дифференцировка остеогенных клеток. Клетки линии MG-63 рассевали при плотности ~3000 клеток/см² и выдерживали в инкубаторе

при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через 48 ч стандартную среду заменяли на среду, способствующую остеогенезу, которая содержала среду DMEM/F12, 10% фетальной бычьей сыворотки (FCS), 50 мкг/мл 2Р-аскорбиновой кислоты, 10 мМ β-глицерофосфата натрия, 100 нМ дексаметазона, 1% неэссенциальных аминокислот и 1% смеси пенициллина и стрептомицина. Каждые 3 дня производили смену культуральной среды.

Окрашивание ализариновым красным и количественное определение активности ALP. Остеобласты линии MG-63 рассеивали в 6-луночные планшеты при плотности ~3000 клеток/см². Затем клетки обрабатывали реагентом, вызывающим их дифференцировку, и отбирали для проведения анализа через 0, 4, 7 и 14 дней. Для определения минерализации остеобластов использовали окраску ализариновым красным. Активность ALP измеряли с помощью набора для обнаружения флуоресценции в соответствии с протоколом производителя.

Анализ жизнеспособности клеток. Для определения влияния различных концентраций IL-4 на пролиферацию клеток MG-63 использовали метод определения выживаемости клеток. Клетки инкубировали в 96-луночных планшетах в 100 мкл культуральной среды в течение 24 ч при плотности клеток 5×10^3 клеток/ячейка. Затем клетки обрабатывали различными концентрациями IL-4 (0; 0,1; 1; 10; 50 и 100 нг/мл, при трех повторях для каждого образца). Через 12, 24 и 48 ч определяли выживаемость клеток с использованием набора Cell Counting Kit-8 assay («MedChemExpress», Китай) и рассчитывали значения для различных экспериментальных групп.

Индукцированная липидами модель инсулиновой резистентности. В модели богатого жирами пищевого рациона в качестве классического индуктора инсулиновой резистентности был использован конъюгат пальмитиновой кислоты и бычьего сывороточного альбумина (BSA — bovine serum albumin). В предыдущих работах PA и клетки MG-63 уже использовали для создания модели инсулиновой резистентности [9, 14]. Зрелые остеобласты инкубировали в течение 24 ч в не содержащей фетальную сыворотку среде DMEM/F12 (1% неэссенциальных аминокислот, 1% пенициллин-стрептомицин). Затем добавляли раствор PA до достижения низкого, стандартного и высокого значения ее концентрации (100, 200 и 500 мкМ PA соответственно). Клетки культивировали в течение 48 ч в той же среде и затем добавляли 10 нМ инсулина (ab123768) и инкубировали в течение 20 мин [13].

Обработка IL-4 и инсулином. IL-4 в низкой, стандартной и высокой концентрациях (10, 50 и 100 нг/мл соответственно) добавляли в индуцированную липидом модель инсулиновой резистентности в течение 24 ч. Затем чтобы оценить инсулин-зависимую передачу сигнала, клетки обрабатывали 10 нМ инсулина (ab123768) в течение 20 мин. На основе полученных результатов была определена оптимальная концентрация IL-4 (50 нг/мл). IL-4 в концентрации 50 нг/мл добавляли в среду дифференцировки на 0, 7 и 14 день, чтобы исследовать, восстанавливает ли IL-4 временную зависимость чувствительности к инсулину.

Экстракция белков и вестерн-блоттинг. Клетки четыре раза промывали в ледяном фосфатном буфере (PBS) и лизировали во льду в буфере RIPA (Biotium Institute of Biotechnology, Пекин, Китай), содержащем смесь ингибиторов протеаз («CoWin BioSciences», США) и смесь ингибиторов фосфатаз («CoWin BioSciences», США) в соотношении 98 : 1 : 1. Полученные лизаты клеток центрифугировали в течение 15 мин при 16 000 об./мин, и собранные супернатанты объединяли. Концентрацию белка в белковых экстрактах определяли с использованием наборов для определения белка с BCA (Bicinchoninic acid, «Beyotime», Китай). Белки разделяли с помощью гель-электрофореза в 6–12%-м полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-PAGE), и разделенные белки переносили из геля на поливинилиденфлюоридные мембраны (PVDF — polyvinylidene fluoride). Мембраны подвергали фиксации в течение по крайней мере 1 ч в 5%-м обезжиренном молоке в TBS (Tris-buffered saline), содержащем 0,1% (v/v) Tween 20 (TBST). Затем мембраны инкубировали в течение ночи при 4 °C с разведенными препаратами первых антител (1 : (500–3000)) и потом со вторыми антителами при комнатной температуре в течение 1 ч. Наконец зону иммунной реакции измеряли, используя ECL систему детекции («Smart Chemi 420», Китай). Каждый эксперимент повторяли не менее трех раз.

Статистическая обработка полученных результатов. Все полученные данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Статистический анализ был проведен с использованием программы Graphpad prism 7 software (Сан-Диего, Калифорния, США). Различия между экспериментальными и контрольными группами были оценены с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия между экспериментальными группами были рассчитаны с помощью метода двухфакторного дисперсионного анализа вариаций (ANOVA). Значение *p* < 0,05 считали статистически достоверным.

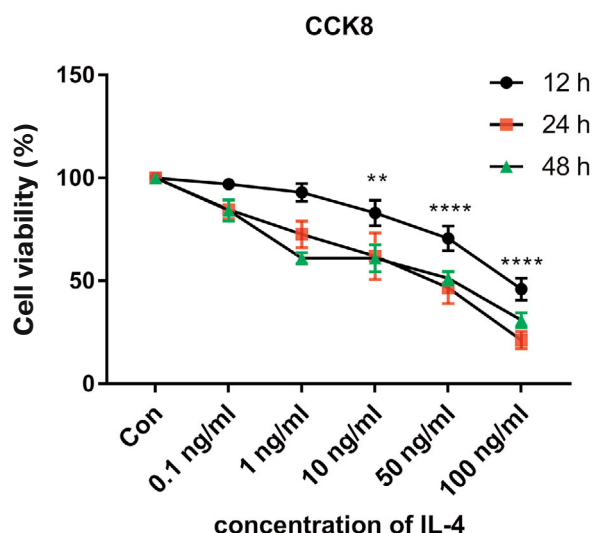


Рис. 1. Выживаемость клеток, определяемая с помощью метода с использованием ССК8 ($n = 3$). Относительное число клеток — это соотношение значений оптической плотности (OD), определенное при анализе экспериментальной и контрольной групп. Клетки MG-63 обрабатывали указанной дозой IL-4 (0; 0,1; 1; 10; 50 и 100 нг/мл) в течение различного времени (12, 24 и 48 ч). Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием метода двухфакторного дисперсионного анализа вариаций (ANOVA). (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, 12-часовые группы в сравнении с контрольной группой). С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

IL-4 ингибирует пролиферацию клеток MG-63 в зависимости от дозы и продолжительности действия. Различные концентрации IL-4 оказывали действие на клетки MG-63 на протяжении 12, 24 и 48 ч соответственно и в различной степени ингибировали пролиферацию клеток (рис. 1). Более выраженный ингибирующий эффект наблюдали в случае более высоких концентраций IL-4. Так, 100 нг/мл IL-4 в течение одного дня снижали выживаемость клеток на ~50%, в то время как IL-4 в концентрации 0,1 нг/мл проявлял незначительный ингибирующий эффект. Также было обнаружено, что ингибирование усиливается с увеличением времени действия цитокина. Например, ингибирующий эффект различных концентраций IL-4, определяемый через 24 ч и 48 ч, был значительно сильнее, чем через 12 ч (1 нг/мл $p < 0,01$, $p < 0,0001$; 10 нг/мл $p < 0,01$, $p < 0,01$; 50 нг/мл $p < 0,001$, $p < 0,01$; 100 нг/мл $p < 0,001$, недостоверный результат). При концентрации 1 нг/мл ингибирующий эффект через 48 ч был сильнее, чем через 24 ч, хотя подобное не наблюдали при концентрациях, равных 10, 50 и 100 нг/мл.

Модель индукции остеогенеза была успешно создана. На основании результатов окрашивания красителем ализариновым красным (Alizarin Red S) было выяснено, что через 7 дней

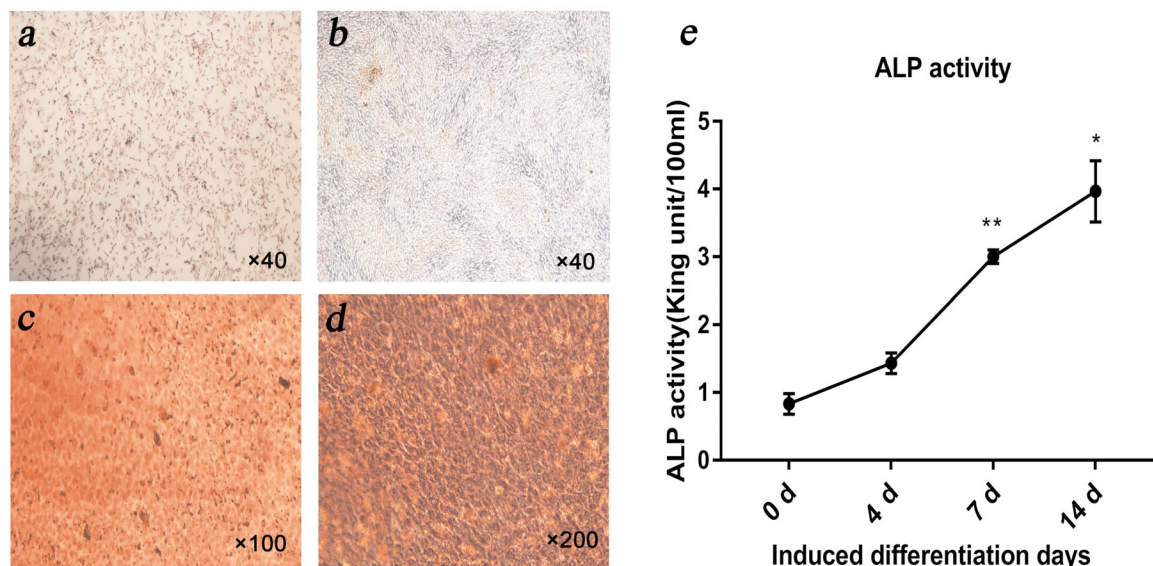


Рис. 2. Окрашивание ализариновым красным и определение активности ALP. *a* — Окрашивание ализариновым красным в самом начале индукции остеогенеза (0 дней). *b* — Окрашивание образцов ализариновым красным через 7 дней после начала остеогенной индукции. *c* и *d* — Окрашивание образцов ализариновым красным через 7 дней после начала индукции, наблюдаемое при световой микроскопии при различном увеличении. *e* — Определение активности ALP в клетках после различной продолжительности индукции. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ в сравнении с контрольной группой). С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

после индукции процесса минерализации клетки MG-63 были частично окрашены в красный цвет и частично темный с небольшим числом минерализованных узелков. Через 14 дней после индукции процесса минерализации наблюдали обширное окрашивание в красный цвет, и локальные пятна были сильно окрашены. При этом плотность минерализованных узелков была значительно выше, чем у образцов, подвергшихся индукции в течение 7 дней (рис. 2, *a–d*).

Результаты определения активности щелочной фосфатазы продемонстрировали ту же тенденцию, что и результаты окрашивания ализариновым красным. При этом не было выявлено статистически значимого повышения активности ALP на 4-й день. Активность ALP была зна-

чительно повышена на 7-й день после индукции дифференцировки ($p < 0,01$), и это повышение было выражено еще в большей степени на 14-й день процесса дифференцировки ($p < 0,05$) (рис. 2, *e*). С увеличением продолжительности индукции количество остеобластов, окрашенных ализариновым красным, количество кальциевых узелков и активность ALP также повышались. Таким образом, модель индукции остеогенеза оказалась успешной.

IL-4 полностью восстанавливает процесс активации инсулинового каскада в клетках резистентных к инсулин. Инсулиновая резистентность характеризуется инсулин-стимулируемым фосфорилированием остатка серина в IRS1 и нарушением инсулин-зависимой пере-

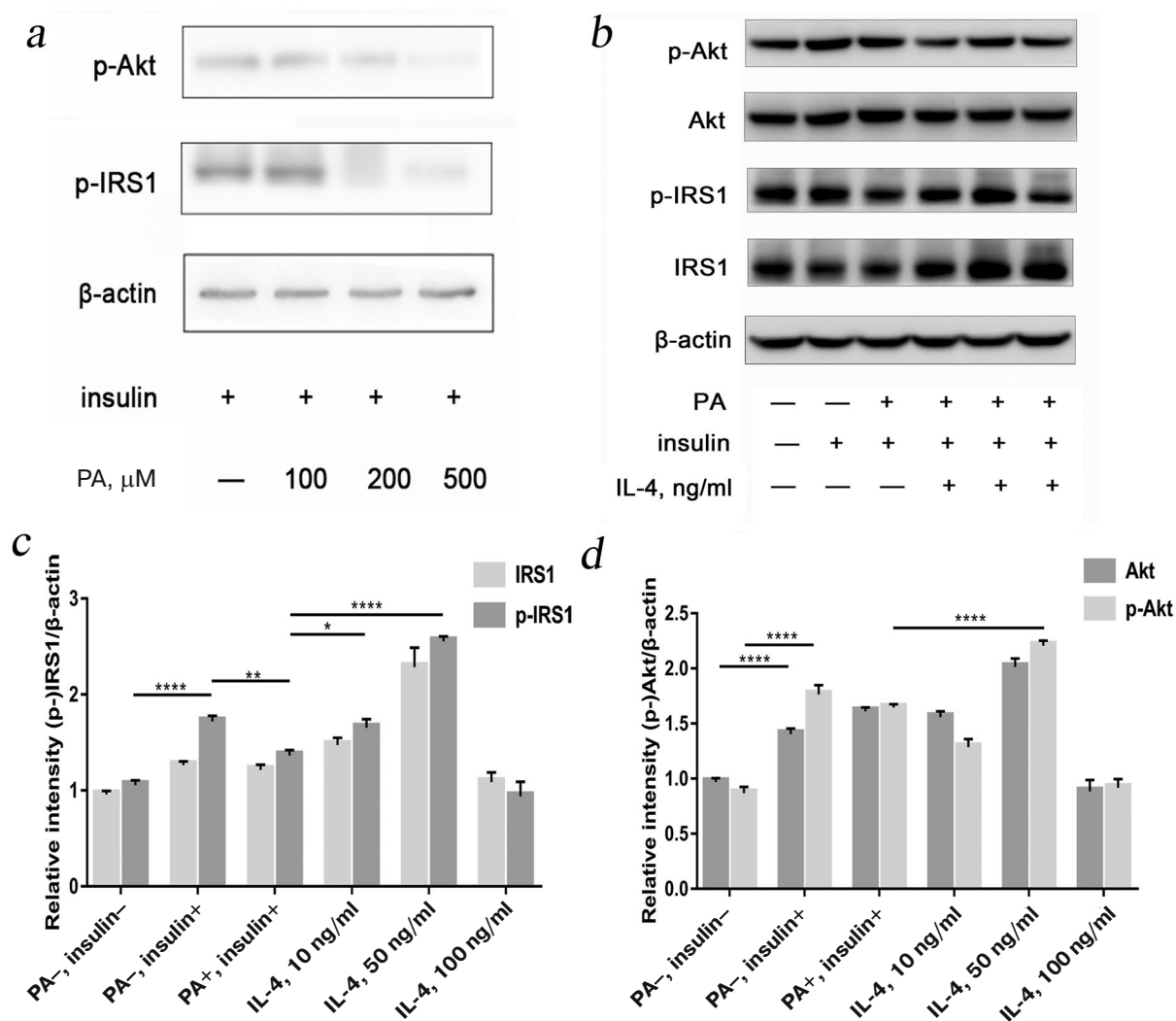


Рис. 3. Обработка ПА снижала уровень инсулин-зависимой передачи сигнала. IL-4 полностью восстанавливал процесс активации инсулинового каскада в инсулинорезистентных клетках. *a* — Экспрессию белков инсулин-зависимого сигнального пути оценивали с помощью метода вестерн-блоттинга. Добавление 200 мкМ и 500 мкМ пальмитиновой кислоты эффективно нарушали активность инсулин-зависимого сигнального пути ($n = 3$). *b–d* — С помощью метода вестерн-блоттинга показана экспрессия IRS1, p-IRS1(Tyr612), Akt и p-Akt (Ser473) в различных группах. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

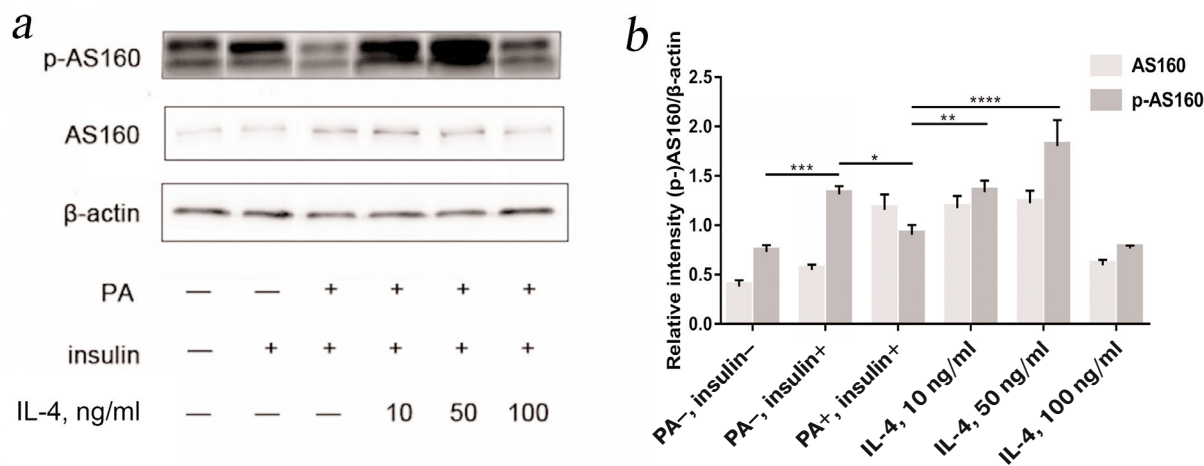


Рис. 4. *a* и *b* — Клетки были обработаны 200 мкМ РА, 10 нМ инсулина и различными концентрациями IL-4 в соответствии с группами, описанными выше. Для определения уровня экспрессии AS160 и p-AS160(Ser318) использовали метод вестерн-блоттинга. В качестве контроля использовали β -актин. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

дачи сигнала. Стимуляция свободными жирными кислотами может привести к возникновению инсулиновой резистентности. Так, добавляли РА в различных концентрациях (0, 100, 200 и 500 мкМ) в течение двух дней после 14 дней индукции остеогенеза и дифференцировки. Было показано, что 200 мкМ и 500 мкМ РА могут эффективно нарушить активность инсулин-зависимого сигнального пути ($p < 0,01$, $p < 0,01$) (рис. 3, *a*). В результате для создания модели инсулиновой резистентности была выбрана концентрация 200 мкМ РА, которую далее использовали.

Сначала нами было изучено влияние IL-4 на субстрат инсулинового рецептора в РА-индуцированной модели инсулиновой резистентности. Для обнаружения сайтов фосфорилирования IRS1 и фосфорилирования остатка тирозина Tyr612 был использован метод иммуноокрашивания. На рис. 3, *b* показано, что в необработанных клетках, инсулин повышал уровни фосфорилирования как IRS1, так и остатка тирозина Tyr612 ($p < 0,05$, $p < 0,0001$). Обработка пальмитиновой кислотой снижала уровень фосфорилирования IRS1 Tyr612 ($p < 0,01$). Добавление 10 нг/мл IL-4 приводило к восстановлению уровня фосфорилирования IRS1 Tyr612 ($p < 0,05$), а добавление 50 нг/мл IL-4 вызывало значительное усиление фосфорилирования Tyr612 в инсулин-индуцированном IRS1 ($p < 0,0001$) (рис. 3, *c*). Однако повышение концентрации IL-4 до 100 нг/мл приводило к ослаблению стимуляции инсулин-индуцированного фосфорилирования остатка Tyr612, приводя к противоположному эффекту.

Далее нами было изучено влияние IL-4 на фосфорилирование Akt и его остатка Ser473. Инсулин-стимулируемое фосфорилирование

остатка Ser473 является одним из условий для активации инсулин-зависимого сигнального пути. Нами было показано, что инсулин усиливает фосфорилирование Akt и Akt Ser473 ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$). Напротив, не было выявлено статистически достоверного влияния РА на уровни экспрессии Akt и его фосфорилированной формы. IL-4 (10 и 100 нг/мл) ингибировал в различной степени фосфорилирование Akt Ser473 ($p < 0,01$, $p < 0,001$), в то время как 50 нг/мл IL-4 достоверно повышали уровень фосфорилирования Akt Ser473 ($p < 0,0001$) (рис. 3, *d*). В целом картина влияния различных концентраций IL-4 на Akt была сходна с его влиянием на Akt Ser473, и степень фосфорилирования оставалась без изменений.

Фосфорилирование белком Akt белка AS160 приводит к активации процесса транслокации транспортера глюкозы 4-го типа (GLUT4) к клеточной мембране, способствуя транспорту глюкозы в клетки, и этот процесс является ключевым фактором активации инсулин-зависимого сигнального пути. Как показано на рис. 3, *b*, в необработанных клетках инсулин повышал уровень фосфорилированного остатка Ser318 в AS160 ($p < 0,001$), в то время как обработка конъюгатом РА-BSA приводила к снижению уровня фосфорилированного остатка Ser318 в AS160 ($p < 0,05$). Как показано на рис. 4, уровень фосфорилирования AS160 Ser318 восстанавливался при добавлении 10 или 50 нг/мл IL-4, и при этом наблюдали статистически достоверные различия ($p < 0,01$, $p < 0,0001$). Однако при добавлении 100 нг/мл IL-4 его влияние на уровень фосфорилирования AS160 не было статистически достоверным.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что РА обладает выраженным индуцирующим влиянием на экспрессию инсулиновой резистентности в остеобластах, и что активация воспалительного ответа представляет собой важный механизм противодействия липидной перегрузке, который приводит к возникновению инсулиновой резистентности. Различные концентрации IL-4 оказывали различное влияние на уровень фосфорилирования IRS1 Tyr612, Akt Ser473 и AS160 Ser318. При сравнении различных концентраций цитокина, его концентрация (50 нг/мл) проявляла наиболее сильный эффект в плане восстановления активности классического инсулин-зависимого сигнального пути, в то же время 100 нг/мл IL-4 приводили к противоположному эффекту.

IL-4 усиливает экспрессию IRS1 с зависящим от времени эффектом. Белки-субстраты инсулинового рецептора (IRS) являются важными компонентами инсулин-зависимой передачи сигнала.

Все эти белки представляют собой скаффолды, задействованные в дальнейшей передаче сигнала путем сборки и кластеризации специфических сигнальных комплексов через доменные взаимодействия Src-гомологии (SH2) [15]. Существует шесть изоформ белка IRS, из которых IRS1 является наиболее распространенным, он широко экспрессируется. Чтобы изучить влияние IL-4 на экспрессию IRS1 в клетках MG-63, была осуществлена остеогенная дифференцировка в присутствии 50 нг/мл IL-4 или в его отсутствии. На 0-й, 7-й и 14-й дни из клеток экстрагировали белки и определяли уровень экспрессии IRS с помощью метода иммуноблоттинга (рис. 5, *a*).

На рис. 5, *b* показано, что уровень экспрессии IRS1 был повышен как в присутствии IL-4, так и без него, при этом наблюдали статистически достоверные различия. IL-4 повышал экспрессию IRS1 на различных стадиях процесса дифференцировки клеток. Добавление IL-4

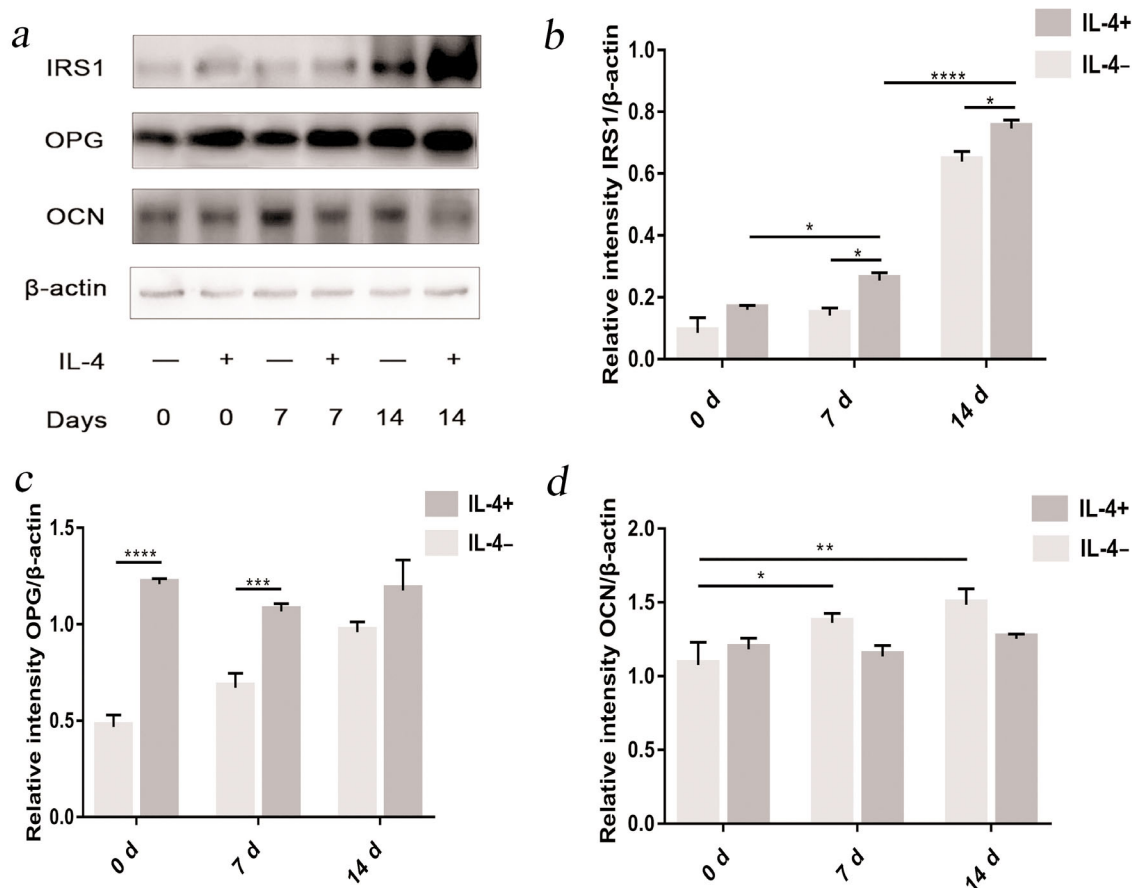


Рис. 5. Влияние 50 нг/мл IL-4 на уровни экспрессии IRS1, OPG и OCN в остеобластах после различной продолжительности остеогенной индукции (0, 7 и 14 дней). *a* – Для определения уровня экспрессии белков IRS1, OPG и OCN использовали метод вестерн-блоттинга ($n = 3$). *b* – Экспрессию белка IRS1 анализировали с помощью метода вестерн-блоттинга ($n = 3$). *c* – Уровень экспрессии белка OPG определяли с помощью метода вестерн-блоттинга ($n = 3$). *d* – Уровень экспрессии белка OCN определяли с помощью метода вестерн-блоттинга ($n = 3$). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

на 7-й и 14-й дни индукции значительно усиливало экспрессию IRS1 ($p < 0,05$). В то же время не было выявлено статистических различий с образцами, взятыми сразу в начале эксперимента (0-й день). Кроме того, было обнаружено, что экспрессия IRS1 повышалась по мере усиления дифференцировки. Было высказано предположение, что эффект IL-4 имеет отношение к стадии дифференцировки клеток и что восстановление чувствительности к инсулину резистентных к нему остеобластов под влиянием IL-4 обусловлено повышением экспрессии IRS1 (по крайней мере, при концентрации IL-4 50 нг/мл).

IL-4 влияет на зависящее от времени увеличение экспрессии OPG и не действует на экспрессию OCN. Остеопротегерин, индуцируемый инсулин-зависимым сигнальным путем, может способствовать дифференцировке остеокластов и затем реабсорбироваться в зазор между костями и снижать значение pH. Это приводит к декарбонизации остеокальцина, что способствует секреции инсулина поджелудочной железой, а также приносит пользу печени, мышцам и другим органам и влияет на системный метаболизм глюкозы [13]. Белки OPG и OCN играют основную роль в общем метаболизме глюкозы. Поэтому нами сначала было изучено влияние IL-4 на экспрессию белков OPG и OCN в остеобластах. Результаты этого исследования также позволили сделать предположение, что IL-4 регулирует системный метаболизм глюкозы, оказывая влияние на костную ткань, что открывает новое направление для будущих исследований.

На рис. 5, с показано, что экспрессия белка OPG в группе с IL-4 повышается со временем по мере усиления дифференцировки клеток с наблюдаемыми статистически достоверными различиями между группами от 0 до 14 дней дифференцировки клеток ($p < 0,0001$). Хотя добавление IL-4 приводило к повышению уровня экспрессии OPG, этот эффект не зависел от времени. Было показано, что в 0-й и 7-й день индукции в группе с добавленным IL-4 уровень экспрессии был значительно повышен по сравнению с соответствующей IL-4-группой ($p < 0,0001$, $p < 0,001$). Уровень экспрессии белка OPG повышался на 14-й день, однако этот эффект не был статистически значимым.

Экспрессия белка OCN повышалась в группе с IL-4 по мере увеличения количества дней индукции (7 дней — $p < 0,05$, 14 дней — $p < 0,01$, в сравнении с днем 0 соответственно). Полученные результаты показывают, что добавление IL-4, по-видимому, оказывает слабый ингибирующий эффект в отношении OCN, и этот эффект не является статистически значимым и нет корреля-

ции со временем воздействия. Таким образом, экспрессия белков OPG и OCN повышается по мере увеличения степени дифференцировки клеток. IL-4 может повышать уровень экспрессии OPG в остеобластах и не оказывает значимого влияния на экспрессию белка OCN.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Инсулин в основном действует на жировые клетки, клетки скелетных мышц и клетки печени. Были проведены исследования, посвященные изучению механизмов, с помощью которых воспалительные процессы, вызванные ожирением, влияют на инсулиновый путь в адипоцитах, а именно на накопление триглицеридов, цитопатический эффект, окислительный стресс, нарушения микроциркуляции, вызванные гипоксией, и снижение уровня снабжения клеток кислородом, приводящее к фосфорилированию или нарушению функционирования белков IRS. Действительно, стресс-активируемые киназы (ERK, JNK, AMPK), киназа IKK и нижележащие киназы Akt, aPKC и mTOR вносят вклад в фосфорилирование серина/треонина IRS. Ингибирование при фосфорилировании остатков серина может быть достигнуто различными способами, такими как отделение IRS от IR, превращение IRS в ингибитор активности тирозинкиназы, увеличение уровня деградации IRS и содействие отделению адапторного белка [16–19]. Wei et al. [13] на основе использования обогащенной жирами пищи создали модель инсулиновой резистентности у крыс и обнаружили, что в результате употребления такой пищи в клетках костной ткани также может возникнуть инсулиновая резистентность. Было предположено, что насыщенные жирные кислоты повышают уровень экспрессии Smurf1 и усиливают smurf1-опосредованное убиквитинилирование инсулинового рецептора, внося вклад в развитие инсулиновой резистентности остеобластов. К настоящему моменту большинство работ было сосредоточено на изучении ингибиторов противовоспалительных цитокинов и на противовоспалительных лекарствах, таких как салицилаты. В то же время только ограниченное число работ было посвящено изучению противовоспалительных лекарств, как возможных мишеней для терапевтического вмешательства. В частности, Stafiev et al. показали, что IL-4 восстанавливает чувствительность к действию инсулина в резистентных к нему индуцированных липидами адипоцитах [9]. IL-4 является противовоспалительным фактором, который непосредственно активирует факторы транскрипции

STAT6, и было предположено, что IL-4 может замедлять процессы воспаления и восстанавливать чувствительность к инсулину в инсулино-резистентных остеобластах.

Снижение активности остеобластов и нарушение дифференцировки может привести к нарушению процесса формирования костей. Это может регулироваться различными цитокинами и факторами роста, присутствующими в костной ткани. Интерлейкин-4 регулирует активность различных лимфоцитов, гематопоетических и мезенхимных клеток, однако его влияние на клетки костной ткани было недостаточно изучено. Ura et al. [20] показали, что IL-4 и IL-13 дозозависимо индуцируют клеточную пролиферацию. Однако в других работах было показано, что IL-4 ингибирует пролиферацию остеобластоподобных клеток MG-63 человека [21]. Riancho et al. [22] сообщили, что mIL-4 не оказывает заметного влияния на пролиферацию клеток MC3T3-E1. В наших экспериментах было показано, что IL-4 ингибирует активность клеток MG-63, и также была подтверждена зависимость этого эффекта от дозы и продолжительности воздействия. Расхождения между результатами, полученными Riancho et al., и нашими могут быть объяснены различиями в методологических подходах. Также следует учесть, что были использованы различные клеточные линии. Полученные нами результаты способствуют более глубокому пониманию возможной роли интерлейкина-4, как регулятора пролиферации остеобластов, но для полного понимания этой проблемы необходимы более глубокие исследования. Frost et al. [23] и Silfversward et al. [24] показали, что IL-4 способствует секреции щелочной фосфатазы, образованию коллагена и минерализации остеобластов человека, поддерживая клетки в дифференцированной продуктивной фазе. Мы обнаружили, что 50 нг/мл IL-4 эффективно усиливает экспрессию OPG в остеобластах в зависимости от времени (0 дней — $p < 0,0001$, 7 дней — $p < 0,001$), но не оказывает существенного влияния на ОКН.

Инсулин-зависимая передача сигнала осуществляется высокоинтегрированной сетью, контролирующей несколько процессов. В присутствии инсулина инсулиновый рецептор фосфорилирует IRS, которые связаны с активацией фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3K)—АКТ/протеинкиназа В (PKB)-зависимого сигнального пути, ответственного за большинство метаболических действий инсулина (рис. 6). В сигнальных сетях есть несколько ключевых узлов, которые играют важную роль в нормальных физиологических условиях и при патологиях, таких как диабет, ожирение и метаболический синд-

ром [25]. В наших экспериментах было показано, что IL-4 восстанавливает и даже существенно активирует инсулин-зависимую передачу сигнала в инсулинорезистентных клетках MG-63. Фосфорилирование ключевых компонентов инсулин-зависимого сигнального пути (IRS1, Akt и AS160) в клетках, находящихся в инсулинорезистентном состоянии, максимально активировалось при добавлении 50 нг/мл IL-4. В некоторых работах было показано, что IL-4 может стимулировать IRS2/PI3K-зависимый сигнальный путь в CD4⁺ и CD8⁺ клетках через IL-4R-зависимый сигнальный путь [26]. Добавление IL-4 к остеобластам активирует комплекс IRS1 через IL-4R, тем самым активируя PI3K/Akt-зависимый сигнальный путь. Мы также обнаружили, что положительное влияние IL-4 на чувствительность клеток к инсулину может быть связано со специфическим механизмом развития инсулиновой резистентности в результате действия липидов. Инсулин связывается с IR и инициирует сигнальный каскад путем активации рецепторных тирозиновых киназ, и это приводит к активации транспорта глюкозы и другим метаболическим эффектам. В целом, эти результаты указывают на то, что IRS1 является непосредственным физиологическим субстратом инсулинового рецептора и может играть роль в инсулин-зависимой передаче сигнала [27–29]. Нами также было показано, что экспрессия IRS1 в значительной степени возрастает по мере остеогенной дифференцировки, и добавление IL-4 на 7-й и 14-й день вызывает повышение IRS1 ($p < 0,05$). Было высказано предположение, что повышение экспрессии IRS под воздействием IL-4 может быть одной из причин восстановления чувствительности остеобластов к действию инсулина с помощью IL-4.

В работах, выполненных Wei et al. [13], было показано, что инсулиновая резистентность в костной ткани приводит к снижению уровня цикла остеокальцина, гормона из костной ткани, разрушая остеокальцин-зависимый сигнальный путь и приводя к непереносимости глюкозы. OCN необходим для повышения чувствительности мышц и клеток белой жировой ткани к инсулину [30, 31]. Глюкоза может регулировать экспрессию гена остеокальцина через процесс транскрипции на уровне транскрипции. Совсем недавно было показано, что инсулиновая резистентность и высокий уровень глюкозы понижают экспрессию OCN *in vitro*, и что инсулинорезистентные остеобласты могут вызвать снижение уровня OCN, образуемого в костной ткани, и привести к возникновению системных нарушений [14]. Специфичный для костной ткани гормон OCN может влиять на

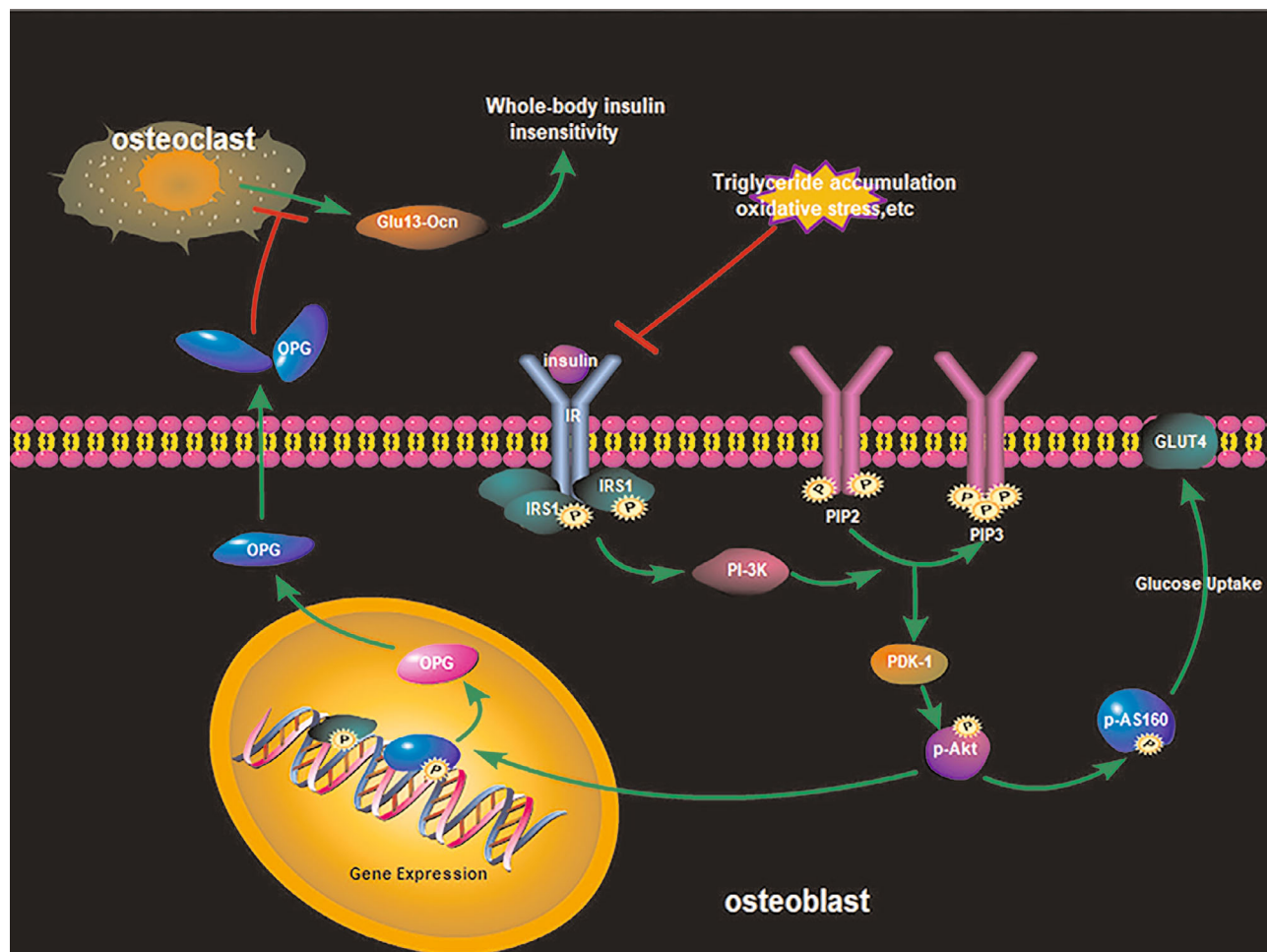


Рис. 6. Инсулин-зависимый сигнальный путь и общий обмен глюкозы в остеобластах и остеокластах.

С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

секрецию инсулина, чувствительность клеток к инсулину, и он крайне необходим для общего обмена энергии. Наши эксперименты показали, что экспрессия OCN повышается по мере увеличения продолжительности индукции. Добавление IL-4, по-видимому, вызывало небольшое ингибирующее действие на экспрессию OCN, но этот эффект был незначителен, статистически не значим и при этом не было выявлено корреляции с продолжительностью индукции. IL-4 не оказывал заметного влияния на уровень экспрессии OCN. Карбоксилированный OCN (GLA) является неактивной формой OCN, и активация белка происходит в результате его декарбоксилирования (рис. 5). Ferron et al. [10] обнаружили, что нарушение инсулин-зависимой передачи сигнала стимулирует экспрессию OPG, снижает адсорбцию остеокластов, повышает уровень карбоксилирования OCN и ингибирует активность инсулин-чувствительных

клеток. Действительно, низкие значения pH, достигаемые при резорбции кости, являются важным условием для декарбоксилированного остеокальцина. OPG играет важную роль в трансформации OCN при активации и инактивации [10, 12]. Нами было обнаружено, что экспрессия OPG увеличивалась со временем по мере повышения степени дифференцировки клеток. Добавление IL-4 вызывало повышение уровня экспрессии OPG, но в этом случае не было выявлено временной зависимости. Однако в этой работе были изучены эффекты IL-4 на OPG остеобластов только при нормальных условиях, и полученные нами результаты не указывают на процесс активации OCN в результате декарбоксилирования в условиях *in vivo*. Влияние IL-4 на экспрессию OPG остеобластов и в целом на системный метаболизм глюкозы в моделях инсулинорезистентности и на животных еще предстоит исследовать в дальнейших работах.

В заключение отметим, что это исследование продемонстрировало, что IL-4 ингибирует пролиферацию клеток MG-63 в зависимости от времени и концентрации. Также было показано, что IL-4 восстанавливает и даже значительно усиливает активность инсулин-зависимого сигнального пути в остеобластах, находящихся в инсулинорезистентном состоянии. Восстановление чувствительности остеобластов к действию инсулина с помощью IL-4 может быть связано с повышением уровня экспрессии IRS1. Кроме того, было показано, что уровни белков OPG и OCN повышаются по мере возрастания степени дифференцировки клеток, и 50 нг/мл IL-4 способствуют секреции OPG в остеобластах без оказания какого-либо влияния на уровень OCN. Из-за тесной взаимосвязи между метаболизмом костной ткани и глюкозы исследование положительного влияния IL-4 на чувствительность к инсулину в остеобластах полезно для снижения риска остеопороза у пациентов с

диабетом и для повышения системной резистентности к инсулину через факторы, связанные с костью.

Финансирование. Li M. получил частичную поддержку от Государственного фонда естественных наук Китая (National Nature Science Foundation of China, грант № 81470719 и № 81611140133) и проекта Shuang Key Research and development Project (Grant No. 2018GSF118114). Guo J. получил поддержку от Государственного фонда естественных наук Китая (National Nature Science Foundation of China, грант № 81771108).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bluher, M. (2016) Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance? *Clin. Sci. (Lond.)*, **130**, 1603–1614, doi: 10.1042/cs20160005.
2. Karalliedde, J., and Gnudi, L. (2016) Diabetes mellitus, a complex and heterogeneous disease, and the role of insulin resistance as a determinant of diabetic kidney disease, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **31**, 206–213, doi: 10.1093/ndt/gfu405.
3. Ebbstein, W. (2002) Invited comment on W. Ebbstein: On the therapy of diabetes mellitus, in particular on the application of sodium salicylate, *J. Mol. Med. (Berl.)*, **80**, 618.
4. Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance, *Science*, **259**, 87–91, doi: 10.1126/science.7678183.
5. Hundal, R.S., Petersen, K.F., Mayerson, A.B., Randhawa, P.S., Inzucchi, S., Shoelson, S.E., and Shulman, G.I. (2002) Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes, *J. Clin. Invest.*, **109**, 1321–1326, doi: 10.1172/jci14955.
6. Shoelson, S.E., Lee, J., and Goldfine, A.B. (2006) Inflammation and insulin resistance, *J. Clin. Invest.*, **116**, 1793–1801, doi: 10.1172/jci29069.
7. Ricardo-Gonzalez, R.R., Red Eagle, A., Odegaard, J.I., Jouihan, H., Morel, C.R., Heredia, J.E., Mukundan, L., Wu, D., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2010) IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 22617–22622, doi: 10.1073/pnas.1009152108.
8. Darkhal, P., Gao, M., Ma, Y., and Liu, D. (2015) Blocking high-fat diet-induced obesity, insulin resistance and fatty liver by overexpression of Il-13 gene in mice, *Int. J. Obes. (Lond.)*, **39**, 1292–1299, doi: 10.1038/ijo.2015.52.
9. Stafeev, I.S., Michurina, S.S., Podkuychenko, N.V., Vorotnikov, A.V., Menshikov, M.Y., and Parfyonova, Y.V. (2018) Interleukin-4 restores insulin sensitivity in lipid induced insulinresistant adipocytes, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 498–506, doi: 10.1134/s0006297918050036.
10. Ferron, M., Wei, J., Yoshizawa, T., Del Fattore, A., DePinho, R.A., Teti, A., Ducy, P., and Karsenty, G. (2010) Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism, *Cell*, **142**, 296–308, doi: 10.1016/j.cell.2010.06.003.
11. Avnet, S., Sciacca, L., Salerno, M., Gancitano, G., Cassarino, M.F., Longhi, A., Zakikhani, M., Carboni, J.M., Gottardis, M., Giunti, A., Pollak, M., Vigneri, R., and Baldini, N. (2009) Insulin receptor isoform A and insulin-like growth factor II as additional treatment targets in human osteosarcoma, *Cancer Res.*, **69**, 2443–2452, doi: 10.1158/0008-5472.can-08-2645.
12. Clemens, T.L., and Karsenty, G. (2011) The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis, *J. Bone Miner. Res.*, **26**, 677–680, doi: 10.1002/jbmr.321.
13. Wei, J., Ferron, M., Clarke, C.J., Hannun, Y.A., Jiang, H., Blauer, W.S., and Karsenty, G. (2014) Bone-specific insulin resistance disrupts whole-body glucose homeostasis via decreased osteocalcin activation, *J. Clin. Invest.*, **124**, 1–13, doi: 10.1172/jci72323.
14. Bilotta, F.L., Arcidiacono, B., Messineo, S., Greco, M., Chiefari, E., Britti, D., Nakanishi, T., Foti, D.P., and Brunetti, A. (2018) Insulin and osteocalcin: further evidence for a mutual cross-talk, *Endocrine*, **59**, 622–632, doi: 10.1007/s12020-017-1396-0.
15. Shaw, L.M. (2011) The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer, *Cell Cycle*, **10**, 1750–1756, doi: 10.4161/cc.10.11.15824.
16. Stafeev, I.S., Vorotnikov, A.V., Ratner, E.I., Menshikov, M.Y., and Parfyonova, Y.V. (2017) Latent inflammation and insulin resistance in adipose tissue, *Int. J. Endocrinol.*, **2017**, 5076732, doi: 10.1155/2017/5076732.
17. Boura-Halfon, S., and Zick, Y. (2009) Serine kinases of insulin receptor substrate proteins, *Vitam. Horm.*, **80**, 313–349, doi: 10.1016/s0083-6729(08)00612-2.
18. Boura-Halfon, S., and Zick, Y. (2009) Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **296**, E581–E591, doi: 10.1152/ajpendo.90437.2008.
19. Zick, Y. (2004) Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance, *Biochem. Soc. Trans.*, **32**, 812–816, doi: 10.1042/bst0320812.

20. Ura, K., Morimoto, I., Watanabe, K., Saito, K., Yanagihara, N., and Eto, S. (2000) Interleukin (IL)-4 and IL-13 inhibit the differentiation of murine osteoblastic MC3T3-E1 cells, *Endocr. J.*, **47**, 293–302, doi: 10.1507/endocrj.47.293.
21. Riancho, J.A., Zarrabeitia, M.T., Olmos, J.M., Amado, J.A., and Gonzalez-Macias, J. (1993) Effects of interleukin-4 on human osteoblast-like cells, *Bone Miner.*, **21**, 53–61, doi: 10.1016/s0169-6009(08)80120-1.
22. Riancho, J.A., González-Marcías, J., Amado, J.M., Olmos, J.M., and Fernández-Luna, J.L. (1995) Interleukin-4 as a bone regulatory factor: effects on murine osteoblast-like cells, *J. Endocrinol. Invest.*, **18**, 174–179.
23. Frost, A., Jonsson, K.B., Brandstrom, H., Ljunghall, S., Nilsson, O., and Ljunggren, O. (2001) Interleukin (IL)-13 and IL-4 inhibit proliferation and stimulate IL-6 formation in human osteoblasts: evidence for involvement of receptor subunits IL-13R, IL-13Ralpha, and IL-4Ralpha, *Bone*, **28**, 268–274.
24. Silfversward, C.J., Penno, H., Frost, A., Nilsson, O., and Ljunggren, O. (2010) Expression of markers of activity in cultured human osteoblasts: effects of interleukin-4 and interleukin-13, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **70**, 338–342, doi: 10.3109/00365513.2010.488698.
25. Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Kahn, C.R. (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 85–96, doi: 10.1038/nrm1837.
26. O'Connor, J.C., Sherry, C.L., Guest, C.B., and Freund, G.G. (2007) Type 2 diabetes impairs insulin receptor substrate-2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase activity in primary macrophages to induce a state of cytokine resistance to IL-4 in association with overexpression of suppressor of cytokine signaling-3, *J. Immunol.*, **178**, 6886–6893, doi: 10.4049/jimmunol.178.11.6886.
27. Myers, M.G., Jr., and White, M.F. (1996) Insulin signal transduction and the IRS proteins, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **36**, 615–658, doi: 10.1146/annurev.pa.36.040196.003151.
28. Paz, K., Voliovitch, H., Hadari, Y.R., Roberts, C.T., Jr., LeRoith, D., and Zick, Y. (1996) Interaction between the insulin receptor and its downstream effectors. Use of individually expressed receptor domains for structure/function analysis, *J. Biol. Chem.*, **271**, 6998–7003, doi: 10.1074/jbc.271.12.6998.
29. Sun, X.J., Miralpeix, M., Myers, M.G., Jr., Glasheen, E.M., Backer, J.M., Kahn, C.R., and White, M.F. (1992) Expression and function of IRS-1 in insulin signal transduction, *J. Biol. Chem.*, **267**, 22662–22672.
30. Ferron, M., Hinoi, E., Karsenty, G., and Ducy, P. (2008) Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 5266–5270, doi: 10.1073/pnas.071119105.
31. Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., Zhang, Z., Kim, J.K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P., and Karsenty, G. (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton, *Cell*, **130**, 456–469, doi: 10.1016/j.cell.2007.05.047.

INTERLEUKIN-4 RESTORES INSULIN SENSITIVITY IN INSULIN-RESISTANT OSTEOBLASTS BY INCREASING THE EXPRESSION OF INSULIN RECEPTOR SUBSTRATE 1

R. Chao¹, D. Li¹, Z. Yue¹, C. Huang¹, Y. Kou¹, Q. Zhou¹,
Y. Gao¹, T. Hasegawa², J. Guo¹, and M. Li^{1*}

¹ Department of Bone Metabolism, School and Hospital of Stomatology, Shandong University;
Shandong Key Laboratory of Oral Tissue Regeneration; Shandong Engineering Laboratory for Dental Materials
and Oral Tissue Regeneration, Jinan, 250012 China; E-mail: liminqi@sdu.edu.cn

² Department of Developmental Biology of Hard Tissue, Graduate School of Dental Medicine,
Hokkaido University, Sapporo, 060-8586 Japan

Received October 14, 2019
Revised November 30, 2019
Accepted December 31, 2019

Obesity and latent inflammation can give rise to insulin resistance and type 2 diabetes. Here we established an insulin resistance model of osteoblasts to explore the restoration effect of anti-inflammatory interleukin-4 (IL-4) on insulin sensitivity and its mechanism. We found that IL-4 inhibited cell proliferation in a concentration- and time-dependent manner. Insulin resistance significantly reduced the phosphorylation levels of the insulin receptor substrate 1 (IRS1; Tyr612), Akt (Ser473), and AS160 (Ser318) proteins. The addition of IL-4 to the insulin resistance model led to a dose-dependent stimulation of the phosphorylation of IRS1, Akt, and AS160. IL-4 fully restored the activation of the insulin cascade in insulin-resistant cells at the concentration of 50 ng/ml. Additionally, IL-4 promoted the expression of IRS1 in a time-dependent manner. We conjecture that IL-4 restores insulin sensitivity in osteoblasts by upregulating the expression of IRS1. It was also found that IL-4 promoted the expression of osteoprotegerin depending on the time of exposure. This effect may play an important role in the regulation of the energy metabolism in the whole body.

Keywords: obesity, insulin resistance, interleukin-4, osteoblast

УДК 577.322

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АГРЕГАЦИИ РИБОСОМНОГО БЕЛКА bS1 И ЕГО СТАБИЛЬНОГО ФРАГМЕНТА ИЗ *Thermus thermophilus*

© 2020 С.Ю. Гришин¹, У.Ф. Джус¹, О.М. Селиванова¹,
В.А. Балобанов¹, А.К. Сурин^{1,2,3}, О.В. Галзитская^{1,4*}

¹ Институт белка РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: ogalzit@vega.protres.ru

² Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, 142279 Оболensk, Московская обл., Россия; электронная почта: alan@vega.protres.ru

³ Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия

⁴ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 21.10.2019

После доработки 24.12.2019

Принята к публикации 11.01.2020

Многодоменный бактериальный белок bS1 является самым большим и функционально важным белком 30S субъединицы рибосомы, взаимодействующим как с мРНК, так и с белками. Известно, что белок bS1 обладает высокой склонностью к формированию ассоциатов, однако детально этот процесс не изучали. Для рибосомного белка bS1, а также его стабильного фрагмента из *Thermus thermophilus* нами были получены суперпродукцентные штаммы, выделены и очищены препараты рекомбинантного рибосомного белка bS1 из *T. thermophilus*, а также его стабильного фрагмента bS1(49). Методами флуоресцентной спектроскопии, динамического рассеяния света и высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрическим анализом продуктов ограниченного протеолиза, показано, что неструктурированные участки на N- и C-концах белка bS1 могут играть ключевую роль в его агрегации. При этом полученный фрагмент белка bS1(49) менее склонен к формированию агрегатов по сравнению с целым белком из *T. thermophilus*. Выявленные особенности могут быть использованы для получения белковых кристаллов и выяснения структуры стабильного фрагмента белка bS1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: агрегация белков, рибосомный белок, bS1, домен, *Thermus thermophilus*, ионная сила раствора, масс-спектрометрия.

DOI: 10.31857/S0320972520030100

В настоящее время известно, что склонность к агрегации и формированию амилоидоподобных фибрилл является общим свойством пептидов и белков [1–4]. Отдельный интерес представляет изучение агрегации рибосомных белков в связи с их повсеместной представленностью в клетке и вовлеченностью в надмолекулярные ансамбли с другими белками и нуклеиновыми кислотами [5–8].

Белок bS1, также обозначаемый как S1, по номенклатуре, предложенной до 2014 года

Принятые сокращения: I_{320}/I_{380} — отношение интенсивностей флуоресценции на длинах волн 320 и 380 нанометров; bS1(49) — фрагмент белка bS1 из *Thermus thermophilus* с молекулярной массой ~49 кДа; m/z — отношение массы иона к его заряду; ВЭЖХ-МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией; ДРС — динамическое рассеяние света; ДХШ — домен холодового шока; КД — круговой дихроизм; ЭМ — электронная микроскопия.

* Адресат для корреспонденции.

[9, 10], является самым большим (~60 кДа) белком 30S рибосомной субчастицы. В составе рибосомы данный РНК-связывающий белок выполняет структурные и регуляторные функции [11–14]. Многие РНК-связывающие белки содержат в своей структуре либо домены холодового шока (ДХШ), либо структурно аналогичные им S1-домены, которые от одной до нескольких копий повторяются в рибосомальном белке bS1 [15–20]. Однако трехмерная структура bS1 до сих пор не определена в связи с невозможностью получить ее в кристаллической форме, что, в свою очередь, обусловлено относительной подвижностью S1-доменов в растворе. Каждый S1-домен состоит из ~70 аминокислотных остатков (а.о.), разделенных гибкими участками (15–20 а.о.) [21]. Большинство экспериментальных исследований проведено на выделенном из *Escherichia coli* белке bS1, в состав которого входит шесть доменов [22–25]. Белок bS1

из термофильного микроорганизма *Thermus thermophilus* имеет пять S1-доменов (D1–D5) и меньше изучен. Однако белки из термофилов стабильны, с ними удобнее работать при обычных температурах, и они лучше поддаются кристаллизации [26, 27].

Рибосомный белок bS1 из *T. thermophilus* был идентифицирован относительно недавно [28]. В серии экспериментов для белка bS1 была выявлена склонность образовывать ассоциаты при низкой (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5) и умеренной (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5 в присутствии 100–150 мМ NaCl) ионной силе раствора [29–31]. Как отмечалось выше, S1-домены белка bS1 хотя и отличаются по последовательности от ДХШ, тем не менее сходны с последними по структуре и принадлежат к семейству ОБ-мотивов [32]. В предыдущих работах было показано, что только в условиях с высокой ионной силой раствора (2 М LiCl) белок YB-1, имеющий в составе ДХШ, способен формировать фибриллы [33], причем именно ДХШ вносит основной вклад в фибрилlogenез [34]. Влияние высокой ионной силы раствора на процесс формирования агрегатов S1-доменами не было изучено.

Формирование белком bS1 из *T. thermophilus* ассоциатов обусловлено взаимодействием друг с другом его аминокислотных последовательностей, склонных к агрегации. Однако до сих пор не был выявлен вклад в этот процесс конкретных а.о. из S1-доменов N- и C-концевых фрагментов данного белка. В то же время с целью выяснения особенностей агрегации белка bS1 из *T. thermophilus* можно использовать для сравнения его усеченный фрагмент с молекулярной массой 49 кДа – bS1(49). Данный фрагмент укорочен с N- и C-концов на 25 а.о. и 71 а.о. соответственно, но сохраняет пять S1-доменов и также как целый белок способен связываться с рибосомной 30S субъединицей [30]. В связи с этим имеет значение выяснить, есть ли отличия в процессе агрегации и в морфологии формируемых агрегатов для целого белка и его фрагмента bS1(49), связанные с различием в их аминокислотной последовательности? В то же время следует уточнить, будут ли высокие концентрации LiCl вызывать фибрилlogenез белка bS1 и его стабильного фрагмента, имеющих в своей структуре 5 повторяющихся доменов структурных аналогов ДХШ? Чтобы ответить на эти вопросы, мы охарактеризовали агрегационные свойства bS1 и bS1(49) с помощью методов флуоресцентной спектроскопии, динамического рассеяния света (ДРС), электронной микроскопии (ЭМ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-

МС). Склонность этих белков к формированию ассоциатов была изучена в буферных растворах с низкой ионной силой (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5), умеренной (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5; 150 мМ NaCl) и высокой (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5; 2 М LiCl).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение белков. Ген белка bS1 *T. thermophilus* и фрагмент гена, соответствующий белку bS1(49) *T. thermophilus*, были клонированы в экспрессионный вектор pET28b («Novagen», Германия) и суперэкспрессированы в культуре клеток *E. coli* BL21 (DE3) («Novagen», Германия) [35]. Рекомбинантный белок bS1 был выделен из штамма-суперпродуцента *E. coli* BL21(DE3) и очищен по ранее описанной методике с некоторыми изменениями [28]. Для увеличения доли связанного на колонке белка при хроматографической очистке вместо DEAE-Sepharose была использована колонка Q-Sepharose («GE Healthcare», Швеция).

bS1(49), фрагмент белка bS1 из *T. thermophilus*, был выделен из штамма-суперпродуцента *E. coli* аналогично целому белку [28]. В связи с тем, что белок термостабилен, для очистки использовали стадию прогрева супернатанта при 75 °C 15 мин, в результате которой удаляется большая часть термолабильных белков *E. coli*. Далее белковую фракцию осаждали путем высаливания сульфатом аммония. Поскольку bS1(49) обладает сильными РНК-связывающими свойствами, препарат последовательно доочищали вначале с помощью аффинной хроматографии на Heparin-Sepharose («GE Healthcare», Швеция), затем на гидрофобном хроматографическом носителе Butyl-Sepharose («GE Healthcare», Швеция). Конечной стадией очистки стала гель-фильтрация на носителе Superdex 75 («GE Healthcare», Швеция). Гель-фильтрацию белков осуществляли в буферном растворе, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂, 200 мМ NaCl и 5 мМ β-меркаптоэтанол. Для хранения препаратов при –20 °C белковые фракции высаливали добавлением (NH₄)₂SO₄ до конечной концентрации 3 М.

Подготовка препаратов белков bS1 и bS1(49) для исследований. Для изучения агрегации белков использовали буферные растворы с низкой ионной силой – буфер 1 (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5), умеренной ионной силой – буфер 2 (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5; 150 мМ NaCl) и высокой ионной силой – буфер 3 (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5; 2 М LiCl). Перед экспериментами сульфатный осадок белков раство-

ряли в 25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5 и переводили диализом в соответствующие буферные растворы при 4 °С в течение 16 ч. После диализа аликвоты раствора (по 4 мг белка) хранили при –20 °С. Перед экспериментами белковые препараты центрифугировали в течение 20 мин (4 °С) при 50 тыс. об./мин на ультрацентрифуге Beckman 100 («Beckman Coulter», Канада). Концентрацию белков определяли по методу Бредфорда [36], а также спектрофотометрическим методом с учетом коэффициента экстинкции $\varepsilon_{278} = 0,65$ (мл $\times$ мг $^{-1}$ $\times$ см $^{-1}$) [37]. Полученные образцы bS1 и bS1(49) в концентрации 20 мкМ использовались в дальнейших экспериментах.

Спектры кругового дихроизма (КД). Спектры белковых растворов bS1 и bS1(49) регистрировали на спектрополяриметре Chirascan («Photophysics», Англия) в кварцевой ячейке с длиной пути 0,01 см (концентрация белков 20 мкМ). Изменения во вторичной структуре bS1 и bS1(49) контролировали в дальней области УФ-спектра (190–250 нм) для каждого буфера (1, 2 и 3) при температуре 25 °С. Каждый спектр записывали трижды с разрешением 0,5 нм, усредняли, затем вычитали базовый спектр буферного раствора и применяли сглаживание методом Savitzky и Golay [38], используя программное обеспечение Chirascan («Photophysics», Англия). Полученные данные КД были проанализированы с помощью онлайн-сервера Bestsel [39].

Кривые температурной денатурации. Спектры флуоресценции получали с помощью четырехкуветного спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse («Varian», США) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 0,3 $\times$ 0,3 см и объемом 100 мкл, скорость прогрева 1 °С/мин. Длина волны возбуждения составляла 280 нм, спектры испускания регистрировали в диапазоне 300–450 нм. Для белков bS1 и bS1(49) из *T. thermophilus* кривые температурной денатурации получали на основе расчета отношения интенсивностей флуоресценции триптофанов при длинах волн 320 и 380 нм (I_{320}/I_{380}) [40].

Динамическое рассеяние света (ДРС). Измерения ДРС осуществляли с помощью прибора Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments Ltd.», Великобритания), оснащенного гелий-неоновым лазером мощностью 4 мВт и с температурным контролем кюветы ($\pm 0,1$ °С для объема 100 мкл). Измерения светорассеяния проводили в кварцевых кюветках при длине волны 532 нм, под углом 173°. Температурную зависимость увеличения интенсивности светорассеяния определяли в диапазоне 25–90 °С с шагом 5 °С. Время уравнивания и термостатирования

составляло 2 мин для каждого шага. Средние значения температуры агрегации определяли для образцов bS1 и bS1(49) (при концентрации белков 20 мкМ) в трех буферах (1, 2 и 3) на основе трех независимых измерений.

Электронная микроскопия. Препараты свежевыделенного белка bS1 *T. thermophilus* и его фрагмента bS1(49) в условиях 25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5 и препараты после прогревания при 70 °С в течение 24 ч в условиях 25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5; 25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5; 150 мМ NaCl; 25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5; 2 М LiCl анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-1200EX («JEOL», Япония). Перед анализом концентрацию препаратов доводили соответствующим буфером до 0,2 мг/мл. Образцы готовили для анализа методом негативного контрастирования. На каплю препарата (~10 мкл) помещали медную сеточку (400 Mesh, «Electron Microscopy Sciences», США), покрытую формваровой пленкой (0,2%-ный раствор формвара в хлороформе). После адсорбции (5 мин) сеточки с препаратом переносили на 1%-ный (w/v) водный раствор уранилацетата (1 мин). Излишки препарата и уранилацетата убирали с помощью фильтровальной бумаги. Анализ препаратов проводили при ускоряющем напряжении 80 кВ. Съемку осуществляли на пленку Kodak (SO-163) для электронной микроскопии при увеличении 40 тыс.

ВЭЖХ-МС анализ продуктов протеолиза агрегатов bS1 и bS1(49). Для анализа ВЭЖХ-МС разделения продуктов ограниченного протеолиза агрегатов bS1 и bS1(49) препараты белков делили на контрольные (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5) и опытные образцы. Первые хранились при –20 °С, а ко вторым добавляли LiCl (конечная концентрация 2 М LiCl) и инкубировали при 70 °С в течение суток с целью получения агрегатов. После этого контрольные и опытные образцы отдельно инкубировали со смесью протеаз (трипсина, химотрипсина («Sigma-Aldrich», Германия) и протеиназы К («AppliChem», США)) в течение 8 ч при 37 °С со скоростью перемешивания 450 об./мин в термостатируемом миксере Thermomixer comfort («Eppendorf», Германия). Конечная концентрация белка в препаратах составила 20 мкМ, концентрация каждой протеазы 0,27 мкМ. После инкубации реакцию протеолиза останавливали добавлением концентрированной муравьиной кислоты (0,2% (v/v)). Контрольные и опытные образцы центрифугировали 20 мин при 10 000 об./мин на центрифуге Eppendorf 5418R («Eppendorf», Германия). Осадок дважды промывали 100 мМ NH₄HCO₃ (pH 7,5), затем все препараты высушивали и

растворяли в 20 мкл 0,5%-ной трифторуксусной кислоты для последующей жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии, как описано в работе Surin et al. [41].

После смыва с колонки пептиды ионизуют, затем они попадают в масс-спектрометр. В ходе масс-спектрометрического анализа определяют заряд каждого иона, отношение его массы к заряду (m/z) и, в случае тандемной масс-спектрометрии, определяют отношение массы к заряду для его фрагментов. Данные характеристики являются уникальными для каждой последовательности пептидов. Полученные значения m/z , в свою очередь, анализировали программой PEAKS Studio 7.5 для идентификации пептидов.

Предварительный отбор идентифицированных пептидов с молекулярной массой >600 Да проводили согласно критерию оценки программы PEAKS Studio 7.5 («Bioinformatics Solution Inc.», Канада), т.е. значимыми считались пептиды, имеющие значение пороговой функции $T = -10 \lg P > 15$, где P — это вероятность того, что ложная идентификация в текущем поиске достигнет такой же или лучшей оценки соответствия. Значение T , равное >15 , соответствует p -критерию $< 0,03$ [42].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектры кругового дихроизма. Мы рассмотрели эффекты различной ионной силы буферных растворов на вторичную структуру белков bS1 и bS1(49). Конформационные изменения выявляли с помощью КД спектроскопии в даль-

ней области УФ-спектра (190–250 нм) для белков в буферных растворах 1 (25 мМ HEPES-NaOH), 2 (25 мМ HEPES-NaOH, 150 мМ NaCl) и 3 (25 мМ HEPES-NaOH, 2М LiCl). Спектры КД для препаратов целого белка bS1 и bS1(49) были получены с учетом базовых спектров буферных растворов (рис. 1).

Как видно из рис. 1, ионная сила раствора оказывала наибольший эффект на вторичную структуру bS1 белка, в то время как для bS1(49) спектры практически не изменялись. По данным программы Bestsel, с увеличением ионной силы раствора увеличивалось содержание α -спиралей в структуре белка (табл. 1). Так, для препаратов bS1 этот показатель увеличивался в три раза, одновременно с уменьшением содержания β -поворотов и других вторичных структур. Очевидно, что существенные изменения происходили в участках, отсутствующих во фрагменте bS1(49). Таким образом, увеличение ионной силы раствора привело к более существенному изменению вторичной структуры для целого bS1 белка по сравнению с bS1(49).

Анализ денатурационных кривых для белков bS1 и bS1(49). Изменения в структуре белков bS1 и bS1(49) наблюдали по изменению интенсивности флуоресценции триптофанов в ультрафиолетовой области [40]. Снижение соотношения I_{320}/I_{380} указывало на то, что происходят изменения в экспонированности и локальном окружении триптофанов, связанные с формированием интермедиатов при переходе от нативного состояния белка к денатурированному (рис. 2).

Поэтому сравнение кривых денатурации для bS1 и bS1(49) позволяет сделать вывод, что су-

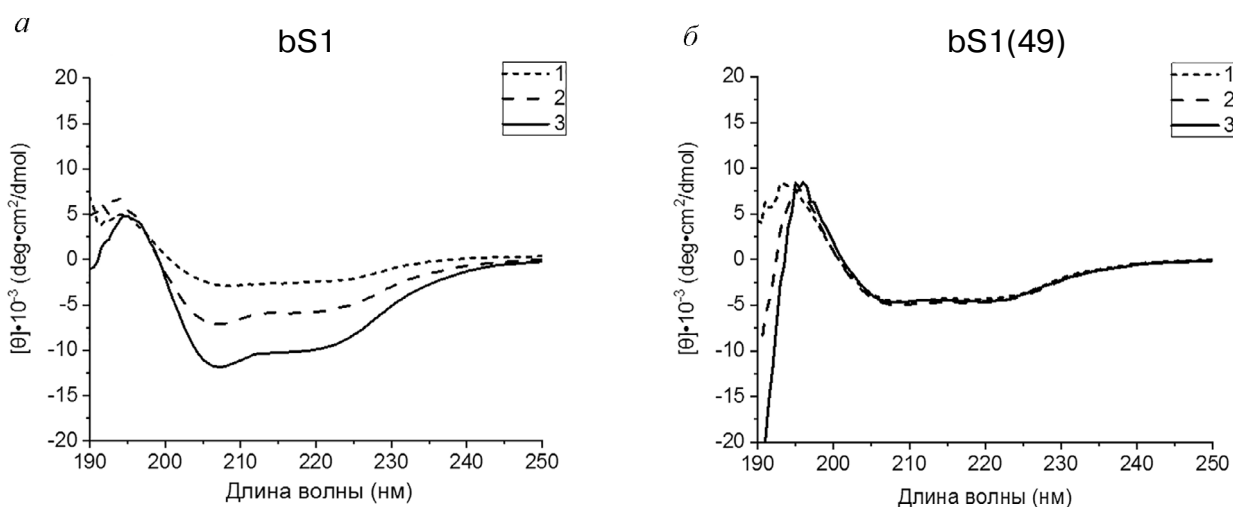


Рис. 1. Спектры КД в дальней УФ-области для препаратов bS1 и bS1(49) при различной ионной силе раствора. Обозначены данные, полученные для образцов белка в соответствующих буферных растворах с различной ионной силой: 1 — 25 мМ HEPES-NaOH; 2 — 25 мМ HEPES-NaOH, 150 мМ NaCl; 3 — 25 мМ HEPES-NaOH, 2 М LiCl

Таблица 1. Параметры вторичной структуры, полученные программой Bestsel из анализа данных КД (диапазон 200–250 нм), для препаратов белков bS1 и bS1(49)

Элементы вторичной структуры	bS1, 25 мМ HEPES-NaOH	bS1, 25 мМ HEPES-NaOH, 150 мМ NaCl	bS1, 25 мМ HEPES-NaOH, 2 М LiCl	bS1(49), 25 мМ HEPES-NaOH	bS1(49), 25 мМ HEPES-NaOH, 150 мМ NaCl	bS1(49), 25 мМ HEPES-NaOH, 2 М LiCl
α -Спирали	16%	42%	52%	31%	36%	41%
β -Структура	18%	11%	21%	18%	8%	0%
β -Поворот	20%	8%	0%	11%	11%	11%
Другие	46%	39%	27%	40%	45%	48%

шественные конформационные изменения белков, вызванные повышением температуры, происходили с ростом температуры выше 80 °С. Значимых различий между bS1 и bS1(49) не было выявлено в температурных зависимостях изменения I_{320}/I_{380} . В то же время следует отметить, что кривая изменения I_{320}/I_{380} в буфере 3 расположена ниже соответствующих кривых для буферных условий с низкой и средней ионной силой (буферы 1 и 2), что указывает на сдвиг спектров флуоресценции триптофанов в длинноволновую область и большую доступность этих а.о. для растворителя.

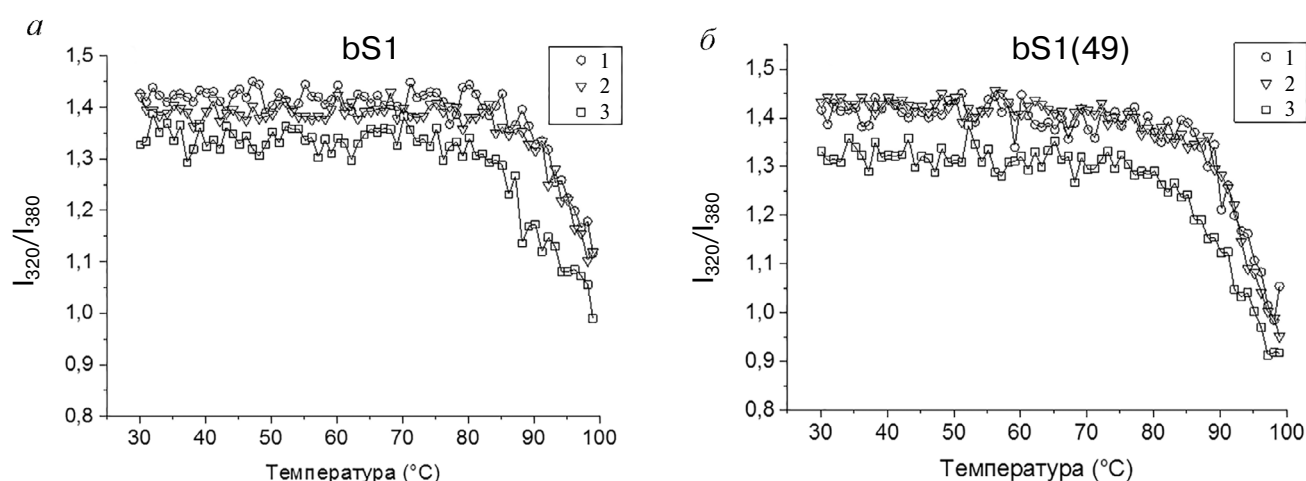
Температурная зависимость накопления агрегатов. Мы исследовали температурную зависимость интенсивности светорассеяния агрегатов белков bS1 и bS1(49) соответственно для трех различных буферных условий (рис. 3).

С увеличением температуры инкубации росло количество регистрируемых фотонов, рассеянных от частиц, что указывало на увеличение количества и размеров агрегатов. В на-

ших экспериментах не было выявлено существенных эффектов ионной силы раствора, с учетом погрешности измерений, для образцов одного и того же белка. С ростом температуры выше 80 °С интенсивность светорассеяния падала, часть агрегатов оседала на дно кюветы, а новые уже не формировались. В то же время температурная зависимость агрегации для препаратов bS1 и bS1(49) несколько различалась. Последний был более устойчив к формированию агрегатов с повышением температуры. Так, если значительный рост интенсивности светорассеяния для препаратов bS1 отмечали при 60 °С, то для bS1(49) аналогичное увеличение агрегации происходило при температуре 75 °С.

Электронно-микроскопические изображения агрегатов. ЭМ является прямым методом визуализации морфологии агрегатов (табл. 2).

По данным ЭМ видно, что изменение ионных условий от низкой (буфер 1), средней (буфер 2) до высокой ионной силы (буфер 3) при

**Рис. 2.** Температурная зависимость изменения I_{320}/I_{380} , соответствующая конформационным изменениям в структуре белков bS1 (а) и bS1(49) (б), в буферных растворах с различной ионной силой: 1 – 25 мМ HEPES-NaOH; 2 – 25 мМ HEPES-NaOH, 150 мМ NaCl; 3 – 25 мМ HEPES-NaOH, 2 М LiCl

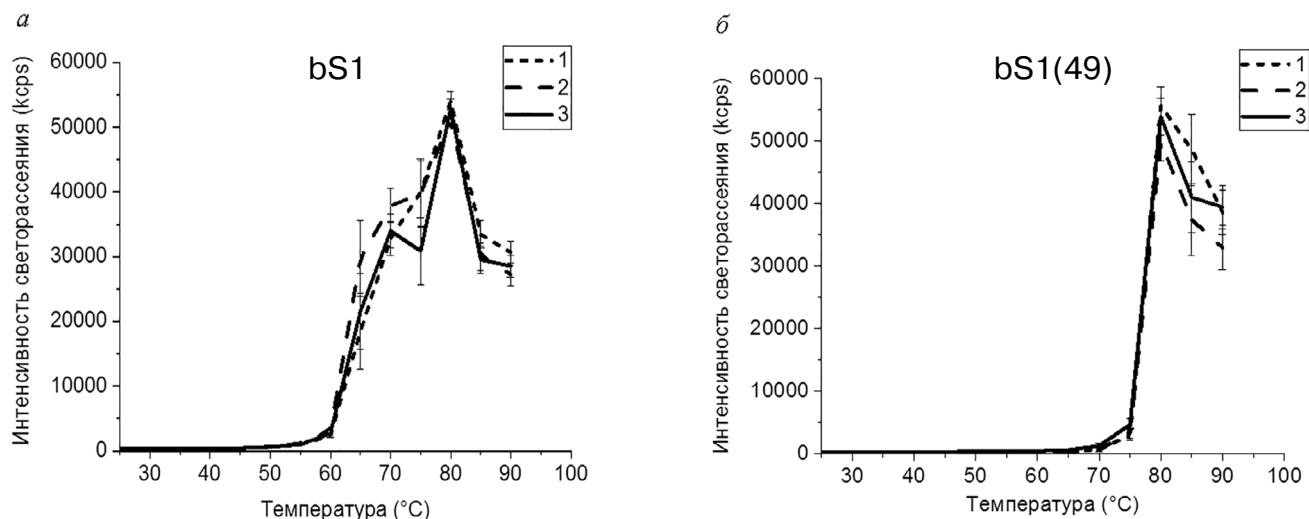


Рис. 3. Графики температурной зависимости интенсивности светорассеяния агрегатов для препаратов bS1 (а) и bS1(49) (б) в буферных растворах с различной ионной силой: 1 — 25 мМ HEPES-NaOH; 2 — 25 мМ HEPES-NaOH, 150 мМ NaCl; 3 — 25 мМ HEPES-NaOH, 2 М LiCl

прогревании при 70 °С в течение 24 ч как для белка bS1 *T. thermophilus*, так и для bS1(49) не приводило к видимым изменениям морфологии препаратов. Во всех случаях на изображениях были видны большие агрегаты разного размера. Однако следует отметить, что компоненты агрегатов белка bS1 имели большие размеры по сравнению с его 49 кДа фрагментом. В исследуемых условиях оба препарата не формировали фибриллы.

Результаты ВЭЖХ-МС-анализа участков, склонных к агрегации в белке bS1 и его стабильном фрагменте bS1(49). С помощью ВЭЖХ проводится предварительное разделение пептидов, полученных после гидролиза различных образцов белков. Всего было идентифицировано 883 пептида в продуктах гидролиза агрегатов bS1 и 513 пептидов для контрольного образца bS1. В то же время в продуктах гидролиза агрегатов bS1(49) было выявлено 572 пептида и 482 пептида для контрольного образца bS1(49).

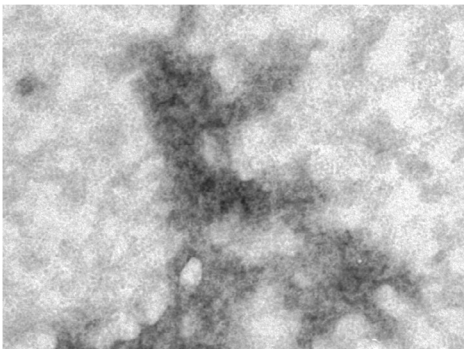
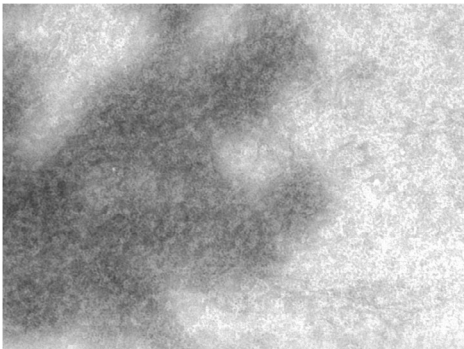
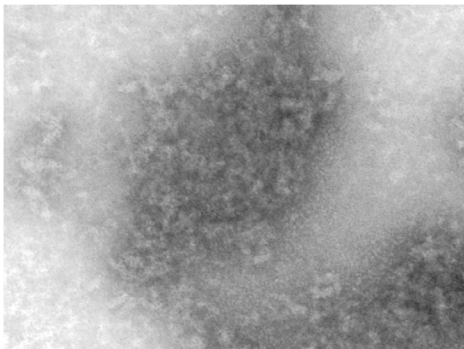
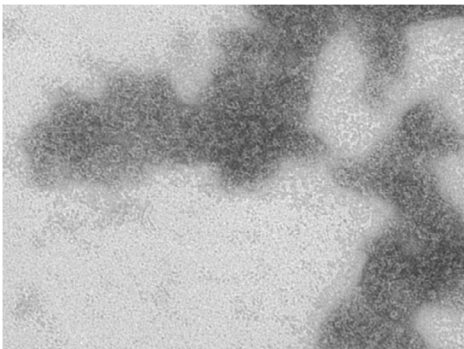
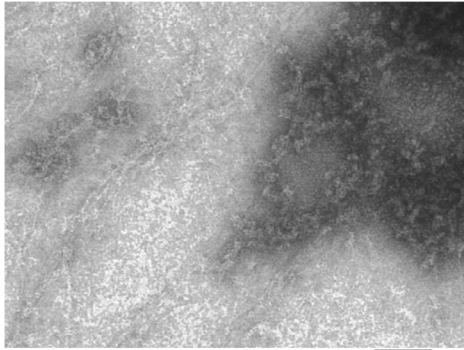
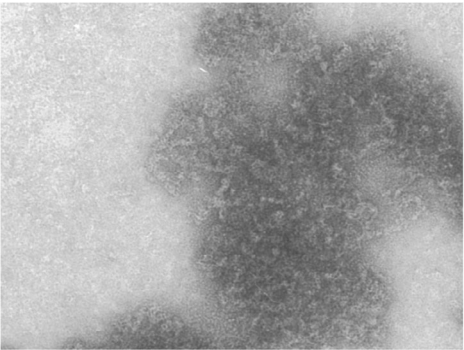
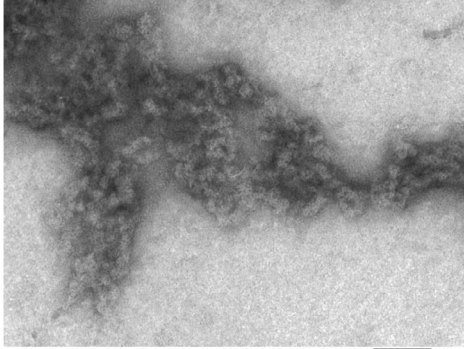
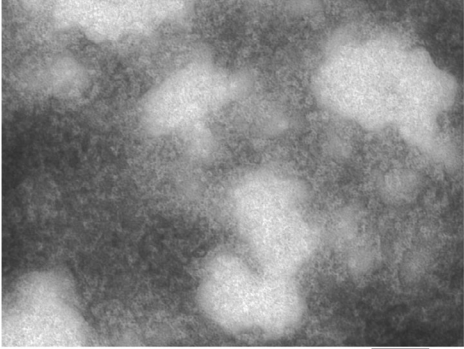
На рис. 4 представлены результаты распределения пептидов по их массам и относительным интенсивностям, соответствующие белкам bS1 и bS1(49) в различных условиях. Прежде всего, следует подчеркнуть, что укороченный белок bS1(49) был менее склонен формировать агрегаты в опыте по 24-часовой инкубации при 70 °С с 2М LiCl по сравнению с целым белком bS1, о чем свидетельствует относительно низкая интенсивность пиков, соответствующая пептидам в гидролизатах агрегатов bS1(49) (рис. 4, з). Кроме того, на рис. 4, б и г показано, что в продуктах протеолиза агрегатов по срав-

нению с результатами для протеолиза контрольных образцов белков (рис. 4, а и в) было идентифицировано больше фрагментов с молекулярной массой 3000–7500 Да. Такие более протяженные фрагменты в белковых агрегатах соответствуют участкам молекул, защищенным от действия протеаз, а значит содержащим аминокислотные последовательности, склонные к агрегации.

В дальнейшем мы ранжировали значимые пептиды, выявленные в гидролизатах контролей и опытных образцов белков bS1 и bS1(49), по длине и нанесли самые длинные из них на последовательность белка bS1, чтобы определить места, наиболее защищенные от воздействия протеаз в контрольных препаратах и агрегатах (рис. 5).

На рис. 5, б можно видеть, что фрагменты, выявленные в агрегатах опытных образцов, в целом длиннее, чем в контрольных образцах. В то же время есть общие последовательности в контрольных и опытных образцах (агрегатах), а именно последовательности а.о.: 30–60, 66–92, 133–153, 158–188, 198–246, 264–287, 328–356, 365–412, 417–465, 503–533, которые не прерываются местами протеолитического расщепления, что может указывать на их относительную защищенность от протеолиза как в агрегатах, так и в контроле. С другой стороны, в контрольном образце bS1 не удалось идентифицировать в продуктах протеолиза протяженную целую последовательность а.о. 466–502 на С-конце белка, так как она подвергается полному расщеплению, но большая ее часть (476–502 а.о.) сохраняется во фрагменте 476–533 а.о., выявленной в

Таблица 2. Электронно-микроскопический анализ препаратов белка bS1 *T. thermophilus* и его 49 кДа фрагмента в различных ионных условиях

Препарат	bS1	bS1(49)
25 mM HEPES-NaOH, pH 7,5 (без прогревания)		
Результаты ЭМ-анализа образцов после прогревания (70 °C, 24 ч)		
25 mM HEPES-NaOH, pH 7,5		
25 mM HEPES-NaOH, pH 7,5; 150 mM NaCl		
25 mM HEPES-NaOH, pH 7,5; 2 M LiCl		

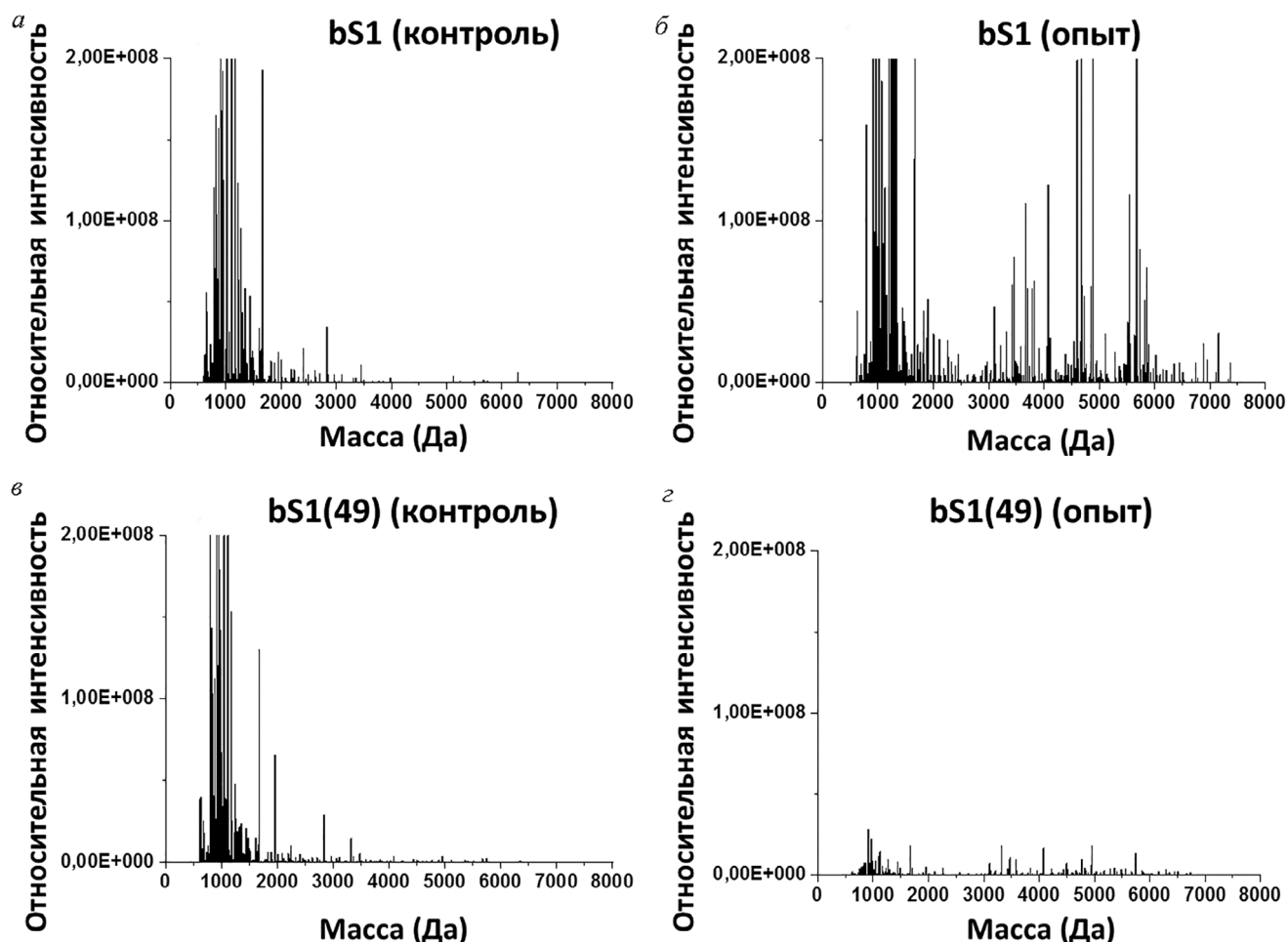


Рис. 4. Сравнение результатов распределения пептидов по массам и относительным интенсивностям для белков bS1 (а) и bS1(49) (в), а также белковых агрегатов, полученных после инкубации в буферном растворе с 2 М LiCl bS1 (б) и bS1(49) (г)

гидролизатах агрегатов. Такие последовательности а.о. (1–29, 94–119, 298–327, 476–502), которые расщепляются в контрольных образцах, но остаются целыми в продуктах гидролиза агрегатов, могут играть ключевую роль в агрегации белка bS1 в опыте при высокой концентрации соли.

На рис. 5, в показано, что как в контроле, так и в агрегатах белка bS1(49) в продуктах протеолиза сохраняются длинные фрагменты, которые имеют сходные сайты расщепления (небольшие вариации в длине гидролизатов обусловлены особенностями работы протеаз) [43]. Отсутствие существенных различий с контрольным образцом указывает на то, что в отличие от целого белка bS1 увеличение ионной силы раствора вплоть до 2М LiCl существенно не влияет на способность к агрегации усеченного фрагмента белка bS1(49). Эти результаты согласуются с данными КД, полученными при изучении влияния различной ионной силы буферных раство-

ров на вторичную структуру белков bS1 и bS1(49). В ходе этого исследования было показано, что в отличие от bS1 изменение ионной силы буферного раствора не приводит к видимым изменениям во вторичной структуре bS1(49). Этим объясняется и низкая склонность к агрегации bS1(49) при изменениях ионной силы раствора.

Сравнение выявленных сайтов протеолиза (рис. 5, б, в) с распределением доменов в белках (рис. 5, а) указывает на то, что большинство сайтов протеолиза приходится на гибкие участки на концах или вне доменов. Чтобы выявить возможную роль S1-доменов в процессах агрегации, мы сравнили распределение всех идентифицированных пептидов, которые выявлены во внутренних последовательностях доменов (Д1: 33–104, Д2: 122–188, Д3: 209–277, Д4: 294–364, Д5: 381–450), для самих доменов и для аналогичного по длине неупорядоченного участка белка bS1 (С: 449–518) (рис. 6, а).

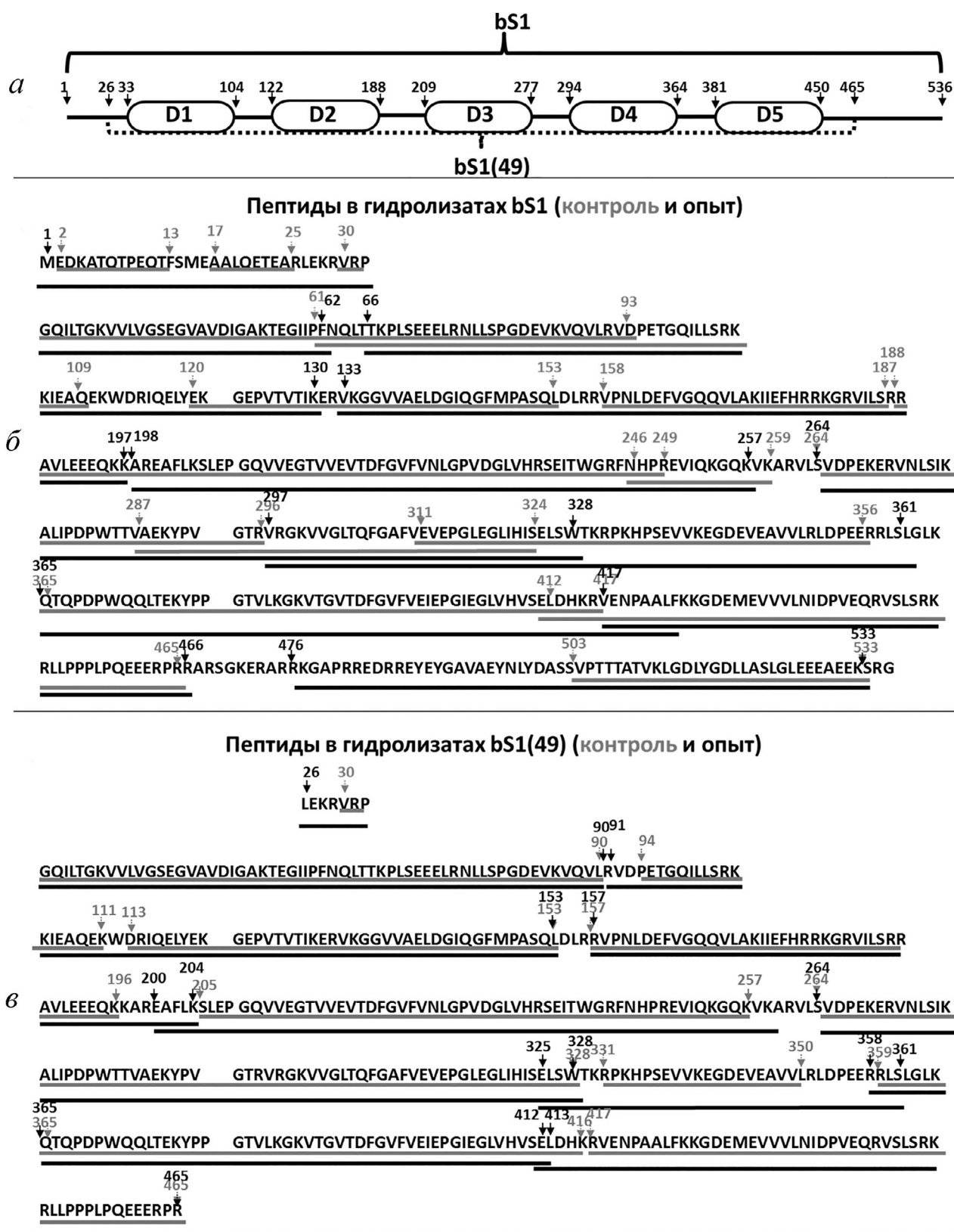


Рис. 5. Схематическое представление доменной организации белков bS1 и bS1(49) из *T. thermophilus* (a) и результаты пептидного картирования после ВЭЖХ-МС анализа контрольных белков и агрегатов bS1 (б) и bS1(49) (в). Серым и черным цветом подчеркнуты пептиды, выявленные в контрольных и опытных образцах соответственно. Последовательность а.о. белка bS1 получена из базы данных Uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q83YV9>)

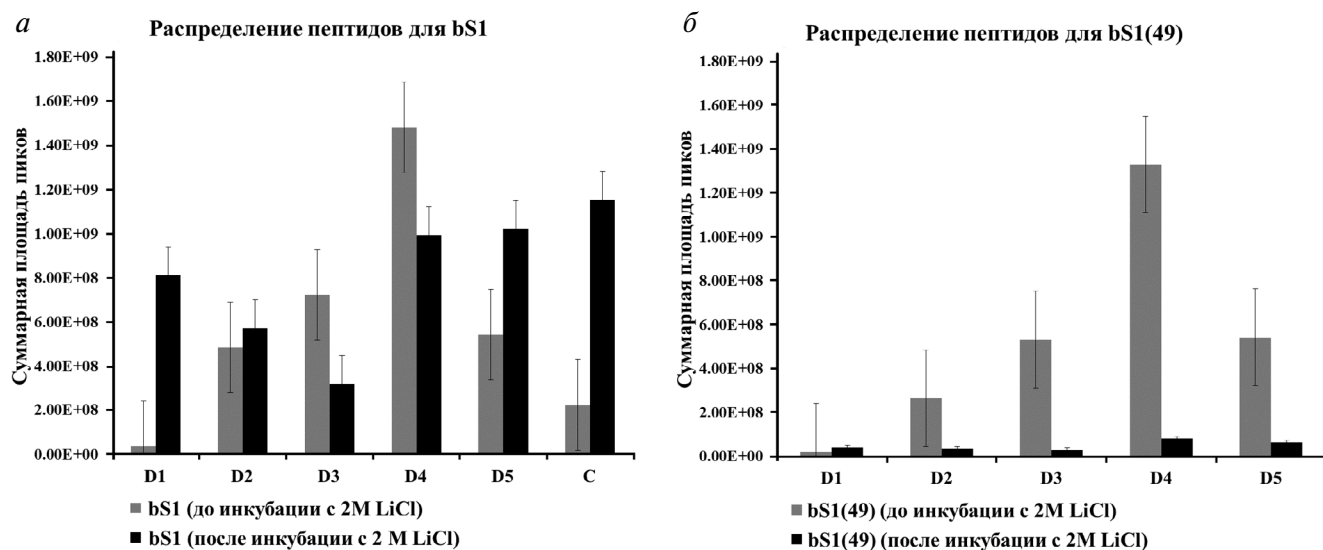


Рис. 6. Гистограммы распределения пептидов по белковым фрагментам, соответствующим доменам (D1: 33–104 а.о., D2: 122–188 а.о., D3: 209–277 а.о., D4: 294–364 а.о., D5: 381–450 а.о.), и внутри неструктурированного участка (C: 449–518 а.о.) для белков bS1 (1–536 а.о.) (а) и bS1(49) (26–465 а.о.) (б) до и после инкубации в буферном растворе с 2 М LiCl. Показаны планки погрешностей со стандартными ошибками

Из рис. 6, а следует, что в продуктах гидролиза агрегатов, полученных в опыте с 24-часовой инкубацией при 70 °С в условиях с 2М LiCl, существенно возросла относительная доля пептидов, входящих в 1-й домен и участок 449–518 а.о. Такое поведение свидетельствует о высокой степени защищенности данных пептидов от воздействия протеаз. Увеличение защищенности данных участков белка bS1 от воздействия протеаз в случае длительной инкубации при высокой концентрации соли можно объяснить тем, что эти участки белка (1-й домен и участок 449–518 а.о.) вовлечены в межмолекулярные взаимодействия в процессе агрегации. Кроме того, наблюдается сходство распределения пептидов между образцами bS1 и bS1(49) как внутри контрольной группы (рис. 6, а), так и между образцами экспериментальной группы (рис. 6, б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было показано, что белок bS1 (60 кДа) из *T. thermophilus* обладает высокой склонностью формировать ассоциаты в растворах с низкой и умеренной ионной силой [31]. Способность белка bS1 к ассоциации обусловлена особенностями структуры белка и выполняемыми функциями, в частности формированием гомодимеров и связыванием с рибосомными белками в 30S рибосомной субчастице. В опытах *in vitro* целый bS1 белок из *T. thermophilus*

показывает низкую стабильность, при длительном хранении происходит частичная деградация белка, в связи с этим был выделен стабильный фрагмент белка bS1(49) [30]. В настоящей работе было проведено сравнение агрегационных свойств белков bS1 и bS1(49) из *T. thermophilus* в растворах с различной ионной силой — низкой (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5), умеренной (в присутствии 150 мМ NaCl) и высокой (в присутствии 2 М LiCl). Следует отметить, что особый интерес представляло изучение свойств белков в условиях раствора с высокой ионной силой, так как такие исследования для целого белка bS1 не проводили. Кроме того, было необходимо проверить (возможные) стимулирующие фибрилогенез эффекты присутствия 2 М LiCl, как это было сделано для белка YB-1 [33]. Как подчеркивалось выше, белки bS1 и bS1(49) мультидоменные, каждый состоит из пяти S1-доменов, которые являются структурными аналогами домена холодового шока YB-1. Поэтому мы предположили, что сходство во вторичной структуре ДХШ и S1-домена может иметь отражение в аналогичных механизмах формирования фибрилл белками YB-1 и bS1, в частности вызываться присутствием в растворе 2 М LiCl.

В настоящем исследовании было показано, что целый белок bS1 (1–536 а.о.) из *T. thermophilus* более склонен к агрегации по сравнению с его фрагментом bS1(49) (26–465 а.о.). Методом ДПС показано, что температура начала процесса агрегации для белков bS1 и bS1(49) —

60 °C и 75 °C соответственно. При этом денатурация белков, оцененная по флуоресценции триптофанов W111, W242, W284, W328 и W371 (находящихся в центральной части белка), начинается при температуре выше 80 °C, т.е. процесс агрегации начинается раньше, чем процесс денатурации доменов основной части белков.

Сравнительный анализ данных ВЭЖХ-МС продуктов ограниченного протеолиза агрегатов целого белка bS1 показал, что участки 1–25 и 466–502, отсутствующие в белке bS1(49), играют важную роль в агрегации целого белка bS1.

По данным ЭМ агрегаты обоих белков сходны по морфологии. Увеличение ионной силы раствора вплоть до 2М LiCl не приводит к заметному формированию фибрилл, которые могут формировать, например, инсулин [44] или белок YB-1 [33] для обоих белков (bS1 и bS1(49)), как это предполагалось в начале исследования.

T. thermophilus, как и *E. coli*, является модельным объектом для изучения структуры бактериальной рибосомы в целом и отдельных образующих ее белков [45, 46]. В связи с тем, что трехмерная структура bS1 *T. thermophilus* до сих пор не определена, актуальной задачей является кристаллизация белка (или его стабильного

фрагмента). Выяснение условий и механизмов агрегации рибосомного белка bS1 из *T. thermophilus*, в свою очередь, значимо для решения этой задачи. Кроме того, результаты ВЭЖХ-МС анализа продуктов протеолиза могут быть использованы для выявления последовательностей белка bS1 из *T. thermophilus*, важных для белковой мультимеризации, а также для выяснения роли отдельных доменов N- и C-конца молекулы во взаимодействии с другими белками рибосомы и мРНК [30].

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 18-14-00321) и при участии Центра коллективного пользования «Структурно-функциональные исследования белков и РНК» ИБ РАН (584307). ЭМ исследования были проведены на базе оборудования ЦКП (№ 670266).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chiti, F., and Dobson, C.M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 333–366.
- Dovidchenko, N.V., and Galzitskaya, O.V. (2015) Computational approaches to identification of aggregation sites and the mechanism of amyloid growth, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **855**, 213–239.
- Galzitskaya, O. (2019) New mechanism of amyloid fibril formation, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **20**, 630–640.
- Solovyov, K.V., Gasteva, A.A., Egorov, V.V., Aleinikova, T.D., Sirotkin, A.K., Shvartsman, A.L., and Shavlovsky, M.M. (2006) Role of the C-terminal fragment of human transthyretin in abnormal fibrillogenesis, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 543–549.
- Pilla, S.P., Thomas, A., and Bahadur, R.P. (2019) Dissecting macromolecular recognition sites in ribosome: implication to its self-assembly, *RNA Biol.*, **16**, 1300–1312.
- Pechmann, S., Willmund, F., and Frydman, J. (2013) The ribosome as a hub for protein quality control, *Mol. Cell*, **49**, 411–421.
- Chaillou, T. (1985) Ribosome specialization and its potential role in the control of protein translation and skeletal muscle size, *J. Appl. Physiol.*, **127**, 599–607.
- Schieber, G.L., and O'Brien, T.W. (1982) Extraction of proteins from the large subunit of bovine mitochondrial ribosomes under nondenaturing conditions, *J. Biol. Chem.*, **257**, 8781–8787.
- Wittmann, H.G., Stöfflet, G., Hindennach, I., Kurland, C.G., Birge, E.A., Randall-Hazelbauer, L., Nomura, M., Kaltschmidt, E., Mizushima, S., Traut, R.R., and Bickle, T.A. (1971) Correlation of 30S ribosomal proteins of *Escherichia coli* isolated in different laboratories, *Mol. Gen. Genet.*, **111**, 327–330.
- Ban, N., Beckmann, R., Cate, J.H., Dinman, J.D., Dragon, F., Ellis, S.R., Lafontaine, D.L., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J.M., McAlear, M.A., Moore, P.B., Noller, H.F., Ortega, J., Panse, V.G., Ramakrishnan, V., Spahn, C.M., Steitz, T.A., Tchorzewski, M., Tollervey, D., Warren, A.J., Williamson, J.R., Wilson, D., Yonath, A., and Yusupov, M. (2014) A new system for naming ribosomal proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **24**, 165–169.
- Giri, L., and Subramanian, A.R. (1977) Hydrodynamic properties of protein S1 from *Escherichia coli* ribosome, *FEBS Lett.*, **81**, 199–203.
- Laughrea, M., and Moore, P.B. (1977) Physical properties of ribosomal protein S1 and its interaction with the 30 S ribosomal subunit of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **112**, 399–421.
- Tedin, K., Resch, A., and Bläsi, U. (1997) Requirements for ribosomal protein S1 for translation initiation of mRNAs with and without a 5' leader sequence, *Mol. Microbiol.*, **25**, 189–199.
- Wower, I.K. (2000) Binding and cross-linking of tmRNA to ribosomal protein S1, on and off the *Escherichia coli* ribosome, *EMBO J.*, **19**, 6612–6621.
- Deryusheva, E.I., Machulin, A.V., Selivanova, O.M., and Galzitskaya, O.V. (2017) Taxonomic distribution, repeats, and functions of the S1 domain-containing proteins as members of the OB-fold family, *Proteins*, **85**, 602–613.
- Bycroft, M., Hubbard, T.J.P., Proctor, M., Freund, S.M.V., and Murzin, A.G. (1997) The solution structure of the S1

- RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold, *Cell*, **88**, 235–242.
17. Mihailovich, M., Militti, C., Gabaldón, T., and Gebauer, F. (2010) Eukaryotic cold shock domain proteins: highly versatile regulators of gene expression, *BioEssays*, **32**, 109–118.
 18. Machulin, A.V., Deryusheva, E.I., Selivanova, O.M., and Galzitskaya, O.V. (2019) The number of domains in the ribosomal protein S1 as a hallmark of the phylogenetic grouping of bacteria, *PLoS One*, **14**, e0221370.
 19. Дерюшева Е.И., Мачулин А.В., Селиванова О.М., Сердюк И.Н. (2010) Семейство рибосомных белков S1 содержит уникальный консервативный домен, *Молекулярная биология*, **44**, 728–734.
 20. Machulin, A., Deryusheva, E., Lobanov, M., and Galzitskaya, O. (2019) Repeats in S1 proteins: flexibility and tendency for intrinsic disorder, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2377.
 21. Subramanian, A.R. (1983) Structure and functions of ribosomal protein S1, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **28**, 101–142.
 22. Sengupta, J., Agrawal, R.K., and Frank, J. (2001) Visualization of protein S1 within the 30S ribosomal subunit and its interaction with messenger RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11991–11996.
 23. Boni, I.V., Artamonova, V.S., and Dreyfus, M. (2000) The last RNA-binding repeat of the *Escherichia coli* ribosomal protein S1 is specifically involved in autogenous control, *J. Bacteriol.*, **182**, 5872–5879.
 24. Salah, P., Bisaglia, M., Aliprandi, P., Uzan, M., Sizun, C., and Bontems, F. (2009) Probing the relationship between gram-negative and gram-positive S1 proteins by sequence analysis, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 5578–5588.
 25. Loveland, A.B., and Korostelev, A.A. (2018) Structural dynamics of protein S1 on the 70S ribosome visualized by ensemble cryo-EM, *Methods*, **137**, 55–66.
 26. Cava, F., Hidalgo, A., and Berenguer, J. (2009) *Thermus thermophilus* as biological model, *Extremophiles*, **13**, 213–231.
 27. Sedelnikova, S.E., Agalarov, S.C., Garber, M.B., and Yusupov, M.M. (1987) Proteins of the *Thermus thermophilus* ribosome purification of several individual proteins and crystallization of protein TL7, *FEBS Lett.*, **220**, 227–230.
 28. Shiryaev, V.M., Selivanova, O.M., Hartsch, T., Nazimov, I.V., and Spirin, A.S. (2002) Ribosomal protein S1 from *Thermus thermophilus*: its detection, identification and overproduction I, *FEBS Lett.*, **525**, 88–92.
 29. Selivanova, O.M., Shiryaev, V.M., Tiktopulo, E.I., Potekhin, S.A., and Spirin, A.S. (2003) Compact globular structure of *Thermus thermophilus* ribosomal protein S1 in solution, *J. Biol. Chem.*, **278**, 36311–36314.
 30. Selivanova, O.M., Fedorova, Y.Y., and Serdyuk, I.N. (2007) Proteolysis of ribosomal protein S1 from *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus* leads to formation of two different fragment, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1225–1232.
 31. Тимченко А.А., Ширияев В.М., Федорова Ю.Ю., Кихара Х., Кимура К., Виллумаит Р., Гарамус В.М., Селиванова О.М. (2007) Конформация рибосомного белка S1 из *Thermus thermophilus* в растворе при разных ионных условиях, *Биофизика*, **52**, 216–222.
 32. Theobald, D.L., Mitton-Fry, R.M., and Wuttke, D.S. (2003) Nucleic acid recognition by OB-fold proteins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **32**, 115–133.
 33. Selivanova, O.M., Guryanov, S.G., Enin, G.A., Skabkin, M.A., Ovchinnikov, L.P., and Serdyuk, I.N. (2010) YB-1 is capable of forming extended nanofibrils, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 115–120.
 34. Guryanov, S.G., Selivanova, O.M., Nikulin, A.D., Enin, G.A., Melnik, B.S., Kretov, D.A., Serdyuk, I.N., and Ovchinnikov, L.P. (2012) Formation of amyloid-like fibrils by Y-box binding protein 1 (YB-1) is mediated by its cold shock domain and modulated by disordered terminal domains, *PLoS One*, **7**, e36969.
 35. William Studier, F., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods Enzymol.*, **185**, 60–89.
 36. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
 37. Gill, S.C., and von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal. Biochem.*, **182**, 319–326.
 38. Savitzky, A., and Golay, M.J.E. (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures, *Anal. Biochem.*, **36**, 1627–1639.
 39. Micsonai, A., Wien, F., Bulyáki, É., Kun, J., Moussong, É., Lee, Y.-H., Goto, Y., Réfrégiers, M., and Kardos, J. (2018) BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 315–322.
 40. Balobanov, V.A., Katina, N.S., Finkelstein, A.V., and Bychkova, V.E. (2017) Intermediate states of apomyoglobin: are they parts of the same area of conformations diagram? *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 625–631.
 41. Surin, A.K., Grishin, S.Y., and Galzitskaya, O.V. (2019) Identification of amyloidogenic regions in the spine of insulin fibrils, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 47–55.
 42. Zhang, J., Xin, L., Shan, B., Chen, W., Xie, M., Yuen, D., Zhang, W., Zhang, Z., Lajoie, G.A., and Ma, B. (2012) PEAKS DB: *de novo* sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification, *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, M111.010587.
 43. Катина Н.С., Суворина М.Ю., Григорашвили Е.И., Марченков В.В., Рябова Н.А., Никулин А.Д., Сурин А.К. (2016) Определение участков апомиоглобина, образующих межмолекулярные взаимодействия в амилоидных агрегатах методом масс-спектрометрии высокого разрешения, *Масс-спектрометрия*, **13**, 225–234.
 44. Селиванова О.М., Гришин С.Ю., Глякина А.В., Садгян А.С., Ушакова Н.И., Галзитская О.В. (2018) Анализ аналогов инсулина и стратегия их дальнейшей разработки, *Успехи биологической химии*, **58**, 313–346.
 45. Yusupov, M.M., Garber, M.B., Vasiliev, V.D., and Spirin, A.S. (1991) *Thermus thermophilus* ribosomes for crystallographic studies, *Biochimie*, **73**, 887–897.
 46. Tung, C.S., and Sanbonmatsu, K.Y. (2004). Atomic model of the *Thermus thermophilus* 70S ribosome developed *in silico*, *Biophys. J.*, **87**, 2714–2722.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE AGGREGATION OF THE bS1 RIBOSOMAL PROTEIN AND ITS STABLE FRAGMENT FROM *Thermus thermophilus*

S. Yu. Grishin¹, U. F. Dzhus¹, O. M. Selivanova¹,
V. A. Balobanov¹, A. K. Surin^{1,2,3}, and O. V. Galzitskaya^{1,4*}

¹ Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: ogalzit@vega.protres.ru

² State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology,
142279 Obolensk, Moscow Region, Russia; E-mail: alan@vega.protres.ru

³ The Branch of the Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

⁴ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

Received October 21, 2019

Revised December 24, 2019

Accepted January 11, 2020

The multidomain bacterial protein bS1 is the largest and functionally important ribosome protein of subunit 30S that interacts with both mRNA and proteins. It is known that bS1 protein has a high tendency to form associates, but this process has not been studied in detail. We isolated and purified *Thermus thermophilus* recombinant bS1 ribosomal protein and its stable truncated bS1(49) fragment using superproducing *Escherichia coli* strains. Using fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering, and high-performance liquid chromatography combined with mass-spectrometry analysis of the limited proteolysis products, it has been shown that unstructured regions at the N- and C-ends of the bS1 protein can play a key role in its aggregation. At that, the truncated bS1(49) fragment is less prone to form aggregates compared to the whole *T. thermophilus* protein. The revealed features can be used to obtain protein crystals and elucidate the structure of a stable fragment of the bS1 protein.

Keywords: protein aggregation, ribosomal protein, bS1, domain, *Thermus thermophilus*, ionic strength of a solution, mass-spectrometry

УДК 579.242;579.222.2

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ПУТЬ МЕТАБОЛИЗМА НАФТАЛИНА У ШТАММА *Rhodococcus opacus* 3D, ВКЛЮЧАЮЩИЙ ОБРАЗОВАНИЕ *орто*-ФТАЛЕВОЙ И ПРОИЗВОДНЫХ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ

© 2020 Т.О. Анохина, Т.З. Есикова, А.Б. Гафаров,
В.Н. Полинцева, Б.П. Баскунов, И.П. Соляникова*

Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
142290 Пушкино Московской обл., Россия; электронная почта: innas@IBPM.Pushchino.ru

Поступила в редакцию 01.11.2019

После доработки 06.12.2019

Принята к публикации 06.12.2019

Нафталин, как один из компонентов нефти, относится к широко распространенным в окружающей среде поллютантам. Биохимические и генетические аспекты деградации нафталина наиболее полно изучены у бактерий рода *Pseudomonas*. Известно, что салицилат является ключевым интермедиатом деградации этого соединения у псевдомонад. В данной работе исследована способность штамма *Rhodococcus opacus* 3D использовать нафталин в качестве единственного источника углерода и энергии. Особенностью этого штамма является отсутствие роста в минеральной среде с салицилатом, типичным интермедиатом биodeградации нафталина у грамотрицательных бактерий. Отсутствие активности фермента салицилатгидроксилазы и динамика накопления салицилата при культивировании штамма *R. opacus* 3D в минеральной среде с нафталином свидетельствуют об альтернативном пути окисления нафталина данной культурой. Показана способность исследуемого штамма использовать в качестве ростовых субстратов моноароматические соединения – соли гентизиновой, протокатеховой, *орто*-фталевой, 2-гидроксикоричной кислот и кумарин. На основании определения активности ферментов, идентификации интермедиатов, анализа генетических детерминант и определения спектра ростовых субстратов было сделано заключение, что штамм *R. opacus* 3D осуществляет деструкцию нафталина по альтернативному, не характерному для псевдомонад, пути, включающему образование *орто*-фталевой кислоты. В данной работе методом масс-спектрометрии впервые показано, что образующийся в следовых количествах и неметаболизируемый далее ассоциат салициловой кислоты накапливался в ростовой среде в виде димера.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Rhodococcus opacus*, нафталин, салициловая кислота, *орто*-фталевая кислота, 2-гидроксикоричная кислота, гены биodeградации, ферментативная активность.

DOI: 10.31857/S0320972520030112

В ряду полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) нафталин представляет собой самое простое соединение. Учитывая его высокую токсичность и присутствие в отходах химической и нефтеперерабатывающей промышленности, нафталин следует рассматривать как поллютант приоритетного значения. Нафталин, как и другие ПАУ, попадает в окружающую среду также в результате неполного сгорания органических соединений, пиролизических про-

цессов, разлива и переработки нефти, уничтожения бытовых отходов и использования фумигантов и дезодораторов [1, 2].

Биохимические пути и генетические системы биodeградации нафталина наиболее полно изучены у бактерий рода *Pseudomonas* и родственных видов [3–8]. Гены деградации ПАУ у них имеют, как правило, плазмидную локализацию [9–11], но могут располагаться и на бактериальной хромосоме [12]. Для генов катаболизма нафталина характерна оперонная организация. «Верхний» оперон (*nah1*-оперон) кодирует белки, окисляющие нафталин до салицилата; «нижний» оперон (*nah2*- или *sal*-оперон) включает в себя гены, ответственные за окисление салицилата до пирокатехина с последующим расщеплением последнего по *мета*-пути до метаболитов цикла Кребса [9]. Эти опероны генетически тесно связаны друг с другом и их общим регуляторным геном *nahR*.

Принятые сокращения: ГДО – гентизатдиоксигеназа; КОЕ – колониеобразующие единицы; МЦИ – муконатциклоизомераза; НДО – нафталин-1,2-диоксигеназа; ПАУ – полициклические ароматические углеводороды; ПК-1,2-ДО – пирокатехин-1,2-диоксигеназа; ПК-2,3-ДО – пирокатехин-2,3-диоксигеназа; ПКК – протокатеховая кислота; ИСГ – салицилат-1-гидроксилаза; ТСХ – тонкослойная хроматография.

* Адресат для корреспонденции.

Большинство грамотрицательных бактерий характеризуются сходными путями метаболизма нафталина. Молекулярные основы этого процесса детально исследованы ранее [13, 14]. На первом этапе происходит окисление субстрата молекулярным кислородом с участием фермента нафталин-1,2-диоксигеназы (НДО; КФ 1.14.12.12), что приводит к образованию *цис*-нафталиндигидродиола [15, 16]. Далее *цис*-нафталиндигидродиол трансформируется до 1,2-дигидрокси-нафталина, который в ходе последовательных реакций превращается в салицилат. Салицилат-1-гидроксилаза (1СГ; КФ 1.14.13.1) окисляет салицилат с образованием пирокатехина [7, 17, 18], салицилат-5-гидроксилаза (5СГ; КФ 1.14.13.172) тот же субстрат трансформирует в гентизиновую кислоту [19, 20]. Пирокатехин далее конвертируется по путям *орто*- или *мета*-расщепления, ключевыми ферментами которых являются, соответственно, пирокатехин-1,2-диоксигеназа (ПК-1,2-ДО; КФ 1.13.11.1) и пирокатехин-2,3-диоксигеназа (ПК-2,3-ДО; КФ 1.13.11.2) [21]. Гентизат, в свою

очередь, расщепляется гентизат-1,2-диоксигеназой (ГДО; КФ 1.13.11.4) [22–24] (рис. 1). Продукты окисления пирокатехина и гентизиновой кислоты в конечном итоге поступают в цикл трикарбоновых кислот [9, 20, 25, 26].

Хотя изначально считалось, что гентизиновый путь менее распространен, чем пирокатехиновый, впоследствии ГДО в составе метаболического пути деградации нафталина была обнаружена не только у бактерий рода *Pseudomonas* [27–30]. Исследование деструкции нафталина псевдомонадами положило начало изучению метаболизма ПАУ в целом и стимулировало работы по характеристике биохимических путей деградации нафталина у бактерий разных таксономических групп [31].

Процесс деструкции нафталина у грамположительных бактерий, в частности у представителей рода *Rhodococcus*, изучен в значительно меньшей степени [31, 32]. Информация в основном касается организации генов, кодирующих нафталин-1,2-диоксигеназу (*narAa* и *narAb*) и дигидродиолдегидрогеназу (*narB*) [33]. Отличи-

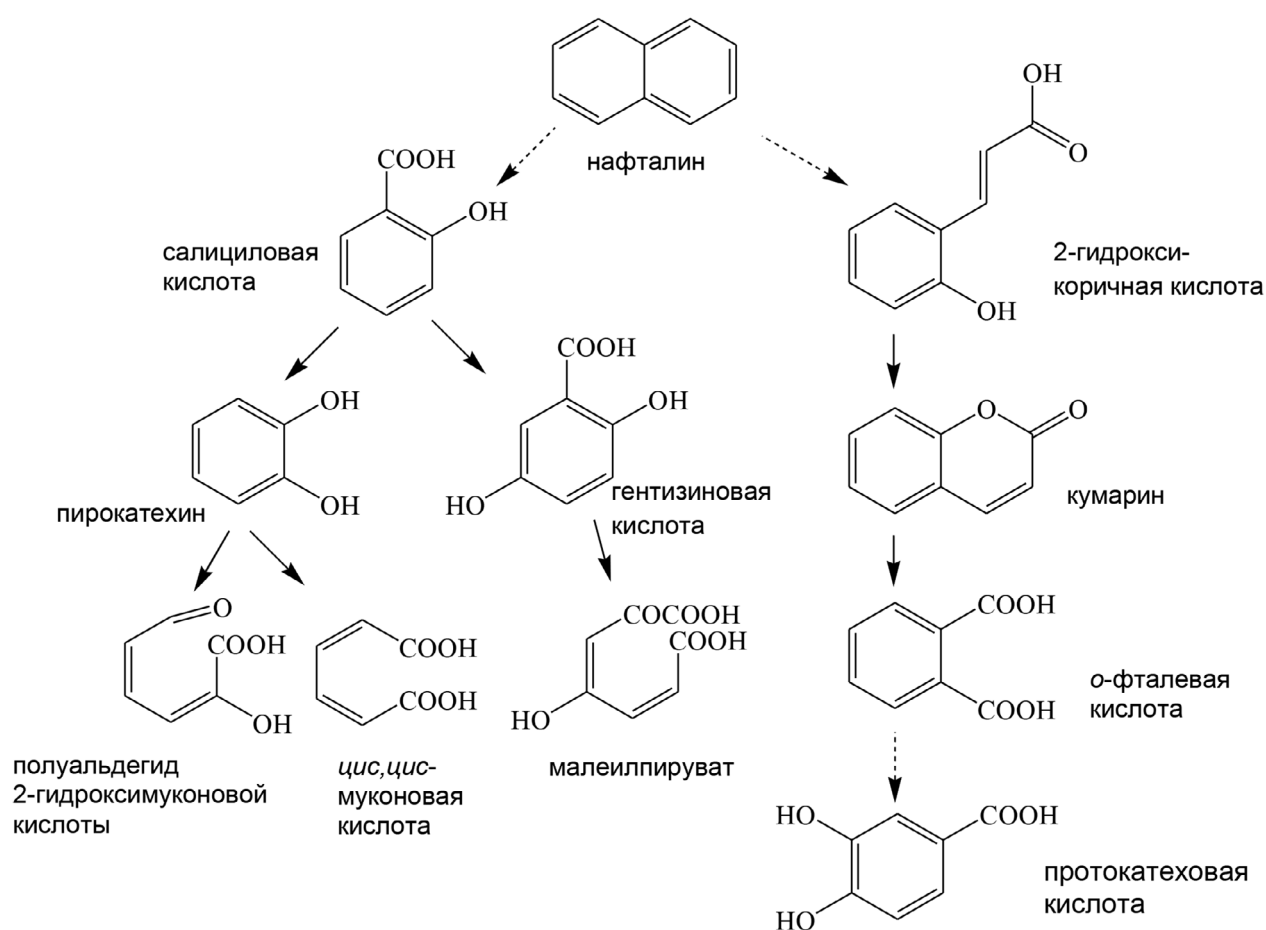


Рис. 1. Начальные этапы деструкции нафталина бактериями различных таксономических групп

тельной особенностью родококков является то, что гены, ответственные за первые этапы деградации нафталина, не организованы в единый кластер, как у псевдомонад. У разных штаммов *Rhodococcus* в геноме присутствует несколько гомологичных участков, разделенных неомологичными последовательностями, включая прямые и инвертированные повторы [34, 35]. Различия также касаются участия предполагаемого регулятора транскрипции GntR (*narR1* и *narR2*), характерного для ряда родококков [35].

Информация о путях деградации нафталина родококками ограничена и противоречива. Показано, что утилизация нафталина у штаммов *Rhodococcus* sp. B4 и *Rhodococcus* sp. NCIMB 12038 проходит по пути, характерному для псевдомонад, с салицилатом в качестве центрального интермедиата [36, 37]. В ряде случаев у родококков салициловая кислота, образующаяся в результате трансформации нафталина, превращается в гентизиновую [36, 38]. Штамм *R. wratislaviensis* IFP 2016 способен разлагать 11 ароматических соединений, включая нафталин, однако путь деградации нафталина у него детально не изучен [32]. Особый интерес представляет штамм *R. opacus* M213, у которого разложение нафталина происходит с образованием не салицилата, а производных коричной кислоты [31].

Таким образом, анализ имеющихся литературных данных показывает, что у микроорганизмов наиболее полно исследованы пути разложения нафталина, в которых центральным метаболитом является салицилат. Тем не менее ряд работ указывает на то, что у грамположительных бактерий, скорее как исключение, разложение нафталина происходит по альтернативным путям.

Исследуя способность родококков-деструкторов ПАУ разлагать нафталин, мы обнаружили, что эти культуры росли в минеральной среде с нафталином в качестве ростового субстрата, но не были способны к росту в минеральной среде с салицилатом. Целью данной работы являлось изучение метаболизма нафталина у штамма *R. opacus* 3D, выделенного из активного ила очистных сооружений. Особое внимание было уделено идентификации интермедиатов деградации нафталина, выявлению биохимических особенностей этого процесса и обнаружению генов, потенциально вовлеченных в процесс разложения нафталина у данного штамма.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. Для приготовления минеральных сред были использованы реактивы фирм-произ-

водителей «Реахим» (СССР), «AppliChem» (США) и «Panreac» (США). Биохимические реактивы были получены от фирм «Sigma-Aldrich» (США) и «Serva» (Германия), реактивы для молекулярно-биологических работ — от фирм «Thermo Fischer Scientific» (США), «Zymo Research» (США) и «Биоком» (Россия).

Бактериальные штаммы. В данной работе были использованы бактериальные штаммы-деструкторы рода *Rhodococcus*, выделенные ранее из различных загрязненных источников. Культур, использованные в работе, указаны в табл. 1. Из-за отсутствия в коллекции штамма родококка, обладающего фенотипом Nah⁺Sal⁺, в качестве контроля был выбран штамм *Pseudomonas chlororaphis* OV17(pOV17), утилизирующий нафталин или салицилат как единственный источник углерода и энергии.

Условия культивирования. Штаммы выращивали в минеральной среде следующего состава (г/л): Na₂HPO₄ — 0,73; KH₂PO₄ — 0,35; MgSO₄ × 7H₂O — 0,1; NaHCO₃ — 0,25; MnSO₄ × 5H₂O — 0,002; NH₄NO₃ — 0,75; FeSO₄ × 7H₂O — 0,02 («Реахим», СССР). Для получения агаризованной среды добавляли 1,5% агара («Difco», США).

Ростовые субстраты использовали в следующих концентрациях: сукцинат, глутамат, нафталин — 0,5–1,0 г/л; гентизат, протокатехоат, пирокатехин, орто-фталат, 2-гидроксикоричная и 2-карбоксикоричная кислоты — 0,2–0,5 г/л; салицилат — 0,1–1,0 г/л (все реактивы производства «Sigma-Aldrich», США и «Thermo Fischer», Германия). Нерастворимые в воде ароматические кислоты вносили в ростовую среду в виде солей натрия. При выращивании штамма на агаризованной среде летучие ароматические соединения (нафталин, кумарин) наносили на крышку перевернутой чашки Петри. Бактерии культивировали при 30 °С на чашках или в жидкой среде на качалке (150 об/мин) в 750-мл колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл среды.

Интенсивность роста микроорганизмов оценивали спектрофотометрически (UV-1800, «Shimadzu», Япония) по поглощению света при длине волны 560 нм и/или подсчетом колониеобразующих единиц (КОЕ) в культуральной жидкости. Количество клеток определяли методом 10-кратных серийных разведений с последующим высевом на агаризованную среду LB. Пробы отбирали в течение 3–5 сут через каждые 24 ч. Начальная концентрация клеток для штамма *R. opacus* 3D составляла $6,3 \times 10^7$ – $8,0 \times 10^7$ КОЕ/мл (A_{560} 0,28 ± 0,02), а для *P. chlororaphis* OV17(pOV17) — $2,2 \times 10^8$ – $2,6 \times 10^8$ КОЕ/мл (A_{560} 0,16 ± 0,02).

Биомассу для определения в ней ферментативных активностей выращивали на агаризо-

Таблица 1. Штаммы, использованные в данной работе, и их фенотипическая характеристика

Штамм	Источник выделения	Фенотип (окисляемые субстраты)
<i>R. opacus</i> 3D	активный ил очистных сооружений, г. Пушкино, Московская обл., 2016	Наф ⁺ Сал ⁺ Гент ⁺ о-Фт ⁺ ПКК ⁺ 2ГКор ⁺ Кум ⁺
<i>R. opacus</i> 1CP	накопительная культура, поддерживаемая в течение нескольких месяцев с 2,4-дихлорфенолом [39]	Наф ⁺ /-Сал ⁺ Гент ⁺ о-Фт ⁺ ПКК ⁺ 2ГКор ⁺ Кум ⁺
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap (L5A-BSU)	почва, загрязненная нефтепродуктами, Ливия [40]	Наф ⁺ Сал ⁺ Гент ⁺ о-Фт ⁺ ПКК ⁺ 2ГКор ⁺ Кум ⁺
<i>R. wratislaviensis</i> G10-Ph	штамм <i>R. wratislaviensis</i> G10 выделен из почвы, загрязненной галогенсодержащими ароматическими соединениями (ОАО «Галоген», Пермь) [41]; использованный в данной работе вариант штамма не утилизировал салицилат	Наф ⁺ Сал ⁺ Гент ⁺ о-Фт ⁺ ПКК ⁺ 2ГКор ⁺ Кум ⁺
<i>Rhodococcus</i> sp. K NAH1	донные отложения Балтийского моря, Финский залив, д. Кандикюля [42]	Наф ⁺ Сал ⁺ Гент ⁺ о-Фт ⁺ ПКК ⁺ 2ГКор ⁺ Кум ⁺
<i>Rhodococcus</i> sp. Dor2*	почва, загрязненная отходами нефтехимического производства, г. Стерлитамак, Башкортостан, 2000 г.	Наф ⁺ Сал ⁺ Гент ⁺ о-Фт ⁺ ПКК ⁺ 2ГКор ⁺ Кум ⁺
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> OV17(pOV17)	ризосфера растений, почва, загрязненная нефтью, Западная Сибирь [43]	Наф ⁺ Сал ⁺ Гент ⁺ о-Фт ⁺ ПКК ⁺ 2ГКор ⁺ Кум ⁺

Примечание. Интермедиаты деградации нафталина добавляли в среду до конечной концентрации 0,2 г/л. Наф – нафталин, Сал – салицилат, Гент – гентизат, о-Фт – о-фталат, ПКК – протокатеховая кислота, 2ГКор – 2-гидроксикоричная кислота, Кум – кумарин.

* Штамм *Rhodococcus* sp. Dor2, обладающий фенотипом Наф⁺Сал⁺, был использован в работе в качестве отрицательного контроля при проведении ПЦР.

ванной минеральной среде в парах нафталина в течение трех суток. Штамм *P. chlororaphis* OV17(pOV17) выращивали в жидкой минеральной среде в присутствии салицилата (0,5 г/л) в течение 14 ч. Для определения активности ферментов в неиндуцированных клетках бактерии культивировали в жидкой минеральной среде, содержащей 0,5 г/л сукцината или глутамата. Клетки отмывали 0,05 М калий-фосфатным буфером (рН 7,0), ресуспендировали в 4–5 мл этого буфера, добавляли дитиотрейтол до конечной концентрации 5 мМ, MnSO₄ до конечной концентрации 2 мМ, замораживали и хранили до использования при –20 °С.

ПЦР-анализ целевых генов. Выделение ДНК проводили с использованием набора реактивов «DiatomtmDNAprep» («Биоком», Россия) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе, представлены в табл. 2.

Конструирование праймеров для амплификации генов фталат-3,4-диоксигеназы (*phf3*, *4DO*) и салицилат-1-гидроксилазы (*salI*) осуществляли с использованием программы PrimerQuest Tool (<http://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Предсказание термодинамических параметров, третичных структур олигонуклеотидов проводи-

ли с использованием OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Проверку специфичности праймеров осуществляли в Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Амплификацию генов проводили на приборе GeneAmp PCR System 9700 («Applied Biosystems», США) при следующих условиях: первичная денатурация – 95 °С, 5 мин; далее 30 циклов: 95 °С – 30 с, отжиг праймеров – 30 с (температура отжига указана для каждой пары праймеров в табл. 2), 72 °С – 40 с; конечная элонгация – 72 °С – 5 мин. Продукты реакции разделяли методом электрофореза в агарозном геле (1,0%) при напряжении 10 В/см. Гель окрашивали раствором бромистого этидия (5 мкг/мл) и фотографировали в УФ-свете с использованием системы гель-документирования Gel Doc™ XR («Bio-Rad», США). Taq ДНК-полимераза, компоненты для ПЦР, концентрированный буфер для электрофореза и маркер GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0311) были производства «Fermentas» (Литва).

Секвенирование гена 16S рРНК штамма *R. opacus* 3D и филогенетический анализ. Выделение и очистку ПЦР-продукта гена, кодирующего 16S рРНК, осуществляли с использованием

Таблица 2. Праймеры, использованные в данной работе

Белок (целевой ген)	Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (5'–3')	Температура отжига праймера, °C	Размер ПЦР-продукта, п.н.	Ссылка
Малая субъединица рРНК (<i>rrs</i>)	27F 1492R	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG TACGGHTACCTTGTTACGACTT	55	1465	[44]
Нафталиндиокси-геназа (<i>ndo</i>)	Forward Reverse	GCATGAGAGTGAGATCCCC ACTTCCCGTGTGCTGTAG	55	211	[45]
Салицилат-1-гидроксилаза (<i>salI</i>)	Forward Reverse	AGTGGGGCATCTTCGAYGMNATYGC GTCGACCGGGTCGATRTCRTAVAC	63	642	данная работа
Фталат-3,4-диоксигеназа (<i>pht3, 4DO</i>)	Forward Reverse	CGACAACCTGGTSTYTCGCCA TCTTCCAGTCGTAGTCGTACT	54	688	данная работа
Фталат-3,4-диоксигеназа (<i>ophA1A2</i>)	Forward Reverse	ATGGAAGACATTCGCCGC TCATAGGAACACCGCGAG	55	2056	[46]
Пирокатехин-2,3-диоксигеназа (<i>edoA</i>)	LK16 LK14	GAGGACCCGAGCGGAATCA GACCGCAGCGGCTACGGGT	64	663	[47]
Пирокатехин-2,3-диоксигеназа (<i>edoB</i>)	LK33 LK38	CGCATCGAGGCCACCGAC CGACGGGTCCTCGAACGTGA	61	306	[47]
Пирокатехин-2,3-диоксигеназа (<i>edoC</i>)	VD11 VD14	GGTTACATGGGCTTCGAG CTCCGCCGACTTCTCCAG	58	1096	[47]
Пирокатехин-2,3-диоксигеназа (<i>edoD</i>)	VD6 VD3	CTTCTACAAGCTCATGCC CCGGTCGCTGCCTCGAGC	64	403	[47]
Протокатехоат-3,4-диоксигеназа (<i>pcaG-pcaH</i>)	2F 2R	TGCCCNTACCACGGCTG GCDCCGAKCTTCCAGTT	59	300	[48]
Протокатехоат-3,4-диоксигеназа (<i>pcaH</i>)	pcaH_260f pcaH_749r	CAACGCCGACATCGCCAA GAATCCGACGGCCCCAGTTGT	54	489	[49]
Пирокатехин-1,2-диоксигеназа (<i>catA2</i> , GenBank FM877593.1)	cat4f cat4r	AAATTCAAGGGCGCAAG GAGTTCGGGTTTCGTTG	52	720	[49]
Пирокатехин-1,2-диоксигеназа (<i>catA</i> , GenBank X99622.2)	cat6f cat6r	CGACAAGTTCAAGGCCGAG CACGAAGTTGTAGGTGACGTAG	52	780	[49]

набора ZymoClean Gel DNA Recovery Kit («Zymo Research», США) согласно инструкциям фирмы-производителя. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе ABI Prism 373 3130XL («Applied Biosystems», США).

Предварительный филогенетический скрининг сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК осуществляли в базе данных GenBank (NCBI) с помощью пакета программ BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Для более точного определения филогенетического положения исследуемого штамма полученную последовательность гена 16S рРНК выравнивали с

соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий с помощью программы CLUSTAL W [50].

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма *R. opacus* 3D длиной 1374 п.н. помещена в GenBank под номером MN553083.

Определение активностей ферментов в бесклеточных экстрактах. Клетки разрушали экстракционной дезинтеграцией на прессе типа Хьюза («ИБФМ-пресс», Россия) с рабочим давлением 3200 кг/см². После дезинтеграции клеточный дебрис удаляли центрифугированием (10 000 g,

4 °С, 30 мин) в присутствии следовых количеств ДНКазы. Супернатант использовали в качестве бесклеточного экстракта для определения активностей ферментов. В реакционную смесь с конечным объемом 1,0 мл вносили 5–50 мкл экстракта. Определение активностей проводили при 25 °С, начиная реакцию внесением бесклеточного экстракта, на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Япония).

Активность нафталиндиоксигеназы определяли спектрофотометрически по убыли NADH («Sigma-Aldrich», Германия) (A_{340} , ϵ 6220 M⁻¹ см⁻¹) в реакционной смеси, содержащей 0,1 мМ NADH и 0,1 мМ нафталин (спиртовой раствор), бесклеточный экстракт и 50 мМ фосфатный буфер (pH 7,5), учитывая эндогенное потребление NADH бесклеточным экстрактом [51].

Активность салицилат-1-гидроксилазы определяли спектрофотометрически по убыли NADH (A_{340} , ϵ 6220 M⁻¹ см⁻¹) в реакционной смеси, содержащей 0,1 мМ NADH и 0,1 мМ салицилат, бесклеточный экстракт и 50 мМ фосфатный буфер (pH 7,5), учитывая эндогенное потребление NADH бесклеточным экстрактом [52].

Активность пирокатехин-2,3-диоксигеназы определяли по скорости образования 2-гидроксимуконowego полуальдегида (A_{375} , ϵ 33 400 M⁻¹ см⁻¹) в реакционной смеси, содержащей 0,25 мМ пирокатехин, бесклеточный экстракт и 50 мМ Tris-HCl-буфер (pH 7,5) [53].

Активность пирокатехин-1,2-диоксигеназы определяли по скорости образования *цис,цис*-муконата (A_{260} , ϵ 16 900 M⁻¹ см⁻¹) в реакционной смеси, содержащей 5 мМ ЭДТА, 0,25 мМ пирокатехин, бесклеточный экстракт и 50 мМ фосфатный буфер (pH 7,0) [53].

Активность гентизат-1,2-диоксигеназы определяли по скорости образования малеилпирувата (A_{330} , ϵ 10 800 M⁻¹ см⁻¹) в реакционной смеси, содержащей 0,1 мМ гентизат, бесклеточный экстракт и 100 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4) [54].

Активность протокатехоат-3,4-диоксигеназы определяли по убыли протокатехоата (A_{290} , ϵ 2870 M⁻¹ см⁻¹) в реакционной смеси, содержащей 0,25 мМ протокатехоат и бесклеточный экстракт в Tris-ацетатном буфере (pH 7,5) [55].

Удельную активность ферментов выражали в микромолях потребленного субстрата или образующегося продукта в минуту на 1 мг общего бактериального белка. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по модифицированному методу Бредфорда [56].

Определение интермедиатов деградации нафталина. Анализ метаболитов, накапливающихся в культуральной жидкости при росте клеток в

минеральной среде с нафталином, проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и масс-спектрометрии. Бактериальную культуру выращивали в жидкой минеральной среде с нафталином (1,0 г/л) или салицилатом (0,2 г/л) в качестве единственных источников углерода и энергии. При культивировании штамма в минеральной среде с нафталином пробы (100 мл) отбирали при засеве и после одних, двух и трех суток культивирования. В опыте, в котором в качестве ростового субстрата был использован салицилат, пробы отбирали в момент засева и через трое суток. Абиотическим контролем служили образцы, содержавшие 0,2 г/л салицилата.

Отобранные пробы экстрагировали 30 мл этилацетата при интенсивном встряхивании, далее культуральную жидкость подкисляли HCl до pH 2,0 и повторно экстрагировали этилацетатом. Этилацетатную фракцию отбирали, обезвоживали сульфатом натрия, упаривали и растворяли в 200 мкл ацетона.

Для ТСХ применяли силикагелевые пластины с флуоресцентным индикатором («Fluka», Германия) и систему растворителей бензол : диоксан : уксусная кислота (90 : 10 : 2). R_f определяли как отношение подвижности метаболита к подвижности фронта. В качестве стандартов использовали следующие соединения: нафталин, салициловую кислоту, пирокатехин, протокатеховую, гентизиновую и *о*-фталевую кислоты, кумарин.

Суммарные экстракты анализировали методом масс-спектрометрии на приборе низкого разрешения LCQ Advantage MAX («Thermo-Finnigan», Германия) с использованием одноканального шприцевого насоса для прямой инфузии метанольного раствора образца в область химической ионизации при атмосферном давлении (APCI). В ходе анализа применяли различные условия работы источника ионов: нормализованная энергия столкновений 10–40% при скорости высушивающего газа 50 мл/мин и температуре капилляра 240 °С. Масс-спектрометрические данные собирали и обрабатывали с помощью программного обеспечения Xcalibur™. Детекцию проводили как в положительных, так и в отрицательных ионах. МС/МС-спектры получали, используя в качестве предшественников как протонированные $[M+H]^+$, так и депротонированные молекулы $[M-H]^-$. Идентификацию метаболитов осуществляли с использованием стандартных образцов исследуемых соединений.

Определение концентрации салициловой кислоты. Метод основан на способности салицилата реагировать с нитратом железа (III) с образо-

ванием комплекса фиолетового цвета, интенсивность окрашивания которого зависит от концентрации салицилата [57]. Концентрацию салициловой кислоты определяли спектрофотометрически по калибровочной кривой с помощью спектрофотометра UV-1800 («Shimadzu», Япония). Для этого супернатант, полученный после осаждения клеток (0,5 мл), разводили дистиллированной водой до 3 мл. Затем добавляли 0,5 мл 5%-ного раствора $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ и 0,5 мл 1%-ной HNO_3 . Пробирки инкубировали 10 мин при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность раствора при 540 нм.

Статистическая обработка данных. Средние значения и стандартные ошибки среднего арифметического были получены по данным трех независимых экспериментов с использованием программы Microsoft Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рост бактерий рода *Rhodococcus* на минеральной среде с нафталином и ароматическими субстратами – потенциальными интермедиатами его деградации. На первом этапе работы проверяли способность бактерий-деструкторов нафталина, принадлежащих к роду *Rhodococcus* и выделенных ранее из различных загрязненных источников, к росту в минеральной среде с салицилатом в качестве единственного источника углерода и энергии. Из пяти штаммов, утилизирующих нафталин, ни один не рос в присутствии салицилата. Факт, что ни один из родококков, утилизирующих нафталин, не разлагал салицилат, позволил предположить, что у бактерий рода *Rhodococcus* имеется альтернативный путь деградации нафталина.

Эти штаммы были проверены на способность расти в минеральной среде в присутствии других потенциальных, согласно литературным данным, интермедиатах разложения нафталина: солей гентизиновой, *o*-фталевой, протокатехо-

вой, 2-карбоксикоричной, 2-гидроксикоричной кислот и кумарина. Три из пяти проверенных штаммов использовали в качестве источника углерода и энергии каждый из протестированных субстратов, кроме салицилата (табл. 1). Один из этих штаммов, *R. opacus* 3D, был отобран для дальнейших исследований.

Штамм *R. opacus* 3D (ВКМ Ас-2848) был выделен ранее из активного ила сточных вод очистных сооружений (г. Пущино, Московская обл.) методом прямого высева на агаризованной минеральной среде с нафталином в качестве единственного ростового источника. Для определения таксономического положения изолята была определена нуклеотидная последовательность гена 16S рПНК длиной 1374 п.н. Анализ последовательности показал, что штамм относится к классу *Actinobacteria*, роду *Rhodococcus* и имеет высокий уровень сходства гена 16S рПНК (99,93%) с типовым штаммом *R. opacus* DSM 43205 (LN827919). На основании полученных данных штамм был отнесен нами к виду *R. opacus*. Последовательность гена 16S рПНК была помещена в GenBank под номером MH553083.

Культивирование *R. opacus* 3D в жидкой минеральной среде с нафталином и салицилатом. Динамику роста штамма *R. opacus* 3D исследовали в жидкой минеральной среде с нафталином (1,0 г/л) и салицилатом (0,2 г/л) в течение 72 ч (рис. 2). Через каждые 24 ч отбирали пробы для измерения поглощения света, количества КОЕ и веса сухой биомассы.

При культивировании штамма *R. opacus* 3D в минеральной среде с нафталином в качестве ростового субстрата количество КОЕ в начале эксперимента составляло $6,3 \times 10^7$ КОЕ/мл. Фаза активного роста культуры продолжалась в течение 24 ч культивирования (рис. 2, а, кривая 1). За это время концентрация клеток достигала максимума и составляла $2,4 \times 10^8$ КОЕ/мл, что соответствовало значению поглощения 1,3 о.е. Результаты измерения прироста биомассы клеток приведены в табл. 3. Как видно из представленных данных, вес сухой биомассы к концу эксперимента увеличился примерно на порядок и составил (730 ± 40) мг/л.

Рост штамма *R. opacus* 3D отсутствовал в жидкой минеральной среде, содержащей салицилат в диапазоне концентраций 0,1–1,0 г/л, при этом количество салицилата не снижалось в процессе культивирования в течение 3–7 суток. На рис. 2, а (кривая 2) приведены данные культивирования штамма при концентрации салицилата 0,2 г/л. Показано, что в течение 72 ч эксперимента численность клеток незначительно уменьшалась: 0 ч – $8,0 \times 10^7$ КОЕ/мл, 72 ч – $5,1 \times 10^7$ КОЕ/мл.

Таблица 3. Вес сухой биомассы штамма *R. opacus* 3D при культивировании в минеральной среде с нафталином и салицилатом

Ростовой субстрат	Вес сухой биомассы (мг/л)		
	0 ч	24 ч	72 ч
Нафталин (1 г/л)	80 ± 10	590 ± 30	730 ± 40
Салицилат (0,2 г/л)	80 ± 10	н.о.	80 ± 10

Примечание. н.о. – не определяли.

Отсутствие роста *R. opacus* 3D в минеральной среде с салицилатом может указывать на наличие неполного пути окисления нафталина. В этом случае следует ожидать накопления салицилата в культуральной жидкости при выращивании клеток в среде с нафталином. Однако количество салицилата при росте штамма *R. opacus* 3D в минеральной среде с нафталином, добавленным в качестве единственного ростового субстрата, было незначительным (3–10 мг/л) и сохранялось на этом уровне в течение всего эксперимента (рис. 2, б). Следует отметить, что количество салицилата, внесенного в минеральную среду в качестве единственного ростового субстрата, также не уменьшалось. Исходя из полученных данных, можно предположить, что

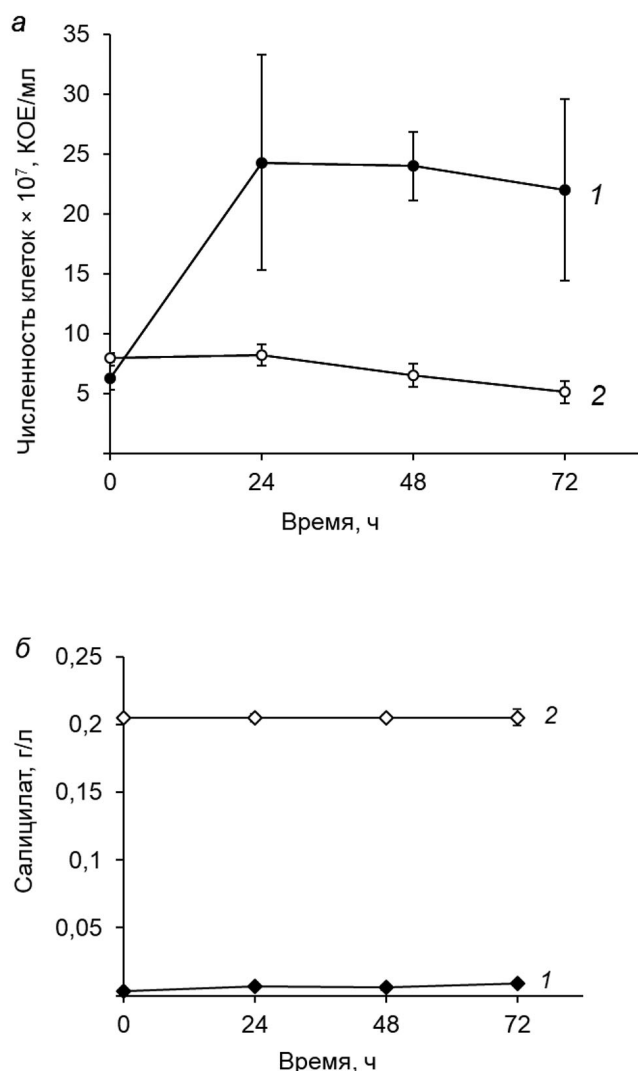


Рис. 2. Рост штамма *R. opacus* 3D в минеральной среде с нафталином и салицилатом (а) и содержание салицилата в среде (б); 1 – культивирование в присутствии нафталина (1,0 г/л), 2 – культивирование в присутствии салицилата (0,2 г/л)

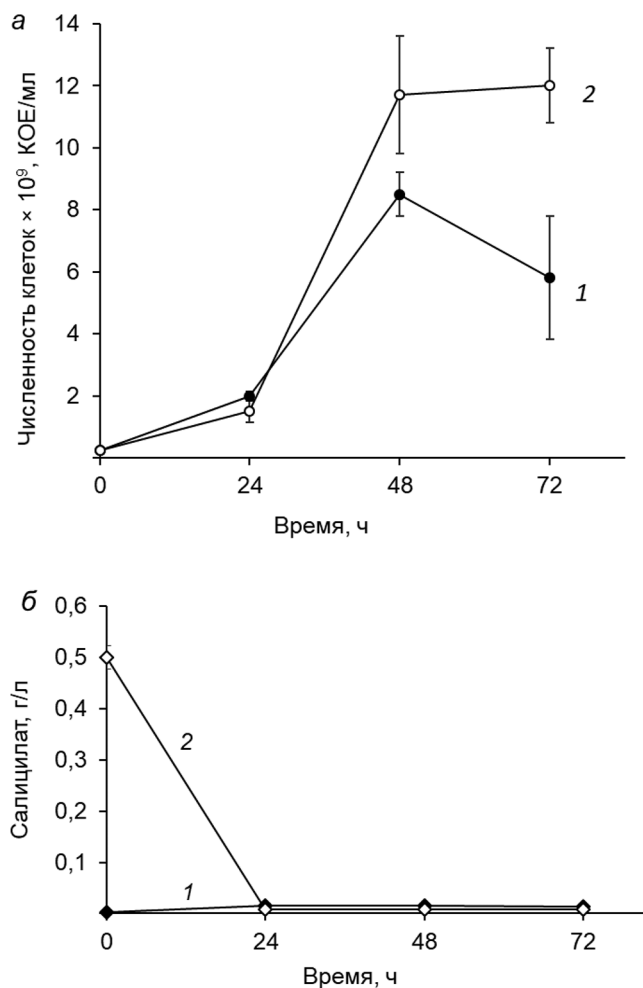


Рис. 3. Рост штамма *P. chlororaphis* OV17(pOV17) в минеральной среде с нафталином и салицилатом (а) и содержание салицилата в среде (б); 1 – культивирование в присутствии нафталина (1,0 г/л), 2 – культивирование в присутствии салицилата (0,5 г/л)

утилизация нафталина у штамма *R. opacus* 3D не включает образования салицилата в качестве ключевого интермедиата и происходит по альтернативному биохимическому пути.

Из-за отсутствия в коллекции штамма родококка, обладающего фенотипом Nah⁺Sal⁺, в качестве контроля был использован штамм *P. chlororaphis* OV17(pOV17), растущий в минеральной среде с нафталином или салицилатом и разлагающий нафталин по классическому для грамотрицательных бактерий пути (рис. 1). При культивировании штамма максимальный титр клеток наблюдался к концу вторых суток и составлял $8,5 \times 10^9$ КОЕ/мл при использовании нафталина и $1,2 \times 10^{10}$ КОЕ/мл при использовании салицилата (рис. 3). При этом концентрация салицилата, образующегося в качестве интермедиата при утилизации нафталина псевдомонадой, не превышала в среде 16 мг/л. При ис-

пользовании в качестве ростового субстрата в концентрации 500 мг/л салицилат разлагался полностью за 24 ч. Далее в культуральной жидкости наблюдалось только остаточное количество субстрата (не более 8 мг/л).

Активность ферментов при росте культур в присутствии нафталина. Для изучения пути окисления нафталина у *R. opacus* 3D были исследованы активности ферментов, потенциально вовлеченных в метаболизм этого соединения (табл. 4). Было установлено, что активность диоксигеназ: гентизат-1,2-диоксигеназы, пирокатехин-1,2- и 2,3-диоксигеназ, протокатехоат-3,4-диоксигеназы — была незначительной. Полностью отсутствовала активность салицилат-1-гидроксилазы и муконатциклоизомеразы. Таким образом, полученные данные свидетельствовали об отсутствии индукции основных ферментов деструкции нафталина. Для определения уровня активности пула диоксигеназ в неиндуцированных клетках штамм *R. opacus* 3D выращивали в минеральной среде, содержащей сукцинат (табл. 4). Величины удельной активности сравниваемых ферментов в клетках, выращенных в минеральной среде с нафталином или сукцинатом в качестве ростовых субстратов, отличались незначительно, что указывает на то, что синтез этих ферментов носит конститутивный характер, и нафталин не является для них индуктором. У *P. chlororaphis* OV17(pOV17) при росте в минеральной среде с нафталином или салицилатом были ожидаемо определены активности 1СГ и обеих ПК-ДО (табл. 4). При этом активность ПК-2,3-ДО была в 3–8 раз выше активности ПК-1,2-ДО.

Идентификация интермедиатов разложения нафталина. При проведении ТСХ было показан-

но, что в экстрактах культуральной жидкости штамма *R. opacus* 3D, выращенного в минеральной среде с нафталином, накапливается целый ряд соединений (до 10 пятен в зависимости от времени культивирования). Эти соединения различались по окрашиванию в видимом свете, УФ-флуоресценции и по значениям R_f . К третьим суткам культивирования интенсивность некоторых пятен уменьшалась. Пятна с R_f 0,69 (слабая интенсивность) и 0,75 были сходны по значениям R_f и характеру флуоресценции с салицилатом и кумарином, которые использовались в качестве стандартов. При культивировании штамма в присутствии салицилата в культуральной жидкости детектировалось только данное соединение.

Перечень метаболитов, идентифицированных методом масс-спектрометрии в экстрактах культуральной жидкости, приведен в табл. 5. Анализ экстрактов, полученных при выращивании штамма *R. opacus* 3D в присутствии нафталина, показал, что после первых суток роста в культуральной жидкости детектируются кумарин, салициловая, *o*-фталевая и 2-карбоксикоричная кислоты. Максимальное содержание кумарина и *o*-фталевой кислоты наблюдалось на вторые сутки, на третьи сутки эти соединения не обнаруживались. Салициловая кислота присутствовала в течение всего периода культивирования (1–3 сутки), тогда как 2-гидроксикоричная кислота была обнаружена только на третьи сутки культивирования. В это же время в экстракте был выявлен ассоциат салициловой кислоты, накапливающийся в ростовой среде в виде димера (следовые количества). Протокатеховая кислота, один из потенциальных метаболитов пути деградации нафталина и *o*-фталевой

Таблица 4. Удельная активность ферментов биodeградации нафталина у штаммов *R. opacus* 3D и *P. chlororaphis* OV17(pOV17)

Фермент	Удельная активность, мкмоль/мин на 1 мг белка				
	<i>R. opacus</i> 3D		<i>P. chlororaphis</i> OV17(pOV17)		
	нафталин	сукцинат	нафталин	салицилат	глутамат
СГ	< 0,001	< 0,001	0,011 ± 0,001	0,31 ± 0,06	0,011 ± 0,001
ПК-1,2-ДО	0,009 ± 0,003	0,006 ± 0,003	0,054 ± 0,009	0,043 ± 0,006	0,018 ± 0,001
ПК-2,3-ДО	0,007 ± 0,002	0,002 ± 0,000	0,456 ± 0,003	0,11 ± 0,01	0,28 ± 0,01
Г-1,2-ДО	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,001	н.о.	< 0,001	н.о.
ПКК-3,4-ДО	0,012 ± 0,009	0,021 ± 0,003	н.о.	< 0,001	н.о.
МЦИ	< 0,001	< 0,001	н.о.	н.о.	н.о.

Примечание. СГ — салицилатгидроксилаза; ПК-1,2-ДО — пирокатехин-1,2-диоксигеназа; ПК-2,3-ДО — пирокатехин-2,3-диоксигеназа; Г-1,2-ДО — гентизат-1,2-диоксигеназа; ПКК-3,4-ДО — протокатехоат-3,4-диоксигеназа; МЦИ — муко-натциклоизомераза; н.о. — не определяли.

Таблица 5. Масс-спектрометрическая характеристика интермедиатов, образующихся при культивировании штамма *R. opacus* 3D в присутствии нафталина и салицилата

Ростовой субстрат	Метаболит	Визуальная оценка по интенсивности пиков			Энергия коллизии/молекулярный ион и характеристические пики в МС/МС-спектрах (интенсивность, %)	
		1-е сут	2-е сут	3-и сут	[M-H] ⁻	[M+H] ⁺
Нафталин (1,0 г/л)	кумарин	+	++	—	—	28/147(100), 103(32)
	салициловая кислота	+	+	+	28/137(100), 93(95)	21/139(90), 138(16), 121(100)
	<i>o</i> -фталевая кислота	+	++	—	26/165(28), 121(100)	16/167(48), 149(100)
	2-карбоксикоричная кислота	+	+	+	21/191(100), 147(85)	30/193(100), 175(32), 133(91)
	2-гидроксикоричная кислота	—	следы	+	24/163(80), 119(100)	19/165(95), 147(100), 123(65)
	ассоциат салициловой кислоты	—	—	следы	16/275(91), 137(100)	—
Салицилат (0,2 г/л)	салициловая кислота	н.о.	н.о.	+	28/137(100), 93(95)	21/139(90), 138(16), 121(100)
	ассоциат салициловой кислоты	н.о.	н.о.	++	16/275(91), 137(100)	—

Примечание. (++) — интенсивность 100%; (+) — интенсивность 30% по сравнению со 100%; (—) — метаболит не детектировался; н.о. — не определяли.

кислоты, не определялась в течение всего эксперимента.

В экстрактах, полученных после трех суток культивирования *R. opacus* 3D в присутствии салицилата, указанные выше интермедиаты деградации нафталина не детектировались, за исключением салициловой кислоты и ее димера. Количество димера было на 2 порядка больше, чем при культивировании штамма в присутствии нафталина. В контроле (минеральная среда с добавлением салицилата без бактерий) димер салициловой кислоты не обнаруживался.

Гены деградации ароматических соединений штамма *R. opacus* 3D. Для идентификации генов деградации ароматических соединений у штамма *R. opacus* 3D нами были использованы праймеры как описанные ранее, так и сконструированные в ходе настоящей работы (табл. 2). Результаты определения генов, кодирующих нафталин-1,2-диоксигеназу, салицилат-1-гидроксилазу, а также пирокатехин-, фталат- и протока-техоат-диоксигеназы родококков, приведены в табл. 6.

В биодеградации нафталина у бактерий ключевым ферментом является нафталиндиоксигеназа. Для всех штаммов родококков, способных использовать нафталин в качестве ростового субстрата, были получены ПЦР-продукты соот-

ветствующего размера. У штамма *Rhodococcus* sp. Dor2 с фенотипом Nah-Sal⁻, который служил отрицательным контролем, продукты амплификации получены не были.

Поскольку деградация нафталина осуществляется по двум основным путям — с салициловой или *o*-фталевой кислотами в качестве центральных интермедиатов — проводили поиск генов, кодирующих потенциально вовлеченные в эти пути ферменты. Использованные праймеры не позволили выявить гены, ответственные за синтез 1СГ и фталат-3,4-диоксигеназы.

Дальнейшее расщепление интермедиатов деградации салициловой или *o*-фталевой кислот может осуществляться с участием ферментов ПК-1,2-ДО и ПК-2,3-ДО (для салициловой кислоты) и ПКК-3,4-ДО (для *o*-фталевой кислоты). У штамма *R. opacus* 3D были обнаружены гены, кодирующие ПК-1,2-ДО. Положительный ответ также был получен для генов семейств *edoB* и *edoC*, кодирующих ПК-2,3-ДО. Кроме того, продукт амплификации был получен на матрице ДНК из штамма *R. opacus* 3D с праймерами, специфичными к гену *pcaH*, кодирующему β-субъединицу протока-техоат-3,4-диоксигеназы штамма *R. opacus* 1СР. Для других штаммов родококков в ряде случаев также были получены соответствующие продукты, но в различной комбинации.

Таблица 6. Гены, обнаруженные в штаммах родококков на основании ПЦР-анализа

Ген	Штамм			
	<i>R. opacus</i> 3D	<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	<i>Rhodococcus</i> sp. K NAH1	<i>Rhodococcus</i> sp. Dop2
<i>ndo</i>	+	+	+	–
<i>salI</i>	–	–	–	–
<i>pht3,4DO</i>	–	–	–	–
<i>ophA1A2</i>	–	–	–	–
<i>edoA</i>	–	–	–	–
<i>edoB</i>	+	–	+	–
<i>edoC</i>	+	–	–	–
<i>edoD</i>	–	–	–	–
<i>pcaG-pcaH</i>	–	+	+	–
<i>pcaH</i>	+	–	+	–
<i>catA2</i>	+	–	+	–
<i>catA</i>	+	–	+	–

Примечание. Представленные гены кодируют следующие ферменты: *ndo* – нафталиндиоксигеназу; *salI* – салицилатгидроксилазу; *pht3,4DO* и *ophA1A2* – фталатдиоксигеназу; *edoA*, *edoB*, *edoC*, *edoD* – пирокатехин-2,3-диоксигеназу; *pcaG-pcaH* и *pcaH* – протокатехоат-3,4-диоксигеназу; *catA2* и *catA* – пирокатехин-1,2-диоксигеназу.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Особенности метаболизма позволяют актинобактериям заселять экологические ниши, отличные от мест обитания псевдомонад, или развиваться в условиях, вынуждающих псевдомонад прекратить свой рост и перейти в состояние покоя или переживания неблагоприятных условий [58]. Кроме того, для родококков характерно большое количество путей периферического метаболизма [59]. Ферменты этих метаболических путей трансформируют изначально разнообразные по строению соединения в относительно небольшое количество ключевых промежуточных субстратов центрального метаболизма ароматических соединений, превращение которых приводит к формированию интермедиатов цикла трикарбоновых кислот. Так, у штамма *R. jostii* RHA1 в геноме размером 9,7 МБ выявлено 26 путей периферического метаболизма и 8 путей центрального катаболизма ароматических соединений [60]. Штаммы бактерий рода *Rhodococcus*, использованные в данной работе, были выделены из удаленных друг от друга территорий, значительно отличающихся экологическими условиями. Общей характеристикой этих штаммов является их способность использовать большое количество ароматических соединений в качестве источников углерода и энергии, в т.ч. нафталин, что позволяет предположить наличие в их геномах гомологичных генов.

Отсутствие деградативной активности по отношению к салицилату также является общей чертой этих штаммов.

Из литературных данных известно о нескольких штаммах бактерий рода *Rhodococcus*, не способных расти в присутствии салицилата. Так, штаммы P200 и P400 бактерий *R. rhodochrous* NCIMB 13064, утилизирующие нафталин, практически не были способны расти в минеральной среде с салицилатом в концентрации 1,0–10,0 мМ, и данное соединение не детектировалось в культуральной жидкости [61].

Салицилат в концентрациях 0,01; 0,1 и 0,5% не поддерживал рост штамма *R. opacus* M213, деструктора нафталина [58]. Рост на нафталеине также не сопровождался индукцией салицилатгидроксилазы у данного штамма [31]. Авторы предположили, что путь деградации нафталина не включает салицилат в качестве интермедиата. Другие потенциальные метаболиты пути деградации нафталина, такие как гентизат, карбоксибензальдегид, *o*-фталат, гидроксифталат и протокатехоат, являлись ростовыми субстратами для штамма M213 [58]. В качестве интермедиатов деградации нафталина у этого штамма авторами были обнаружены салициловый альдегид и салицилат (кроме пробы в нулевой момент), а также метаболиты *o*-фталатного пути: коричная кислота, 2-карбокси- и 2-гидроксикоричные кислоты, кумарин, гидрокумарин и фталевый альдегид. Исследуемый штамм *R. opacus* 3D так-

же рос в минеральной среде с кумарином, гентизатом, *o*-фталатом, 2-гидроксикоричной кислотой и протокатехоатом (табл. 1), что свидетельствует о наличии гомологичных ферментов и путей деструкции ароматических соединений у штаммов *R. opacus* 3D и M213. Из литературных и полученных нами данных по идентификации метаболитов методом масс-спектрометрии можно заключить, что у штаммов *R. opacus* 3D и M213 путь деградации нафталина включает образование в качестве интермедиатов 2-карбокси-, 2-гидроксикоричных, *o*-фталевой кислот и кумарина (табл. 5).

Низкая активность ферментов 1СГ, ПК-1,2-ДО, ПК-2,3-ДО и ГДО, отвечающих за деструкцию нафталина, в бесклеточном экстракте штамма *R. opacus* 3D также дает основание предположить, что деградация нафталина у исследуемого штамма не включает образование салицилата.

В противоположность родококку у *P. chlororaphis* OV17(pOV17) активности 1СГ, ПК-1,2-ДО и ПК-2,3-ДО в клетках, выращенных в присутствии нафталина и салицилата, превосходили активности этих ферментов в клетках, выращенных в присутствии глутамата, что указывает на их индуцибельный синтез при деструкции нафталина (табл. 4).

Анализ литературных данных показал, что в бесклеточном экстракте штаммов P200 и P400 бактерий *R. rhodochrous* NCIMB 13064, выращенных в минеральной среде с нафталином, определялась активность нафталиндигидрогеназы и нафталин-*цис*-диолдегидрогеназы, а также низкая активность пирокатехин-1,2- и -2,3-дигидрогеназ [61]. Причем в одном из штаммов, P400, активность ПК-1,2-ДО была сравнима с активностью этого фермента в клетках, выращенных в минеральной среде с пируватом. Активности 1СГ и ГДО обнаружены не были. Авторы предположили, что ПК-1,2-ДО, в отличие от ПК-2,3-ДО, может не участвовать в деградации нафталина у штамма *R. rhodochrous* [61].

В отличие от штаммов *R. opacus* 3D, *R. opacus* M213 и *R. rhodochrous* P200 и P400, штамм *R. ruber* OA1, выделенный из очистных сооружений фармакологического предприятия, способен утилизировать не только нафталин, но и салицилат в качестве единственных ростовых источников [48]. Проведенные исследования показали, что *o*-фталевая и салициловая кислоты были интермедиатами разложения нафталина. Эти вещества обнаруживались на 6-й день культивирования клеток с нафталином, далее их количество снижалось к 16-м суткам. Определение активности ферментов в бесклеточном экстракте показало, что у *R. ruber* OA1, выращенного в

минеральной среде с нафталином, присутствовали активности протокатехоат-3,4-диоксигеназы, гентизат-1,2-диоксигеназы и ПК-1,2-ДО. Активность ПК-2,3-ДО отсутствовала. На основании полученных результатов авторы сделали вывод, что важную роль в разложении нафталина *R. ruber* OA1 играет путь превращения протокатехоата [48]. Авторы провели гетерологичную экспрессию генов катаболизма протокатехоата. Однако в статье не представлено однозначных доказательств того, что путь деградации нафталина данным штаммом включает образование протокатехоата как одного из интермедиатов, т.к. ПКК, в отличие от *o*-фталевой и салициловой кислот, не была идентифицирована. Несмотря на то что активность ПКК-3,4-ДО в клетках, выращенных в минеральной среде с нафталином, была относительно велика (0,127 мкмоль/мин на 1 мг белка), данные по уровню активности этого фермента в неиндуцированных клетках отсутствуют, что не дает возможности сравнить уровень активности фермента в индуцированных и неиндуцированных клетках [48].

Таким образом, анализ литературы позволяет сделать заключение, что на данный момент описано только три штамма бактерий рода *Rhodococcus*, не способных разлагать салицилат при наличии фенотипа Nah⁺. Это два производных штамма *R. rhodochrous* NCIMB 13064 [61] и штамм *R. opacus* M213 [58]. Описанный в данной работе штамм *R. opacus* 3D близок к сравниваемым штаммам по фенотипическим характеристикам. Особенностью штамма *R. opacus* 3D, отличающей его от всех описанных ранее штаммов, является его реакция на салицилат при культивировании как с нафталином, так и с этим субстратом. Штамм *R. opacus* 3D способен к образованию салицилата из нафталина. Однако клетки трансформируют его в ассоциат, состоящий из двух молекул салициловой кислоты, вероятно, для предотвращения аккумуляции этого соединения в среде. Данная реакция в абиотических условиях не происходит. Этот факт говорит в пользу микробной трансформации мономера салицилата в димер. Возможное объяснение этого процесса — перевод салицилата в форму, которая не позволяет данному соединению конкурировать за активный центр ферментов, участвующих в превращении нафталина по пути образования *o*-фталевой кислоты, с их целевыми субстратами. Однако это предположение требует проверки.

На сходство метаболических активностей у родококков указывают и данные ПЦР-анализа. Разрыв кольца является важной стадией в аэробной деградации ароматических соединений,

в т.ч. пирокатехинов и их производных. Разрыв кольца катализируется ферментами, которые делятся на два класса: интрадиольные диоксигеназы (типичный представитель — пирокатехин-1,2-диоксигеназа) и экстрадиольные диоксигеназы (типичный представитель — пирокатехин-2,3-диоксигеназа). В литературе они рассматриваются как ключевые ферменты деградации нафталина. Согласно классификации, основанной на анализе нуклеотидных последовательностей, гены экстрадиольных диоксигеназ можно разделить на два типа: тип I (семейства *edoA*, *edoB*, *edoC*) и тип II (*edoD*) [47]. Для многих штаммов родококков описаны случаи наличия генов семейства *edo* в разных сочетаниях. Известны штаммы, у которых присутствуют все четыре типа ПК-2,3-ДО. У изучаемого штамма *R. opacus* 3D обнаружены ПК-2,3-ДО только двух типов.

ПЦР-продукт для гена фталат-3,4-диоксигеназы не был обнаружен ни у одного из исследуемых в данной работе штаммов-деструкторов нафталина. Одна из возможных причин этого состоит в высокой специфичности праймеров, использованных в работе. Первоначально нами были использованы праймеры, разработанные для штамма *Rhodococcus* sp. DK17, которые не позволили получить ПЦР-продукт ожидаемого размера. Использование новой пары праймеров, специально синтезированных в ходе выполнения данной работы, для гена фталат-3,4-диоксигеназы также не позволило получить ожидаемого ампликона. Эта пара праймеров была разработана на основе ограниченного числа последовательностей, извлеченных из базы данных для представителей разных видов рода *Rhodococcus*. Предполагается, что для детекции этого гена необходимы праймеры, обладающие высокой видовой специфичностью. Как показано в работе Anastasi et al. [62], родококки можно разделить на пять филогенетически отдельных групп на основании полногеномного секвенирования. Штаммы, принадлежащие к виду *R. opacus*, образуют отдельную группу. Отсутствие в базе данных достаточного количества последовательностей гена фталат-3,4-диоксигеназы для штаммов этой группы не позволило корректно подобрать праймеры. Тем не менее способность использовать соль *o*-фталевой кислоты в качестве единственного ростового субстрата и динамика метаболитов указывают на то, что путь деструкции нафталина штаммом *R. opacus* 3D включает образование этого соединения, и гены для его трансформации должны присутствовать в геноме.

Полученные данные позволяют выдвинуть еще одно предположение, касающееся особенностей метаболизма *o*-фталата и нафталина ро-

дококками. Для штамма *R. ruber* OA1, утилизирующего и нафталин, и салицилат, было предположено, что путь превращения нафталина включает образование фталата и протокатехоата [48]. *o*-Фталат был идентифицирован в культуральной жидкости, протокатехоат обнаружен не был. Потенциально образование протокатехоата подтверждается высоким уровнем активности ПКК-3,4-ДО. Штаммы *R. rhodochrous* NCIMB 13064 [61] и *R. opacus* M213 [58] не способны утилизировать салицилат, но разлагают нафталин. Путь деградации нафталина штаммом *R. opacus* M213 включает образование *o*-фталата. Но и в этом случае ПКК не была определена в культуральной жидкости. Путь деградации нафталина, включающий формирование *o*-фталата и протокатехоата, а не пар «салицилат—гентизат» или «салицилат—пирокатехин», был показан для двух грамположительных бактерий *Bacillus thermoleovorans* Hamburg 2 и *Geobacillus* sp. G27 [63, 64]. *o*-Фталат и ПКК были определены как интермедиаты нового пути разложения антрацена штаммом *Mycobacterium* sp. LB501T [65]. Отсутствие продукта амплификации гена фталат-3,4-диоксигеназы и протокатехоата в культуральной жидкости наряду с низкой активностью ПКК-3,4-ДО в выращенной в присутствии нафталина биомассе штамма *R. opacus* 3D указывают на то, что путь деградации нафталина у данного штамма на этапе трансформации фталата отличается от описанных в литературе вариантов. Определение интермедиатов этого пути является целью дальнейших исследований.

Полученные в настоящей работе данные указывают на то, что для бактерий рода *Rhodococcus* разложение нафталина через салицилат является менее характерным, чем по пути образования *o*-фталата, кумарина и коричных кислот. Однако чрезвычайно ограниченная информация о путях деструкции нафталина родококками не является основанием для вывода о том, какой путь преобладает, и данный вопрос также требует дальнейшего детального изучения.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-00964).

Благодарности. Авторы искренне благодарят к.б.н. М.И. Чернявскую (Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь) за предоставление штамма *R. pyridinivorans* 5Ap (L5A-BSU) и д.б.н. Е.Г. Плотникову (Институт экологии и генетики микроор-

ганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия) за предоставление штамма *R. wratislaviensis* G10.

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

- Juhasz, A.L., and Naidu, R. (2000) Bioremediation of high molecular weight PAHs: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **45**, 57–88, doi: 10.1016/S0964-8305(00)00052-4.
- Fonger, G.C., Hakkinen, P., Jordan, S., and Publicker, S. (2014) The National Library of Medicine's (NLM) Hazardous Substances Data Bank (HSDB): background, recent enhancements and future plans, *Toxicology*, **325**, 209–216, doi: 10.1016/j.tox.2014.09.003.
- Davies, J.I., and Evans, W.C. (1964) Oxidative metabolism of naphthalene nucleus by soil pseudomonads – ring fission mechanism, *Biochem. J.*, **91**, 251–261, doi: 10.1042/bj0910251.
- Jeffrey, A.M., Yeh, H.J., Jerina, D.M., Patel, T.R., Davey, J.F., and Gibson, D.T. (1975) Initial reactions in the oxidation of naphthalene by *Pseudomonas putida*, *Biochemistry*, **14**, 575–584, doi: 10.1021/bi00674a018.
- Patel, T.R., and Barnsley, E.A. (1980) Naphthalene metabolism by pseudomonads: purification and properties of 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase, *J. Bacteriol.*, **143**, 668–673.
- Assinder, S.J., and Williams, P.A. (1988) Comparison of the *meta* pathway operons on NAH plasmid pWW60-22 and TOL plasmid pWW53-4 and its evolutionary significance, *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 2769–2778, doi: 10.1099/00221287-134-10-2769.
- Rossello-Mora, R.A., Lalucat, J., and Garcia-Valdes, E. (1994) Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 966–972.
- Tay, M., Roizman, D., Cohen, Y., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., and Yang, L. (2014) Draft genome sequence of the model naphthalene-utilizing organism *Pseudomonas putida* OUS82, *Genome Announc.*, **2**, e01161-13, doi: 10.1128/genomeA.01161-13.
- Yen, K.M., and Serdar, C.M. (1988) Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads, *Crit. Rev. Microbiol.*, **15**, 247–268.
- Кочетков В.В., Балакшина В.В., Мордухова Е.А., Боронин А.М. (1997) Плазмиды биodeградации нафталина в ризосферных бактериях рода *Pseudomonas*, *Микробиология*, **66**, 211–216.
- Sevastyanovich, Y.R., Krasowiak, R., Bingle, L.E.H., Haines, A.S., Sokolov, S.L., Kosheleva, I.A., Leuchuk, A.A., Titok, M.A., Smalla, K., and Thomas, C.M. (2008) Diversity of IncP-9 plasmids of *Pseudomonas*, *Microbiology*, **154**, 2929–2941, doi: 10.1099/mic.0.2008/017939-0.
- Kiyohara, H., Torigoe, S., Kaida, N., Asaki, T., Iida, T., Hayashi, H., and Takizawa, N. (1994) Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82, *J. Bacteriol.*, **176**, 2439–2443, doi: 10.1128/jb.176.8.2439-2443.1994.
- Meyer, S., Moser, R., Neef, A., Stahl, U., and Kampfer, P. (1999) Differential detection of key enzymes of polycyclic aromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes, *Microbiology*, **145**, 1731–1741, doi: 10.1099/13500872-145-7-1731.
- Moser, R., and Stahl, U. (2001) Insights into the genetic diversity of initial dioxygenases from PAH-degrading bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 609–618, doi: 10.1007/s002530000489.
- Kauppi, B., Lee, K., Carredano, E., Parales, R.E., and Gibson, D.T. (1998) Structure of an aromatic ring-hydroxylating dioxygenase naphthalene 1,2-dioxygenase, *Structure*, **6**, 571–586, doi: 10.1016/s0969-2126(98)00059-8.
- Parales, R.E., Parales, J.V., and Gibson, D.T. (1999) Aspartate 205 in the catalytic domain of naphthalene dioxygenase is essential for activity, *J. Bacteriol.*, **181**, 1831–1837.
- Bosch, R., Moore, E.R., Garcia-Valdes, E., and Pieper, D.H. (1999) NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10, *J. Bacteriol.*, **181**, 2315–2322.
- Eaton, R.W., and Chapman, P.J. (1992) Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions, *J. Bacteriol.*, **174**, 7542–7554, doi: 10.1128/jb.174.23.7542-7554.1992.
- Fuenmayor, S.L., Wild, M., Boyes, A.L., and Williams, P.A. (1998) A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2, *J. Bacteriol.*, **180**, 2522–2530.
- Hickey, W.J., Sabat, G., Yuroff, A.S., Arment, A.R., and Perez-Lesher, J. (2001) Cloning, nucleotide sequencing, and functional analysis of a novel, mobile cluster of biodegradation genes from *Pseudomonas aeruginosa* strain JB2, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 4603–4609, doi: 10.1128/aem.67.10.4603-4609.2001.
- Lee, J., Min, K.R., Kim, Y.C., Kim, C.K., Lim, J.Y., Yoon, H., Min, K.H., Lee, K.S., and Kim, Y. (1995) Cloning of salicylate hydroxylase gene and catechol 2,3-dioxygenase gene and sequencing of an intergenic sequence between the two genes of *Pseudomonas putida* KF715, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211**, 382–388, doi: 10.1006/bbrc.1995.1825.
- Feng, Y., Khoo, H.E., and Poh, C.L. (1999) Purification and characterization of gentisate 1,2-dioxygenases from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867 and *Pseudomonas putida* NCIB 9869, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 946–950.
- Chua, C.H., Feng, Y., Yeo, C.C., Khoo, H.E., and Poh, C.L. (2001) Identification of amino acid residues essential for catalytic activity of gentisate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867, *FEMS Microbiol. Lett.*, **204**, 141–146, doi: 10.1007/s10529-007-9421-7.
- Zhou, N.Y., Fuenmayor, S.L., and Williams, P.A. (2001) *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism, *J. Bacteriol.*, **183**, 700–708, doi: 10.1128/JB.183.2.700-708.2001.
- Goetz, F.E., and Harmuth, L.J. (1992) Gentisate pathway in *Salmonella typhimurium*: metabolism of *m*-hydroxybenzoate and gentisate, *FEMS Microbiol. Lett.*, **76**, 45–49, doi: 10.1016/0378-1097(92)90361-q.
- Civilini, M., de Bertoldi, M., and Tell, G. (1999) Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* 2NR degrading naphthalene, *Lett. Appl. Microbiol.*, **29**, 181–186, doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00613.x.
- Старовойтов И.И., Нефедова М.Ю., Яковлев Г.И., Зякун А.М., Аданин В.М. (1975) Гентизиновая кислота –

- продукт микробного окисления нафталина, *Известия АН СССР Сер. хим.*, **9**, 2091–2092.
28. Monticello, D.J., Bakker, D., Schell, M., and Finnerty, W.R. (1985) Plasmid-borne TnS insertion mutations resulting in accumulation of gentisate from salicylate, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 761–764.
 29. Fu, W., and Oriel, P. (1998) Gentisate 1,2-dioxygenase from *Haloferax* sp. D1227, *Extremophiles*, **2**, 439–446, doi: 10.1007/s007920050090.
 30. Werwath, J., Arfmann, H.A., Pieper, D.H., Timmis, K.N., and Wittich, R.M. (1998) Biochemical and genetic characterization of a gentisate 1,2-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW5, *J. Bacteriol.*, **180**, 4171–4176.
 31. Uz, I., Duan, Y.P., and Ogram, A. (2000) Characterization of the naphthalene-degrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213, *FEMS Microbiol. Lett.*, **185**, 231–238, doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09067.x.
 32. Auffret, M., Labbe, D., Thouand, G., Greer, C.W., and Fayolle-Guichard, F. (2009) Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 7774–7782, doi: 10.1128/AEM.01117-09.
 33. Larkin, M.J., Kulakov, L.A., and Allen, C.C. (2005) Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**, 282–290, doi: 10.1016/j.copbio.2005.04.007.
 34. Dong, L., Nakashima, N., Tamura, N., and Tamura, T. (2004) Isolation and characterization of the *Rhodococcus opacus* thiostrepton-inducible genes *tipAL* and *tipAS*: application for recombinant protein expression in *Rhodococcus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **237**, 35–40, doi: 10.1016/j.femsle.2004.06.012.
 35. Kulakov, L.A., Chen, S., Allen, C.C., and Larkin, M.J. (2005) Web-type evolution of *Rhodococcus* gene clusters associated with utilization of naphthalene, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1754–1764, doi: 10.1007/978-3-642-12937-7_3.
 36. Grund, E., Denecke, B., and Eichenlaub, R. (1992) Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1874–1877.
 37. Allen, C., Boyd, D., and Larkin, M. (1997) Metabolism of naphthalene, 1-naphthol, indene, and indole by *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 151–155.
 38. Larkin, M.J., and Day, M.J. (1986) The metabolism of carbaryl by three bacterial isolates, *Pseudomonas* spp. (NCBI12042 and 12043) and *Rhodococcus* sp. (NCIB12038) from garden soil, *J. Appl. Bacteriol.*, **60**, 233–242, doi: 10.1111/j.1365-2672.1986.tb01078.x.
 39. Горлатов С.Н., Мальцева О.В., Шевченко В.Л., Головлева Л.А. (1989) Разложение хлорфенолов культурой *Rhodococcus erythropolis*, *Микробиология*, **58**, 802–806.
 40. Чернявская М.И. (2016) Характеристика штаммов нафталинутилизующих бактерий рода *Rhodococcus*, *Труды БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*, **11**, 190–197.
 41. Плотникова Е.Г., Рыбкина Д.О., Ананьина Л.Н., Ястребова О.В., Демаков В.А. (2006) Характеристика микроорганизмов, выделенных из техногенных почв Прикамья, *Экология*, **4**, 261–268.
 42. Измалкова Т.Ю., Гафаров А.Б., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Кошелева И.А., Боронин А.М. (2018) Разнообразие микроорганизмов-нефтедеструкторов Финского залива Балтийского моря в зимний и летний периоды, *Микробиология*, **87**, 204–214.
 43. Anokhina, T.O., Volkova, O.V., Puntus, I.F., Filonov, A.E., Kochetkov, V.V., and Boronin, A.M. (2006) Plant growth-promoting *Pseudomonas* bearing catabolic plasmids: naphthalene degradation and effect on plants, *Process Biochemistry*, **41**, 2417–2423, doi: 10.1016/j.procbio.2006.06.026.
 44. Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing, in: *Nucleic acid techniques in bacterial systematic* (Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds), John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115–175.
 45. Subashchandrabose, S.R., Venkateswarlu, K., Naidu, R., and Megharaj, M. (2019) Biodegradation of high-molecular weight PAHs by *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9: overexpression of amidohydrolase induced by pyrene and BaP, *Sci. Total Environ.*, **651**, 813–821, doi: 10.1007/978-3-030-24035-6_3.
 46. Choi, K.Y., Kim, D., Sul, W.J., Chae, J.C., Zylstra, G.J., Kim, Y.M., and Kim, E. (2005) Molecular and biochemical analysis of phthalate and terephthalate degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17, *FEMS Microbiol. Lett.*, **252**, 207–213, doi: 10.1016/j.femsle.2005.08.045.
 47. Kulakov, L.A., Delcroix, V.A., Larkin, M.J., Ksenzenko, V.N., and Kulakova, A.N. (1998) Cloning of new *Rhodococcus* extradiol dioxygenase genes and study of their distribution in different *Rhodococcus* strains, *Microbiology*, **144**, 955–963, doi: 10.1099/00221287-144-4-955.
 48. Li, C., Zhang, C., Song, G., Liu, H., Sheng, G., Ding, Z., Wang, Z., Sun, Y., Xu, Y., and Chen, J. (2016) Characterization of a protocatechuate catabolic gene cluster in *Rhodococcus ruber* OAI involved in naphthalene degradation, *Ann. Microbiol.*, **66**, 469–478, doi: 10.1007/s13213-015-1132-z.
 49. Соляникова И.П., Борзова О.В., Емельянова Е.В., Шумкова Е.С., Присяжная Н.В., Плотникова Е.Г., Головлева Л.А. (2016) Диоксигеназы, индуцирующиеся при разложении бензоата деструкторами хлорбифенилов *Rhodococcus wratislaviensis* G10 и хлорфенолов *Rhodococcus opacus* ICP, и гены, потенциально вовлеченные в этот процесс, *Биохимия*, **81**, 1239–1253.
 50. Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673–4680, doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
 51. Dua, R.D., and Meera, S. (1981) Purification and characterisation of naphthalene oxygenase from *Corynebacterium renale*, *Eur. J. Biochem.*, **120**, 461–465, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05724.x.
 52. Shamsuzzaman, K.M., and Barnsley, E.A. (1974) The regulation of naphthalene oxygenase in pseudomonads, *J. Gen. Microbiol.*, **83**, 165–170, doi: 10.1099/00221287-83-1-165.
 53. Hegeman, G.D. (1966) Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Synthesis of enzymes by the wild type, *J. Bacteriol.*, **91**, 1140–1154.
 54. Crawford, R.L., Hutton, S.W., and Chapman, P.J. (1975) Purification and properties of gentisate 1,2-dioxygenase from *Moraxella osloensis*, *J. Bacteriol.*, **121**, 794–799.
 55. Fujisawa, H., and Hayaishi, O. (1968) Protocatechuate 3,4-dioxygenase. I. Crystallization and characterization, *J. Biol. Chem.*, **243**, 2673–2681.
 56. Schlomann, M., Schmidt, E., and Knackmuss, H.J. (1990) Different types of dienelactone hydrolase in 4-fluorobenzoate-utilizing bacteria, *J. Bacteriol.*, **172**, 5112–5118, doi: 10.1128/jb.172.9.5112-5118.1990.
 57. Кулакова А.Н. (1988) *Природа генетического контроля катаболизма нафталина и салициловой кислоты у штамма Pseudomonas putida BSA202*. Дис. канд. биол. наук, ИБФМ, Пушкино.

58. Pathak, A., Chauhan, A., Blom, J., Indest, K.J., Jung, C.M., Stothard, P., Bera, G., Green, S.J., and Ogram, A. (2016) Comparative genomics and metabolic analysis reveals peculiar characteristics of *Rhodococcus opacus* strain M213 particularly for naphthalene degradation, *PLoS One*, **11**, e0161032, doi: 10.1371/journal.pone.0161032.
59. Martinkova, L., Uhnakova, B., Patek, M., Nesvera, J., and Kren, V. (2009) Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*, *Environ. Int.*, **35**, 162–177, doi: 10.1016/j.envint.2008.07.018.
60. McLeod, M.P., Warren, R.L., Hsiao, W.W., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A.L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R.D., Yang, G., Stott, J.M., Schein, J.E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A.S., Marra, M.A., Jones, S.J., Holt, R., Brinkman, F.S., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J.E., Mohn, W.W., and Eltis, L.D. (2006) The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15582–15587, doi: 10.1073/pnas.0607048103.
61. Kulakova, A.N., Reid, K.A., Larkin, M.J., Allen, C.C., and Kulakov, L.A. (1996) Isolation of *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 derivatives with new biodegradative abilities, *FEMS Microbiol. Lett.*, **145**, 227–231, doi: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08582.x.
62. Anastasi, E., MacArthur, I., Scortti, M., Alvarez, S., Giguere, S., and Vazquez-Boland, J.A. (2016) Pangenome and phylogenomic analysis of the pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*, *Genome Biol. Evol.*, **8**, 3140–3148, doi: 10.1007/s00203-019-01695-z.
63. Annweiler, E., Richnow, H.H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Francke, W., and Michaelis, W. (2000) Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 518–523, doi: 10.1128/aem.66.2.518-523.2000.
64. Bubinas, A., Giedraityte, G., Kalediene, L., Nivinskiene, O., and Butkiene, R. (2008) Degradation of naphthalene by thermophilic bacteria via a pathway through protocatechuic acid, *Cent. Eur. J. Biol.*, **3**, 61–68, doi: 10.2478/s11535-007-0042-x.
65. Van Herwijnen, R., Springael, D., Slot, P., Govers, H.A., and Parsons, J.A. (2003) Degradation of anthracene by *Mycobacterium* sp. strain LB501T proceeds via a novel pathway, through *o*-phthalic acid, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 186–190, doi: 10.1128/aem.69.1.186-190.2003.

ALTERNATIVE NAPHTHALENE METABOLIC PATHWAY INCLUDES FORMATION OF *ortho*-PHTHALIC ACID AND CINNAMIC ACID DERIVATIVES IN THE *Rhodococcus opacus* STRAIN 3D

T. O. Anokhina, T. Z. Esikova, A. B. Gafarov,
V. N. Polivtseva, B. P. Baskunov, and I. P. Solyanikova*

Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research" of the Russian Academy of Sciences, Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: innas@IBPM.Pushchino.ru

Received November 1, 2019

Revised December 6, 2019

Accepted December 6, 2019

Naphthalene, as a component of crude oil, is a common environmental pollutant. Biochemical and genetic aspects of naphthalene catabolism have been examined in most detail in the bacteria of *Pseudomonas* genus. In pseudomonads, the key intermediate in naphthalene degradation is salicylate. In this study, we investigated the ability of *Rhodococcus opacus* strain 3D to utilize naphthalene as a sole carbon and energy source. The characteristic feature of this strain is the inability to grow in the mineral medium supplemented with salicylate (typical intermediate of naphthalene degradation in Gram-negative bacteria). The absence of salicylate hydroxylase activity and salicylate accumulation in the mineral medium in the course of *R. opacus* 3D cultivation indicated existence of an alternative pathway of naphthalene oxidation. At the same time, *R. opacus* 3D was able to use monoaromatic compounds (salts of gentisic, *ortho*-phthalic, and 2-hydroxycinnamic acids and coumarin) as growth substrates. Based on the analysis of enzymatic activities, identification of the reaction intermediates, genetic determinants, and growth substrates, we concluded that *R. opacus* 3D carries out naphthalene degradation through an alternative pathway via formation of *ortho*-phthalic acid, which is untypical for pseudomonads. Using mass spectrometry, we showed for the first time that salicylic acid associate formed in trace amounts in the process of naphthalene degradation is not further metabolized and accumulated in the growth medium in a form of dimer.

Keywords: *Rhodococcus opacus*, naphthalene, salicylic acid, *ortho*-phthalic acid, 2-hydroxycinnamic acid, biodegradation genes, enzymatic activity

УДК 577.124

РАМНОМАННАНЫ И ТЕЙХУРОНОВАЯ КИСЛОТА ИЗ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *Rathayibacter tritici* ВКМ Ac-1603^T*

© 2020 А.С. Шашков¹, Е.М. Тульская^{2**}, Г.М. Стрешинская²,
А.С. Дмитриенко¹, Н.В. Потехина², С.Н. Сенченкова¹,
Н.Ф. Пискункова², Л.В. Дорофеева³, Л.И. Евтушенко³

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

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: em_tulskaya@mail.ru

³ Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, 142290 Пущино Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 28.11.2019

После доработки 18.12.2019

Принята к публикации 18.12.2019

Химическими и ЯМР-спектроскопическими методами установлены структуры трех гликополимеров клеточной стенки фитопатогена *Rathayibacter tritici* ВКМ Ac-1603^T (семейство Microbacteriaceae, порядок Micrococcales, класс Actinobacteria). Полимер 1 – разветвленный рамноманнан с повторяющейся единицей $\rightarrow 3$ - α -[β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 2)]-D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Rhap-(1 $\rightarrow$; полимер 2 – линейный рамноманнан $\rightarrow 2$ - α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Rhap-(1 $\rightarrow$; полимер 3 – тейхуроновая кислота с боковыми заместителями, содержащая остатки моносахаридов GlcA, Gal, Man и Glc в соотношении 1/1/1/5. Структуры полимеров описаны впервые для прокариотных микроорганизмов. Обсуждается индивидуальный набор бесфосфатных гликополимеров в клеточных стенках представителей 4-х видов рода *Rathayibacter* (*R. tritici* ВКМ Ac-1603^T, *R. iranica* ВКМ Ac-1602^T, *R. toxicus* ВКМ Ac-1600 и «*Rathayibacter tanacetii*» ВКМ Ac-2596), изученных к настоящему времени. Штаммы характеризуются общим свойством – присутствием в клеточных стенках линейных или разветвленных рамноманнанов с D-рамнозой, с различной локализацией гликозидных связей в цепи и различными боковыми заместителями, что является важным хемотаксономическим признаком рода *Rathayibacter*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Rathayibacter*, клеточная стенка, рамноманнан, тейхуроновая кислота, D-рамноза, ЯМР-спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0320972520030124

Актинобактерии рода *Rathayibacter* (семейство Microbacteriaceae, класс Actinobacteria) – аэробные, грамположительные, неподвижные, неправильные палочки с пептидогликаном B2y

Принятые сокращения: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов; HMBC – гетероядерная корреляция ¹H, ¹³C через несколько связей; HSQC – протон-детектированная НОНО-квантовая корреляция; J (KCCV) – константа спин-спинового взаимодействия; ROESY – двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; COSY – корреляционная спектроскопия; TOCSY – тотальная корреляционная спектроскопия; TSP – натриевая соль 3-(триметилсилил)-3,3,2,2-тетрагидерпропионовой кислоты; δ_c , δ_H – значения химических сдвигов атомов ¹³C и ¹H соответственно, тейхуроновая кислота – (ТУК).

* Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 3, 2020.

** Адресат для корреспонденции.

типа и преобладающим менахиномом дыхательной цепи МК 10 [1]. Ряд видов рода, в их числе *R. tritici*, известны как фитопатогены, вызывающие гуммоз и задержку роста пшеницы и некоторых других злаковых растений [1, 2]. *R. toxicus*, кроме того, образует высокотоксичный гликолипид (коринетоксин), который является причиной гибели травоядных животных [1, 2]. Считается, что в природных условиях фитопатогены рода *Rathayibacter* переносятся на хозяйские растения галлообразующими нематодами рода *Anguina* [1, 2].

Наши предыдущие исследования показали, что клеточные стенки *R. toxicus* ВКМ Ac-1600, «*Rathayibacter tanacetii*» ВКМ Ac-2596 и *R. iranica* ВКМ Ac-1602^T содержат полимеры уникальной структуры [3, 4]. Другие представители рода ранее не исследованы в этом отношении.

Изучение состава и строения гликополимеров клеточных стенок ковалентно связанных с

пептидогликаном у ранее не исследованных видов (групп) бактерий представляет интерес для ряда областей фундаментальной и прикладной науки, в том числе микробиологии и экологии микроорганизмов. Сведения о строении гликополимеров клеточных стенок имеют также важное значение для развития системы классификации бактерий, в частности для обоснования описания новых видов (доказательство их отличий от известных видов на уровне фенотипа) [5, 6].

В настоящей работе приведены структуры углеводсодержащих полимеров клеточной стенки типового штамма *Rathayibacter tritici* в сравнении с таковыми, изученными ранее у других видов рода.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали штамм *Rathayibacter tritici* ВКМ Ас-1603^Т (= DSM 7486^Т = ICMP 2626^Т) из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (www.vkm.ru).

Культуру выращивали аэробно при 28 °С в колбах на качалке до середины логарифмической фазы роста на пептонно-дрожжевой среде [7].

Получение клеточных стенок и выделение из них гликополимеров проводили как описано в работе Shashkov et al. [3]. Выход препаратов гликополимеров, полученных при холодной и горячей ТХУ-экстракциях (10% ТХУ, 4 °С, 24 ч и последующая – 5% ТХУ, 90 °С, 20 мин), составил 1,3% и 4,6% соответственно. В дальнейшем препараты гликополимеров, полностью идентичные по предварительным химическим и ЯМР-спектроскопическим исследованиям, были объединены и обозначены как препарат Ас-1603.

Кислотный гидролиз клеточной стенки и препаратов гликополимеров проводили 2 М HCl, 3 ч, 100 °С, как описано в работе Potekhina et al. [7].

Нисходящую хроматографию (БХ) и электрофорез проводили на бумаге Filtrak FN-3 («Filtrak», Германия), используя различные системы растворителей [7]. Фосфат-содержащие соединения выявляли реактивом Ишервуда; полиолы и моносахариды – 5%-ным аммиачным раствором AgNO₃, восстанавливающие моносахариды – анилинфталатом [7].

Гликополимеры препарата Ас-1603 разделяли методом анионообменной хроматографии на колонке (80 × 1,5 см) с DEAE-целлюлозой («Тоуорепарл», Япония). Нейтральную фракцию элюировали 0,005 М, а кислую – 0,5 М фосфатным буфером (рН 6,3). Полученные фракции

обессоливали на колонке (90 × 1,5 см) с TSK HW-40S гелем («Тоуорепарл», Япония). Элюцию проводили 1%-ным АсОН, используя дифференциальный рефрактометр («Кнауер», Германия). Фракции гликополимеров объединяли, диализовали против дистиллированной воды, замораживали и высушивали лиофильно.

Абсолютная D-конфигурация рамнозы и маннозы (полимеры 1 и 2) была установлена методом ГЖХ ацетилированных гликозидов с (+)-октан-2-олом согласно опубликованным процедурам [8]. Абсолютную конфигурацию моносахаридных остатков в полимере 3 определяли по эффектам гликозилирования в остатках моносахаридов в спектрах ЯМР ¹³С согласно закономерностям, изложенным в работе Shashkov et al. [9], предполагая, что глюкоза относится к D-ряду. D-Конфигурацию глюкозы подтверждали ферментативно, как описано ранее [4].

Спектры ЯМР снимали на приборе Bruker AV600 («Bruker», Германия) для растворов в 99,96% D₂O при температурах, обеспечивающих минимальное перекрытие остаточного сигнала дейтерированной воды с сигналами полимеров. В качестве внутреннего эталона использовали натриевую соль 3-(триметилсилил)-3,3,2,2-тетрадейтеропропионовой кислоты (TSP, δ_H 0,0 м.д., δ_C –1,6 м.д.). Двумерные спектры снимали и записывали при использовании стандартных методик фирмы Bruker. Время спин-лока в экспериментах тотальной корреляционной спектроскопии (TOCSY) составляло 100 мс. Время смешивания в эксперименте двумерной спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат (ROESY) составляло 150 мс. Эксперименты по гетероядерной корреляции ¹H,¹³C (HMBC) были оптимизированы для констант спин-спиновой взаимодействия $J_{H,C}$ 8 Гц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В кислотных гидролизатах клеточной стенки и препарата Ас-1603 (2 М HCl, 100 °С, 3 ч) фосфат-содержащие соединения не выявлены (электрофорез), однако были обнаружены моносахариды – галактоза, глюкоза, манноза, рамноза и ксилоза (БХ), которые могли входить в состав гликополимеров клеточной стенки исследуемого штамма.

¹³С ЯМР-спектр препарата Ас-1603 (рис. 1) был типичным для нерегулярного полимера или смеси полимеров. Спектр содержал, по крайней мере, 12 сигналов различной интенсивности в аномерной области атомов углерода δ_C 97,5–105,1 м.д., а также один сигнал от 6-дезоксиса-

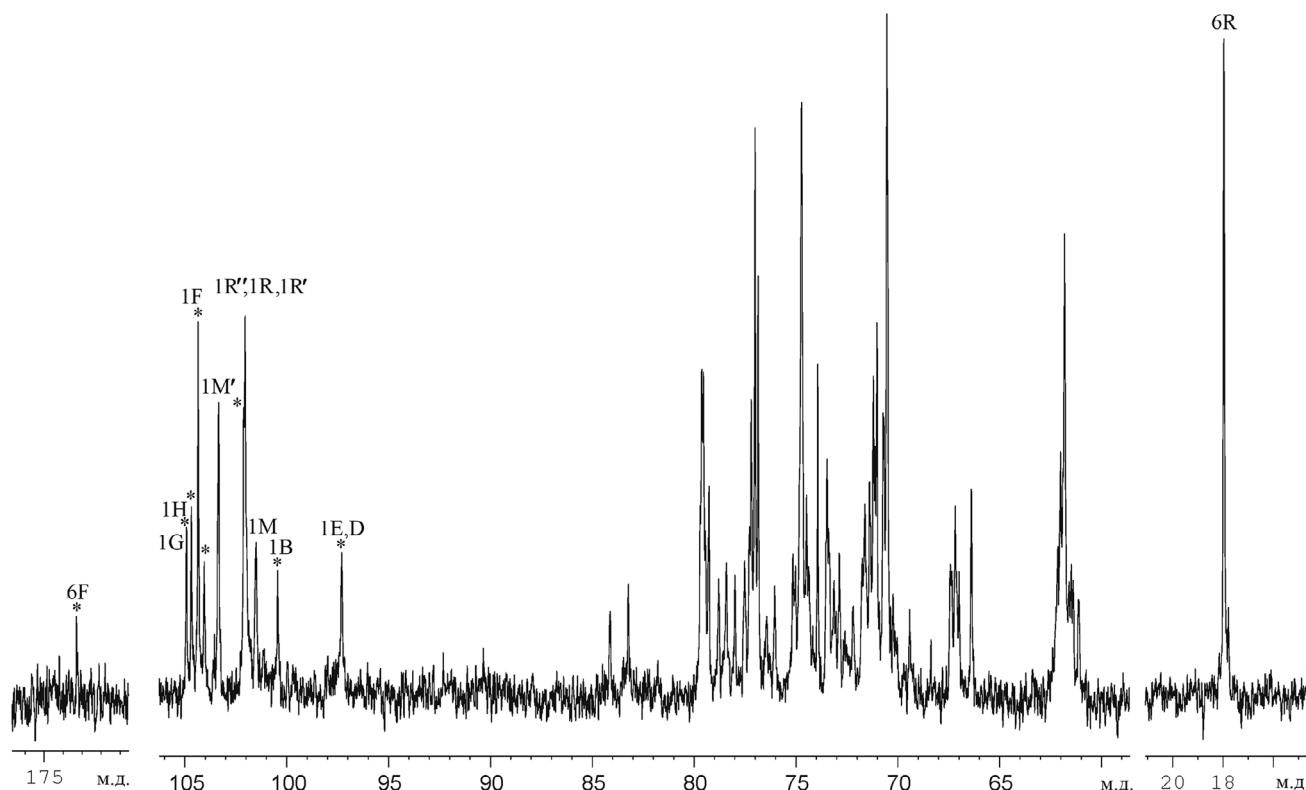


Рис. 1. Спектр ^{13}C ЯМР гликополимеров препарата Ас-1603 из клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^Т. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с табл. 1. Звездочками помечены сигналы, относящиеся к полимеру 3

хара при δ_{C} 18,0 м.д. Спектр также содержал сигнал в области резонанса карбонильных групп при δ_{C} 173,2 (рН 3,0) или 174,0 (рН 7,0), принадлежащий, судя по зависимости положения от рН, COOH -группе. Разделение препарата Ас-1603 на колонке с DEAE (см. раздел «Методы исследования») привело к получению нейтральной и кислой фракций.

^{13}C ЯМР-спектр нейтральной фракции (табл. 1, рис. 2) в аномерной области атомов углерода (δ_{C} 101,4–104,3 м.д.) содержал большое количество сигналов различной интенсивности, а в сильнополюльной области спектра были сигналы при δ_{C} 17,9 и 18,0 м.д.

^1H ЯМР-спектр нейтральной фракции (табл. 1, рис. 3, сверху) содержал шесть хорошо разрешенных сигналов в аномерной области протонов. Два сигнала наблюдали в области сильного поля при δ_{H} 1,30 и 1,32 м.д.

Как ^1H , так и ^{13}C спектры полимеров нейтрального препарата были расшифрованы с помощью двумерных гомоядерных ^1H , ^1H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных ^1H , ^{13}C спектров HSQC и HMBC.

Двумерные ^1H , ^1H COSY, TOCSY и ROESY (рис. S1 в Приложении) спектры выявили остат-

ки α -маннопиранозы ($\alpha\text{-Manp}$), α -рамнопиранозы ($\alpha\text{-Rhap}$) и β -ксилопиранозы ($\beta\text{-Xylp}$). Анализ ^1H , ^{13}C HSQC-спектра (табл. 1, рис. 3) показал различное замещение остатков Manp: в положение 2 и 3 (химический сдвиг C-2 при 79,2 м.д. и химический сдвиг C-3 при 77,6 м.д., остаток **M**); только в положение 3 (химический сдвиг C-3 при 79,6 м.д., остаток **M'**); только в положение 2 (химический сдвиг C-2 при 79,8 м.д., остаток **M''**); замещение $\alpha\text{-Rhap}$ в положение 2 (химический сдвиг C-2 при 79,5 м.д., остаток **R**; при 79,6 м.д., остаток **R'** и при 79,7 м.д., остаток **R''**). Остатки $\beta\text{-Xylp}$ выявлены как концевые (**Xs**).

Последовательность остатков определена путем анализа ^1H , ^1H ROESY (табл. 1, рис. S1 в Приложении) и ^1H , ^{13}C HMBC (табл. 1, рис. S2 в Приложении) спектров. Корреляционные пики между остатками H-1(**M**)/H-2(**R**) (5,15/4,11); H-1(**M''**)/H-2(**R''**) (5,22/4,11); H-1(**R**, **R''**)/H-3(**M'**) (5,25, 5,22/3,88); H-1(**M'**)/H-2(**R'**) (5,05/4,10); H-1(**R'**)/H-3(**M**) (5,24/3,95); H-1(**R'**)/H-2(**M''**) (5,24/4,07) и H-1(**R'**)/H-3(**M'**) (5,24/3,88) наблюдали в ^1H , ^1H ROESY-спектре (табл. 1, рис. S1 в Приложении). Они указывали на присутствие двух типов повторяющихся звеньев, что,

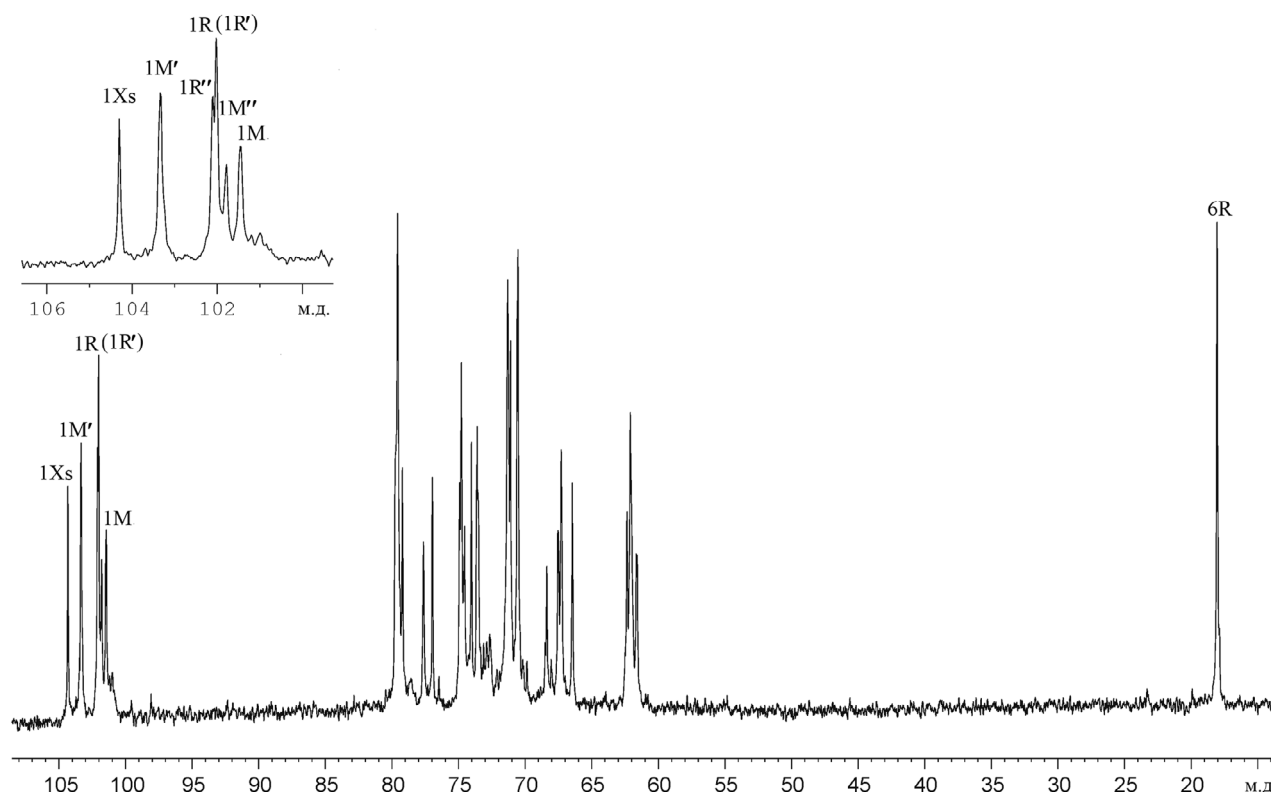


Рис. 2. Спектр ^{13}C ЯМР полимеров 1 и 2 нейтральной фракции из клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^Т. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с табл. 1. Вверху слева приведена область аномерных атомов углерода, увеличенная в масштабе

скорее всего, связано с наличием в нейтральной фракции либо одного полимера с гетерогенной цепью, либо двух. Структуры были установлены при анализе дальних Н/С-корреляций в спектрах ^1H , ^{13}C NMBC (табл. 1, рис. S2 в Приложении), где обнаружены следующие корреляционные пики между остатками: Н-1(М)/С-2(Р) (5,15/79,5); Н-1(Р, Р'')/С-3(М') (5,25, 5,22/79,6); Н-1(Хs)/С-2(М) (4,43/79,2); Н-1(М')/С-2(Р') (5,05/79,6); Н-1(Р')/С-2(М'') (5,24/76,8); Н-2(М)/С-1(Р) (4,22/102,0); Н-3(Р')/С-1(М) (3,96/101,4); Н-3(М)/С-1(Хs) (3,95/104,3); Н-2(М')/С-1(Р') (4,15/102,0) и Н-3(Р')/С-1(М') (3,96/103,3).

Абсолютная D-конфигурация остатков α -Rhap и α -Manp определена согласно процедуре, описанной в работе Gerwig et al. [8], и подтверждена совпадением химических сдвигов С-1 – С-3 α -Rhap и α -Manp в спектрах ^{13}C -ЯМР с таковыми для полимера I из *R. toxicus* ВКМ Ас-1600, имеющего идентичную основную повторяющуюся единицу [3]. Присутствие в ^1H , ^1H ROESY-спектре (табл. 1, рис. S1 в Приложении) Н-1(М)/Н-1(Хs) (5,15/4,43) указывает на одинаковые D-конфигурации маннопиранозы и ксилопиранозы.

Структуры повторяющихся звеньев рамноманнанов (полимеры 1 и 2) представлены на рис. 4.

^{13}C ЯМР-спектр полимера 3 из кислой фракции (табл. 1, рис. 5) был типичным для регулярного полимера. Аномерная область атомов углерода содержала шесть сигналов равной интенсивности и один сигнал двойной интегральной интенсивности. В области сильного поля сигналов не наблюдали, а сигнал при δ_{C} 173,5 (рН 5) был виден в резонансной области карбоксильных групп.

^1H ЯМР-спектр полимера 3 из кислой фракции (рис. 6, верху) содержал шесть хорошо разрешенных сигналов и один сигнал двойной интенсивности в аномерной области протонов.

Как ^1H , так и ^{13}C спектры полимера 3 были расшифрованы с помощью двумерных спектров, упомянутых выше. Спектры 2D ^1H , ^1H COSY, TOCSY и ROESY (рис. S3 в Приложении) выявили остатки α -Galp, β -Manp, β -Glc, два остатка α -Glc, β -GlcA и два терминальных остатка β -Glc. Анализ ^1H , ^{13}C HSQC-спектра (табл. 1, рис. 6, слева) показал слабополюный химический сдвиг атомов углерода при С-2 (78,2 м.д.) и С-3 (78,6 м.д.) (А); С-3 (83,4 м.д.)

Таблица 1. Химические сдвиги в спектрах ЯМР ^{13}C и ^1H для гликополимеров клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^T (TSP δ_{C} – 1,6 м.д. и δ_{H} 0.00 м.д.)

Остаток		C-1 <i>H-1</i>	C-2 <i>H-2</i>	C-3 <i>H-3</i>	C-4 <i>H-4</i>	C-5 <i>H-5</i>	C-6 <i>H-6 (H-6a, 6b)</i>
Нейтральный полимер 1							
→3)- α -D-Manp-(1→ 2) ↑	M	101,4 5,15	79,2 4,22	77,6 3,95	67,5 3,84	74,9 3,69	62,3 ^b 3,88, 3,77
α -D-Xylp-(1	Xs	104,3 4,43	74,0 3,30	76,9 3,43	70,6 3,63	66,4 3,98, 3,27	
→2)- α -D-Rhap-(1→	R	102,0 5,25	79,5 4,11	71,3 3,92	73,5 3,51	70,6 ^a 3,95	18,0 1,32
→3)- α -D-Manp-(1→	M'	103,3 5,05	71,1 4,15	79,6 3,88	67,3 3,81	74,8 3,71	62,0 ^b 3,86, 3,76
→2)- α -D-Rhap-(1→	R'	102,0 5,24	79,6 4,10	71,3 3,96	73,5 3,52	70,6 ^a 3,95	17,9 1,28
Нейтральный полимер 2							
→2)- α -D-Manp-(1→	M''	101,8 5,22	79,8 4,07	71,3 3,91	68,4 3,68	74,5 3,73	61,6 3,82, 3,80
→2)- α -D-Rhap-(1→	R''	102,1 5,22	79,7 4,11	71,3 3,98	73,6 3,49	70,5 ^a 3,83	17,9 1,28
→3)- α -D-Manp-(1→	M'	103,3 5,05	71,1 4,15	79,6 3,88	67,3 3,81	74,8 3,71	62,3 ^b 3,84, 3,79
→2)- α -D-Rhap-(1→	R'	102,0 5,25	79,6 4,10	71,3 3,96	73,5 3,52	70,6 ^a 3,95	17,9 1,28
Кислый полимер 3							
β -D-Glcp-(1 ↓ 2) →6)- α -D-Galp-(1→ 3) ↑	G	105,1 4,69	74,6 3,31	77,1 3,49	71,0 3,41	77,1 3,48	62,0 3,91, 3,87
	A	102,2 5,43	78,2 4,11	78,6 4,25	70,7 4,23	71,8 4,32	71,5 3,98, 3,98
β -D-Glcp-(1	H	104,8 4,72	74,7 3,34	77,3 3,44	70,8 3,41	76,2 3,73	62,0 3,87, 3,77
→3)- β -D-Manp-(1→	B	100,7 4,74	71,5 4,34	83,4 3,75	67,1 3,79	77,6 3,47	62,3 3,94, 3,76
→4)- β -D-Glcp-(1→	C	104,2 4,72	74,9 3,44	76,2 3,72	79,1 3,72	77,5 3,79	61,4 3,78, 3,78
→3)- α -D-Glcp-(1→	D	97,5 5,21	71,8 3,81	84,3 3,98	69,5 3,56	73,0 4,00	61,8 3,94, 3,72
→2)- α -D-Glcp-(1→	E	97,5 5,72	76,6 3,69	72,3 3,78	70,3 3,52	73,1 3,61	62,0 3,84, 3,72
→4)- β -D-GlcpA-(1→	F	104,4 4,58	74,6 3,33	75,3 3,76	77,0 3,86	75,0 4,13	173,5

^{a,b} Предполагаемое отнесение в колонке.

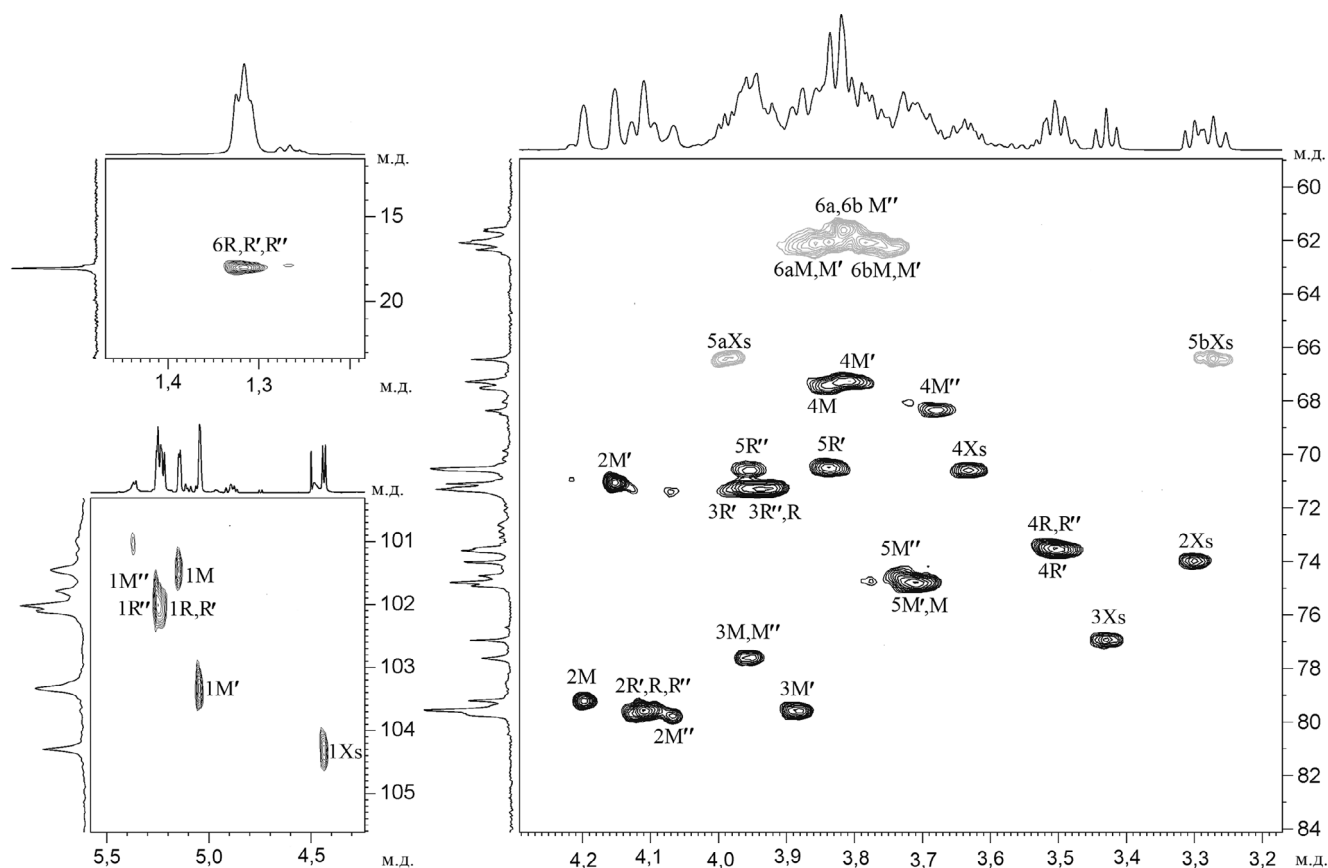


Рис. 3. Части двумерного ^1H , ^{13}C HSQC-спектра полимеров 1 и 2 нейтральной фракции из клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^T. Соответствующие части ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров приведены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с табл. 1

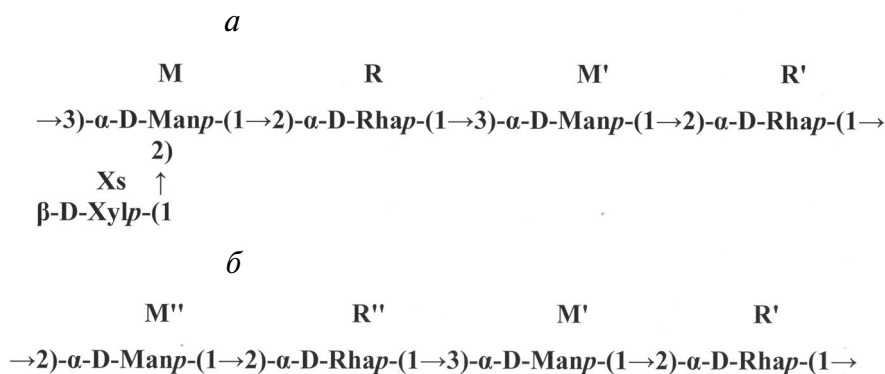


Рис. 4. Структуры повторяющихся звеньев нейтральных полимеров из клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^T: *a* — рамноманнан 1 (полимер 1); *б* — рамноманнан 2 (полимер 2). Заглавными латинскими буквами обозначены остатки в соответствии с табл. 1

(В); C-4 (79,1 м.д.) (С); C-3 (84,3 м.д.) (D); C-2 (76,6 м.д.) (Е) и C-4 (77,0 м.д.) (F) в сравнении с таковыми в спектрах соответствующих незамещенных остатков. Химические сдвиги ^{13}C в подспектрах остатков (G) и (H) были близки к тако-

вым в β-Glcp-OMe, что указывает на концевое положение остатков в повторяющемся звене.

Последовательность остатков в полимере 3 стала понятной после анализа 2D ^1H , ^1H ROESY спектра (табл. 1, рис. S3 в Приложении). Спектр

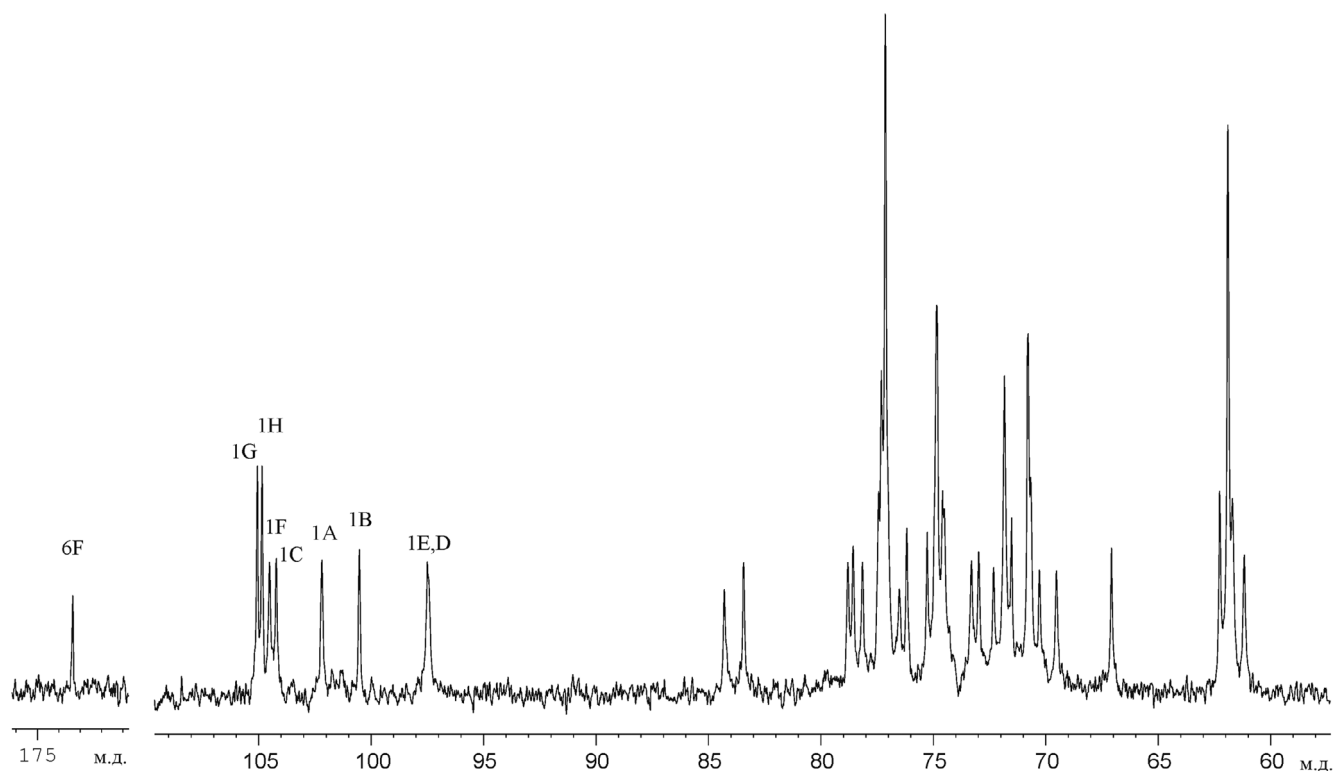


Рис. 5. Спектр ^{13}C ЯМР полимера 3 кислой фракции из клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^Т. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с табл. 1

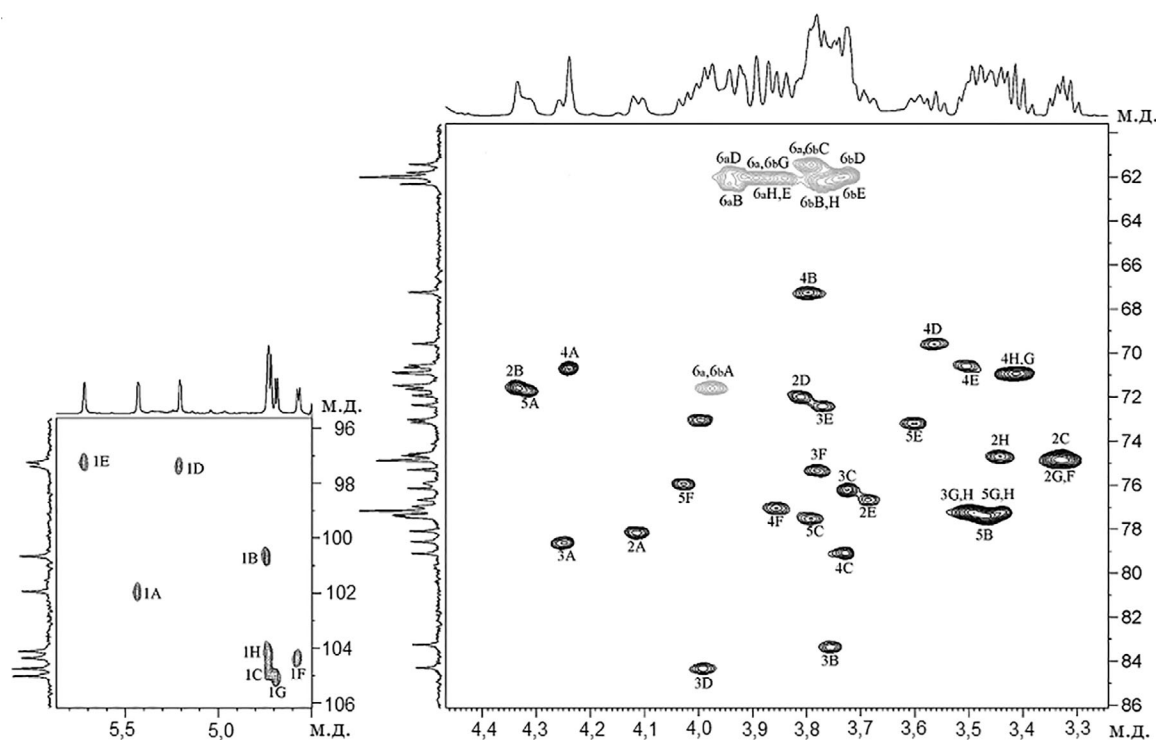


Рис. 6. Части двумерного ^1H , ^{13}C HSQC-спектра полимера 3 кислой фракции из клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^Т. Соответствующие части ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров приведены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с табл. 1

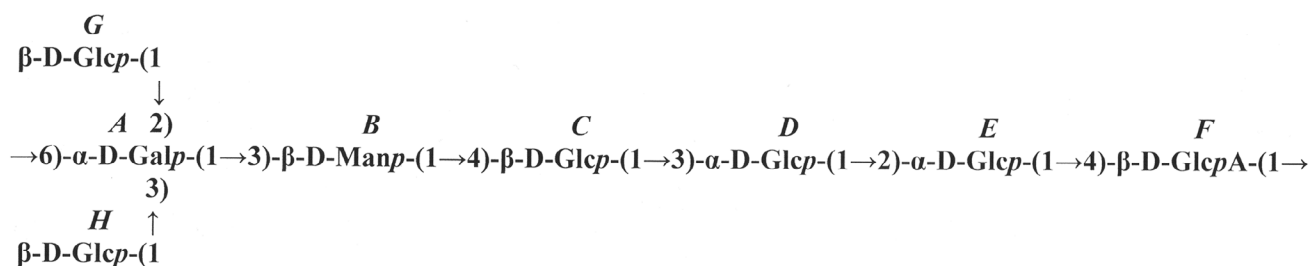


Рис. 7. Структура повторяющегося звена кислого полисахарида из клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^T – тейхуроновой кислоты (полимер 3). Заглавными латинскими буквами обозначены остатки в соответствии с табл. 1

¹H, ¹H ROESY содержал следующие пики между остатками: Н-1(А)/Н-3(В) (5,43/3,75); Н-1(В)/Н-4(С) (4,74/3,72); Н-1(С)/Н-3(Д) (4,72/3,98); Н-1(Д)/Н-2(Е) (5,21/3,69); Н-1(Е)/Н-4(Ф) (5,72/3,86); Н-1(Ф)/Н-6(А) (4,58/3,98); Н-1(Г)/Н-2(А) (4,69/4,11) и Н-1(Н)/Н-3(А) (4,72/4,25). Такая последовательность была подтверждена при анализе ¹H, ¹³C HMBC-спектра кислого полимера 3 (табл. 1, рис. S4 в Приложении), где присутствовали следующие пики между остатками: Н-6(А)/С-1(Ф) (3,98/104,4); Н-3(В)/С-1(А) (3,75/102,2); Н-4(С)/С-1(В) (3,72/100,7); Н-3(Д)/С-1(С) (3,98/104,2); Н-2(Е)/С-1(Д) (3,69/97,5); Н-4(Ф)/С-1(Е) (3,86/97,5); Н-2(А)/С-1(Г) (4,11/105,1) и Н-3(А)/С-1(Н) (4,25/104,8).

Абсолютную конфигурацию моносахаридных остатков в полимере 3 определяли по гликозилирующим эффектам в ¹³C ЯМР-спектре согласно закономерностям, описанным ранее, принимая во внимание D-конфигурацию глюко-остатков (Glcp и GlcpA) [9]. Аналогичный подход был использован при определении абсолютных конфигураций моносахаридных остатков гликополимеров [3, 4]. Отрицательный (–0,7 м.д.) γ-эффект гликозирования β-Glcp по С-6 (остаток С) характерен для D-абсолютной конфигурации гликозилирующей β-пиранозы, то есть β-Manp (остаток В). Гликозилирующие эффекты, как большой положительный (+9,1 м.д.) α-эффект Manp по С-3, так и малый по модулю отрицательный β-эффект (–0,1 м.д.) Manp по С-2 (остаток В), типичны для одинаковой абсолютной конфигурации остатков В и С. Таким образом, абсолютная D-конфигурация Galp (остаток А) следует из D-конфигурации β-Manp (остаток В).

Структура повторяющегося звена полимера 3, ТУК, представлена на рис. 7.

В результате проведенного исследования установлены структуры трех гликополимеров клеточной стенки типового штамма *R. tritici*. Структуры полимеров (рамноманнаны и тейхуроновая кислота) описаны впервые у прокариотных микроорганизмов.

Полимер 1 – разветвленный рамноманнан, в цепи которого остатки D-маннозы частично замещены остатками D-ксилопиранозы (Manp, Xylp, 2/1). Отметим, что рамноманнан (с D-маннозой) с другой локализацией гликозидных связей в цепи, а также с D-ксилофуранозой на остатках маннозы был выявлен в О-полисахариде грам-отрицательных бактерий рода *Citrobacter* [10].

Полимер 2 – линейный рамноманнан – не содержит ксилозы и с иной локализацией гликозидной связи между остатками маннозы и рамнозы в цепи. Возможно, что представленные повторяющиеся единицы (рис. 4) входят в состав одного полимера.

Полимер 3, ТУК, состоит из остатков моносахаридов – GlcA, Gal, Man и Glc в соотношении 1/1/1/5, при этом два остатка β-D-Glcp являются терминальными на остатке α-D-Galp. Представленная ТУК (рис. 7) содержит 8 остатков моносахаридов в повторяющемся звене. Большинство описанных ТУК состоят из дисахаридных звеньев, однако встречаются полимеры, содержащие 4 и более моносахаридных остатков в повторяющемся звене [11].

В табл. 2 представлены структуры гликополимеров клеточных стенок *R. tritici* в сравнении с изученными ранее у *R. toxicus*, «*Rathayibacter tanacetii*» и *R. iranica* [3, 4]. Эти данные свидетельствуют, что каждый упомянутый вид имеет индивидуальный набор различных по структуре гликополимеров. Штаммы содержат линейные или разветвленные рамноманнаны с разной локализацией гликозидных связей и разным составом боковых гликозильных заместителей. Характерной особенностью описанных рамноманнанов является наличие рамнозы в D-конфигурации.

У представителей двух наиболее близких видов *R. iranica* и *R. tritici* (уровень сходства 16S рРНК генов – 99,3%) помимо рамноманнанов в клеточных стенках присутствуют гликополимеры другой природы – тейхуроновые кислоты различной структуры. К особенностям пред-

Таблица 2. Гликополимеры клеточных стенок некоторых штаммов рода *Rathayibacter*

Гликополимеры клеточных стенок	Штаммы рода <i>Rathayibacter</i>			
	<i>R. tritici</i> ВКМ Ас-1603 ^T [настоящая работа]	<i>R. toxicus</i> ВКМ Ас-1600 [3]	« <i>Rathayibacter tanacetii</i> » ВКМ Ас-2596 [3]	<i>R. iranica</i> ВКМ Ас-1602 ^T [4]
Рамноманнан 1 (PM1)	•			
Рамноманнан 2 (PM2)	•			
Рамноманнан 3 (PM3)		•		
Рамноманнан 4 (PM4)			•	
Рамноманнан 5 (PM5)				•
Полисахарид (ПС)		Δ		
Тейхуроновая кислота 1 (ТУК1)	♦			
Тейхуроновая кислота 2 (ТУК2)				♦

Примечание: (•) – рамноманнан; (Δ) – нейтральный полисахарид; (♦) – ТУК;
 (PM1) →3)-α-[β-D-Xylp-(1→2)]-D-Manp-(1→2)-α-D-Rhap-(1→3)-α-D-Manp-(1→2)-α-D-Rhap-(1→;
 (PM2) →2)-α-D-Manp-(1→2)-α-D-Rhap-(1→3)-α-D-Manp-(1→2)-α-D-Rhap-(1→;
 (PM3) →2)-α-D-Rhap-(1→3)-α-D-Manp-(1→;
 (PM4) →3)-α-D-Rhap-(1→2)-α-D-Manp-(1→;
 (PM5) →2)-α-D-Rhap-(1→3)-α-[α-D-Manp-(1→6)]-D-Manp-(1→;
 (ПС) →2)-β-[α-L-Rhap-(1→3)]-β-D-Manp-(1→4)-α-D-Manp-(1→3)-β-D-Glcp-(1→3)-α-D-Glcp-(1→2)-α-D-Glcp-(1→4)-β-D-Glcp-(1→;
 (ТУК1) →6)-[β-D-Glcp-(1→2) и β-D-Glcp-(1→3)]-α-D-Galp-(1→3)-β-D-Manp-(1→4)-β-D-Glcp-(1→3)-α-D-Glcp-(1→2)-α-D-Glcp-(1→4)-β-D-GlcpA-(1→;
 (ТУК2) →3)-α-[α-D-Glcp-(1→2)]-L-Rhap-(1→4)-β-D-GlcpA-(1→2)-α-D-Manp-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-β-D-Glcp-(1→.

ставленных ТУК можно отнести отсутствие в цепи N-ацетилированных производных моносахаридов, которые присутствуют в структурах большинства полимеров этого класса [11]. У генетически более удаленного от них вида *R. toxicus* (98,3 и 97,8% сходства 16S рРНК генов соответственно [12]) найден второй нейтральный полисахарид, в то время как ТУК отсутствует.

Штамм «*Rathayibacter tanacetii*» [13] отличается от трех, описанных выше, наличием в клеточной стенке только одного гликополимера – рамноманнана.

Таким образом, представители изученных к настоящему времени видов рода *Rathayibacter* содержат индивидуальные наборы уникальных гликополимеров, что дифференцирует их на уровне фенотипа. При этом все вышеупомянутые штаммы характеризуются общим свой-

ством – в их клеточной стенке присутствуют рамноманнаны с D-Rhap, что, возможно, является характерным признаком для актинобактерий данного рода.

Финансирование. Работа выполнялась в рамках программы исследований № ЦИТИС: АААА-А16-116021660068-1, запланированной в МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедра микробиологии 2016–2022 гг.

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

- Evtushenko, L.I., and Dorofeeva, L.V. (2012) Genus XXII. *Rathayibacter*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Whitman, W., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M., Ludwig, W., Suzuki, K., and Parte, A., eds), vol. 5, Springer New-York, NY, USA, pp. 953–964.
- Murray, T.D., Schroeder, B.K., Schneider, W.L., Luster, D.G., Sechler, A., Rogers, E.E., and Subbotin, S.A. (2017) *Rathayibacter toxicus*, other *Rathayibacter* species inducing bacterial head blight of grasses, and the potential for livestock poisonings, *Phytopathology*, **107**, 804–815.
- Shashkov, A.S., Tul'skaya, E.M., Dmitrenok, A.S., Streshinskaya, G.M., Potekhina, N.V., Senchenkova, S.N., Piskunkova, N.F., Dorofeeva, L.V., and Evtushenko, L.I. (2018) Rhamnose-containing cell wall glycopolymers from *Rathayibacter toxicus* VKM Ac-1600 and «*Rathayibacter tanacetii*» VKM Ac-2596, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 717–726.

4. Dmitrenko, A.S., Shashkov, A.S., Streshinskaya, G.M., Tul'skaya, E.M., Potekhina, N.V., Senchenkova, S.N., Dorofeeva, L.V., and Evtushenko, L.I. (2019) New rhamnose-containing glycopolymers from *Rathayibacter iranicus* VKM Ac-1602^T cell wall, *Carbohydr. Res.*, **482**, 107728.
5. Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., and Whitman, W.B. (2002) Report of Ad Hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 1043–1047.
6. Schumann, P., Kämpfer, P., Busse, H.J., and Evtushenko, L.I. (2009) Proposed minimal standards for describing new genera and species of the suborder *Micrococcinae*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, 1823–1829.
7. Potekhina, N.V., Streshinskaya, G.M., Tul'skaya, E.M., and Shashkov, A.S. (2011) Cell wall teichoic acids in the taxonomy and characterization of gram-positive bacteria, in *Methods in Microbiology* (F.A. Rainey, F.A., A. Oren, A., eds.), Vol. 38, Chapt. 6, Academic Press/Elsevier, Amsterdam, pp. 131–164.
8. Gerwig, G.J., Kamerling, I.P., and Viegenthart, J.F.G. (1979) Determination of the absolute configuration of monosaccharides in complex carbohydrates by capillary G.L.C., *Carbohydr. Res.*, **77**, 1–7.
9. Shashkov, A.S., Lipkind, G.M., Knirel, Y.A., and Kochetkov, N.K. (1988) Stereometrical factors determining the effects of glycosylation on the ¹³C chemical shifts in carbohydrates, *Magn. Reson. Chem.*, **26**, 735–747.
10. Knirel, Y.A. (2011) Structure of O-antigens, in *Bacterial lipopolysaccharides* (Knirel, Y.A., and Valvano, M.A., eds), Springer-Verlag/Wien, pp. 41–115, doi: 10.1007/978-3-7091-0733-1_3.
11. Tul'skaya, E.M., Shashkov, A.S., Streshinskaya, G.M., Senchenkova, S.N., Potekhina, N.V., Kozlova, Yu.I., and Evtushenko, L.I. (2011) Teichuronic and teichulosonic acids of actinomycetes, *Biochemistry* (Moscow), **76**, 904–913.
12. Стародумова И.П. (2018) Развитие системы классификации актинобактерий рода *Rathayibacter*, Дисс. канд. биол. наук, Москва, с. 77.
13. Vasilenko, O.V., Starodumova, I.P., Tarlachkov, S.V., Dorofeeva, L.V., Avtikh, A.N., and Evtushenko, L.I. (2016) Draft genome sequence of “*Rathayibacter tanacetii*” strain VKM Ac-2596 isolated from *Tanacetum vulgare* infested by a foliar nematode, *Genome Announc.*, **4**, e00512–e00516.

A. S. Shashkov¹, E. M. Tul'skaya^{2}, G. M. Streshinskaya²,
A. S. Dmitrenok¹, N. V. Potekhina², S. N. Senchenkova¹,
N. F. Piskunova², L. V. Dorofeeva³, and L. I. Evtushenko³**

³ *All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia*

Accepted December 18, 2019

The structures of three cell wall glycopolymers of the phytopathogen *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603^T (family Microbacteriaceae, order Micrococcales, class Actinobacteria) were established by chemical methods and NMR spectroscopy. Polymer 1 is a branched rhamnomannan with the repeating unit $\rightarrow 3)-\alpha-[\beta-D\text{-Xylp}-(1\rightarrow 2)]-D\text{-Manp}-(1\rightarrow 2)-\alpha-D\text{-Rhap}-(1\rightarrow 3)-\alpha-D\text{-Manp}-(1\rightarrow 2)-\alpha-D\text{-Rhap}-(1\rightarrow$; polymer 2 is a linear rhamnomannan with the repeating unit $\rightarrow 2)-\alpha-D\text{-Manp}-(1\rightarrow 2)-\alpha-D\text{-Rhap}-(1\rightarrow 3)-\alpha-D\text{-Manp}-(1\rightarrow 2)-\alpha-D\text{-Rhap}-(1\rightarrow$; polymer 3 is a branched teichuronic acid containing monosaccharides residues GlcA, Gal, Man, and Glc at the a 1 : 1 : 1 : 5 ratio (see the text for the structures). Glycopolymers with these structures were identified in prokaryotic microorganisms for the first time. Species-specific sets of cell wall phosphate-free glycopolymers of four species from the *Rathayibacter* genus (*R. tritici* VKM Ac-1603^T, *R. iranicus* VKM Ac-1602^T, *R. toxicus* VKM Ac-1600, and “*Rathayibacter tanacetii*” VKM Ac-2596) are discussed. All studied strains have a common property – the presence of linear or branched rhamnomannans with D-rhamnose, but the positions of glycosidic bonds and side substituents in their molecules are different and may serve as usefull chemotaxonomic marker of the genus *Rathayibacter*.

Keywords: *Rathayibacter*, cell wall, rhamnomannan, teichuronic acid, D-rhamnose, NMR-spectroscopy

УДК 577.1

ФОСФАТАЗЫ МОНО- И ДИФОСФАТА ТИАМИНА В СИНАПТОСОМАХ МОЗГА БЫКА

© 2020 В.А. Алешин^{1,2*}, О.А. Меженская³, Ю.М. Пархоменко³,
Т. Кэне⁴, В.И. Буник^{1,2,5*}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия;
электронная почта: aleshinvasily@gmail.com; bunik@belozersky.msu.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия

³ Институт биохимии им. А.В. Палладина НАНУ, 01601 Киев, Украина

⁴ Институт экспериментальной медицины университета имени Отто фон Гюрке, 39120 Магдебург, Германия

⁵ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119992 Москва, Россия

Поступила в редакцию 31.12.2019

После доработки 08.01.2020

Принята к публикации 09.01.2020

Активности фосфатаз моно- и дифосфатов тиамина меняются при нейродегенеративных заболеваниях, однако молекулярная природа этих ферментов у млекопитающих не определена в полной мере. В данной работе фракция синапсомом мозга быка, обогащенная фосфатазными активностями в отношении производных тиамина, была подвергнута аффинной хроматографии на модифицированной тиамином сефарозе (тиамин-сефарозе). В последовательных элюатах белков, связавшихся с носителем, растворами тиамина (pH 7,4 или 5,6), хлорида натрия и мочевины характеризовали фосфатазные активности в отношении тиаминмонофосфата (ТМФ), тиаминдифосфата (ТДФ) и структурно сходных с тиамином пуриновых нуклеотидов. Элюируемые на каждой стадии белки идентифицировали методом масс-спектрометрии, используя базу данных SwissProt по всем организмам, ввиду недостаточной аннотации генома быка. В элюате кислым раствором тиамина идентифицировали пептиды, найденные в двух бактериальных фосфатазах: щелочной фосфатазе L из семейства DING-белков и экзополифосфатазе. Представленность пептидов фосфатазы L во фракциях элюируемых белков коррелировала с элюцией ТМФ-азной активности, а экзополифосфатазы — с элюцией ТДФ-азной активности. Профили элюции данных белков и активностей в отношении фосфатов тиамина отличались от профилей элюции фосфатаз нуклеотидов, свидетельствуя о специфичности ферментов к производным тиамина. Направленный поиск DING-фосфатаз млекопитающих в элюатах с тиамин-сефарозы выявил преимущественную элюцию X-DING-CD4 тиамином (pH 5,6). Для экзополифосфатазы выявлено структурное сходство с обладающими ТДФ-азной активностью апиразами. Полученные результаты свидетельствуют в пользу фосфатазных активностей DING-белков и апираз млекопитающих в отношении ТМФ и ТДФ соответственно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апираза, тиамин, тиаминмонофосфатаза, тиаминдифосфатаза, DING-фосфатаза, HPBP, X-DING-CD4.

DOI: 10.31857/S0320972520030136

Тиамин (витамин B1) является незаменимым водорастворимым витамином. Его функция как предшественника тиаминдифосфата (ТДФ) — кофермента энергетического метабо-

лизма — давно известна. Однако помимо этого накоплено большое количество данных о роли тиамина и его производных в качестве регуляторов синаптической нейротрансмиссии и транскрипции [1, 2]. В клетках млекопитающих, помимо тиамина и ТДФ, который является основным представителем тиаминового пула, содержится также достаточно много тиаминмонофосфата (ТМФ) [2]. При этом из ферментов, осуществляющих превращения между тиамином, ТМФ и ТДФ, на молекулярном уровне охарактеризованы лишь тиаминдифосфокиназа (ЕС 2.7.6.2) и кислая фосфатаза простаты

Принятые сокращения: ТМФ — тиаминмонофосфат; ТДФ — тиаминдифосфат; тиамин-сефароза — модифицированная тиамином сефароза (тиамин-N-4-азобензоил-ε-гидразидсефароза 4B); DING-белки — семейство белков DING (названо по началу N-концевой последовательности); HPBP — фосфат-связывающий DING-белок человека; X-DING-CD4 — секретируемый белок DING из CD4(+) Т-клеток.

* Адресат для корреспонденции.

(ЕС 3.1.3.5) [3]. Гены многих тканеспецифичных фосфатаз, обладающих активностями в отношении фосфатов тиамин-связывающих белков, до сих пор не идентифицированы [2]. В частности, это относится к синаптосомальным тиамин-связывающим белкам мозга млекопитающих, обладающим высокой фосфатазной активностью по отношению к фосфорилированным производным тиамин-связывающих белков [4, 5]. В этой связи целью данной работы было провести масс-спектрометрическую идентификацию фосфатаз в белковых фракциях, получаемых очисткой фосфатазных активностей синаптосом мозга быка путем аффинной хроматографии, используя модифицированную тиамин-связывающую сепарозу (тиамин-сепарозу). Актуальность данного исследования для медицины определяется корреляцией между развитием болезни Альцгеймера и изменением активностей ТДФ-аз и ТМФ-аз в крови пациентов, сопровождающихся снижением уровней ТДФ и ТМФ [6]. Поскольку уровень ТДФ, в отличие от уровня амилоидных агрегатов, коррелирует со скоростью метаболизма глюкозы в мозге [7] данные ферменты метаболизма фосфатов тиамин-связывающих белков могут быть потенциальными мишенями для разработки эффективных комбинированных терапий нейродегенеративных заболеваний. Отсутствие же молекулярной идентификации таких фосфатаз не позволяет использовать эти ферменты для таких подходов к лечению заболеваний.

Проведенное нами исследование показало, что плохая молекулярная идентификация фосфатаз, участвующих в метаболизме тиамин-связывающих белков, может отчасти быть связана с проблемой аннотации генов эукариот, имеющих, в отличие от бактериальных генов, сложную интрон-экзонную структуру. Например, представители семейства белков DING хорошо идентифицированы у бактерий, но у млекопитающих (в основном у человека) обнаружены лишь на уровне мРНК и белка [8–10]. В представленной работе получены данные в пользу участия плохо идентифицируемых в геномах млекопитающих фосфатаз семейства DING в дефосфорилировании ТМФ, а апираз — в дефосфорилировании ТДФ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. В исследованиях использованы следующие реактивы: ТДФ, AMP, ADP, ATP, GDP, GTP, UMP, Tris-HCl, ингибиторы протеаз AEBSF, апротинин, бестатин, E-64, лейпептин, пепстатин А («Sigma», США); тиамин, глюкоза («Serva», Германия); ТМФ («Fluca», Швейца-

рия); малахитовый зеленый («PanReac AppliChem», Испания); глицерин («Biomedicals, LLC», США). Растворы готовили на деионизированной воде стандарта Milli-Q, использованные в работе соли были наивысшей степени чистоты.

Тиамин-N-4-азобензоил-ε-гидразидсепарозу 4В (тиамин-сепароза) синтезировали аналогично ранее опубликованному протоколу [11].

Приготовление образцов для аффинной хроматографии. Мозг быков возрастом 1,5–3 года был получен на бойне (г. Киев). Ацетоновый порошок из частично очищенной фракции синаптосом мозга, обогащенной фосфатазными активностями по отношению к производным тиамин-связывающих белков [4, 5], получали согласно ранее описанной методике [5] и хранили сухим при –70 °С. Экстракцию белков ацетонового порошка проводили согласно ранее описанному протоколу [12].

Аффинная хроматография. Хроматографию с использованием тиамин-сепарозы проводили аналогично опубликованному протоколу [13]. Вкратце, экстракт ацетонового порошка мозга наносили на колонку с тиамин-сепарозой, предварительно уравновешенную буфером элюции (буфер Кребса–Рингера: 24,9 мМ NaHCO₃; 118 мМ NaCl; 2,34 мМ KH₂PO₄; 4,6 мМ KCl; 1,19 мМ MgSO₄; 2,42 мМ CaCl₂ и 10 мМ глюкозы, pH 7,4). Удаление не связавшихся белков контролировали по оптической плотности элюата при 280 нм до базовой линии. Связавшиеся с тиамин-сепарозой белки элюировали буфером Кребса–Рингера, содержащим 5 мМ раствор тиамин-связывающих белков, pH 7,4 или 10 мМ раствор тиамин-связывающих белков, pH 5,6. Для дальнейшей ступенчатой элюции использовали 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4, содержащий 1 М NaCl или 2 М мочевины, как описано ранее [12, 13].

Измерение активности фосфатаз. Активность фосфатаз измеряли по продукции неорганического фосфата с использованием одного из следующих субстратов: ТМФ, ТДФ, AMP, ADP, ATP, IMP, GDP и GTP. Уровень фосфата определяли, как описано ранее [12, 14].

Измерение концентрации белка в образцах. Концентрацию белка определяли по методу Lowry et al. [15].

Характеристика тиамин-зависимых протеомов исследуемых образцов. Элюированные с тиамин-сепарозы белки разделяли с помощью электрофореза в денатурирующих условиях с последующей идентификацией методом масс-спектрометрии (LC-MS/MS) после трипсинолиза, как описано ранее [12]. Ввиду плохой аннотации белков быка в базе UniProtKB/TrEMBL идентификацию пептидов проводили

по курируемой базе данных UniProtKB/SwissProt, используя для поиска программное обеспечение «Biotools Software for Protein Analysis» («Bruker», Германия). В связи с отсутствием многих белков быка в этой базе поиск пептидов и белков проводили по всем организациям. Результаты такого скрининга проверяли и уточняли вручную, осуществляя направленный поиск гомологичных идентифицированным фосфатазам белков быка или млекопитающих по другим базам данных.

Определение относительного содержания белков в образцах. Содержание исследуемых белков в частично очищенных препаратах оценивали с помощью полуколичественного метода, основывающегося на пропорциональности между количеством белка в препарате и долей покрытия последовательности белка пептидами, идентифицированными при масс-спектрометрии [13, 16]. При сравнении разных образцов контролировали параметры общего потока ионов в ходе масс-спектрометрической детекции, пропорционального количеству белка в анализируемой пробе. Данный параметр мало отличался между образцами, варьируя в диапазоне $1,4 \cdot 10^{10}$ – $1,7 \cdot 10^{10}$ условных единиц.

Биоинформатический анализ. Для поиска последовательностей DING-белков млекопитающих в базе данных UniProtKB/TrEMBL использовали сервис blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) – в варианте tblastn с параметрами по умолчанию. Поскольку TrEMBL является не курируемой базой данных, информацию о находках проверяли, используя сервис Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) и данные литературы.

Множественные выравнивания последовательностей белков получали, используя алгоритм Clustal Omega в сервисе Uniprot, и обрабатывали в программе Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

Поиск гомологов фосфат-связывающего DING-белка человека (HPBP) по его структуре (PDB ID: 2v3q) осуществляли с помощью сервиса PDBeFold (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>) с порогом сходства 40%. Аналогично осуществляли поиск гомологов экзополифосфатазы Q9ZN70, используя структуру 1ubz с наибольшей (40%) идентичностью последовательности. Выравнивания структур получали с помощью PyMOL 1.7.4 (<https://pymol.org>) и проверяли с помощью алгоритма гибкого структурного выравнивания POSA (<http://posa.sanfordburnham.org/>). Согласно этому алгоритму, для выравнивания структур 2v3q и 2qrg, а также 1ubz и 4brh не требуется введения дополнительных изгибов белковых цепей, которые могут быть необходимы для выравнивания бел-

ков, обладающих высокой подвижностью структуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аффинная хроматография синапсомембранной фракции мозга быка на тиамин-сефарозе. На рис. 1 представлены активности фосфатаз из синапсомембранной фракции мозга быка на разных стадиях аффинной хроматографии в зависимости от значения pH раствора тиамина (5,6 или 7,4) на первой, аффинной, стадии элюции. Поскольку проведенный ранее анализ показал структурное сходство белковых комплексов с производными тиамина и пуриновыми нуклеотидами [1], активности ТМФ-аз и ТДФ-аз во фракциях (рис. 1, а, б) исследовали в сравнении с активностями в отношении фосфорилированных производных пуриновых нуклеотидов – AMP, ADP, ATP, IMP, GDP и GTP (рис. 1, в–з). На рис. 1 видно, что активности фосфатаз по отношению к двум наиболее представленным фосфорилированным производным тиаминового пула млекопитающих – ТМФ и ТДФ (рис. 1, а, б) – более специфично элюируются при проведении аффинной элюции тиамином в кислой среде (pH 5,6). Так, ТМФ-аза синапсомембраны мозга быка элюируется в основном лишь при кислом значении pH аффинной элюции (рис. 1, а). Пик ТДФ-азной активности наблюдали при элюции NaCl (рис. 1, б), однако наиболее высокая и специфичная в отношении ТДФ активность на этой стадии требовала проведения аффинной элюции при pH 5,6. Если же аффинную элюцию проводили при pH 7,4, то при последующей элюции NaCl и мочевиной во фракциях обнаруживали также значительную активность в отношении пуриновых нуклеотидов (рис. 1, в–з). Таким образом, оптимальная процедура очистки ТМФ-азы и ТДФ-азы состоит в проведении аффинной элюции при pH 5,6. Удельная активность ТМФ-азы в данном элюате увеличивается в 5 раз по сравнению с ТМФ-азной активностью исходного препарата (рис. 1, а). Увеличение активности ТДФ-аз по сравнению с исходным препаратом на стадии кислой (pH 5,6) аффинной элюции – в 2 раза, а в максимуме, т.е. на стадии элюции NaCl после кислой аффинной элюции – в 3 раза (рис. 1, б).

Идентификация тиамин-зависимых фосфатаз, элюируемых при аффинной хроматографии на тиамин-сефарозе. Для идентификации синапсомембранных фосфатаз ТМФ и ТДФ использовали масс-спектрометрический анализ белковых элюатов, полученных при аффинной хроматографии на тиамин-сефарозе (см. «Материалы и

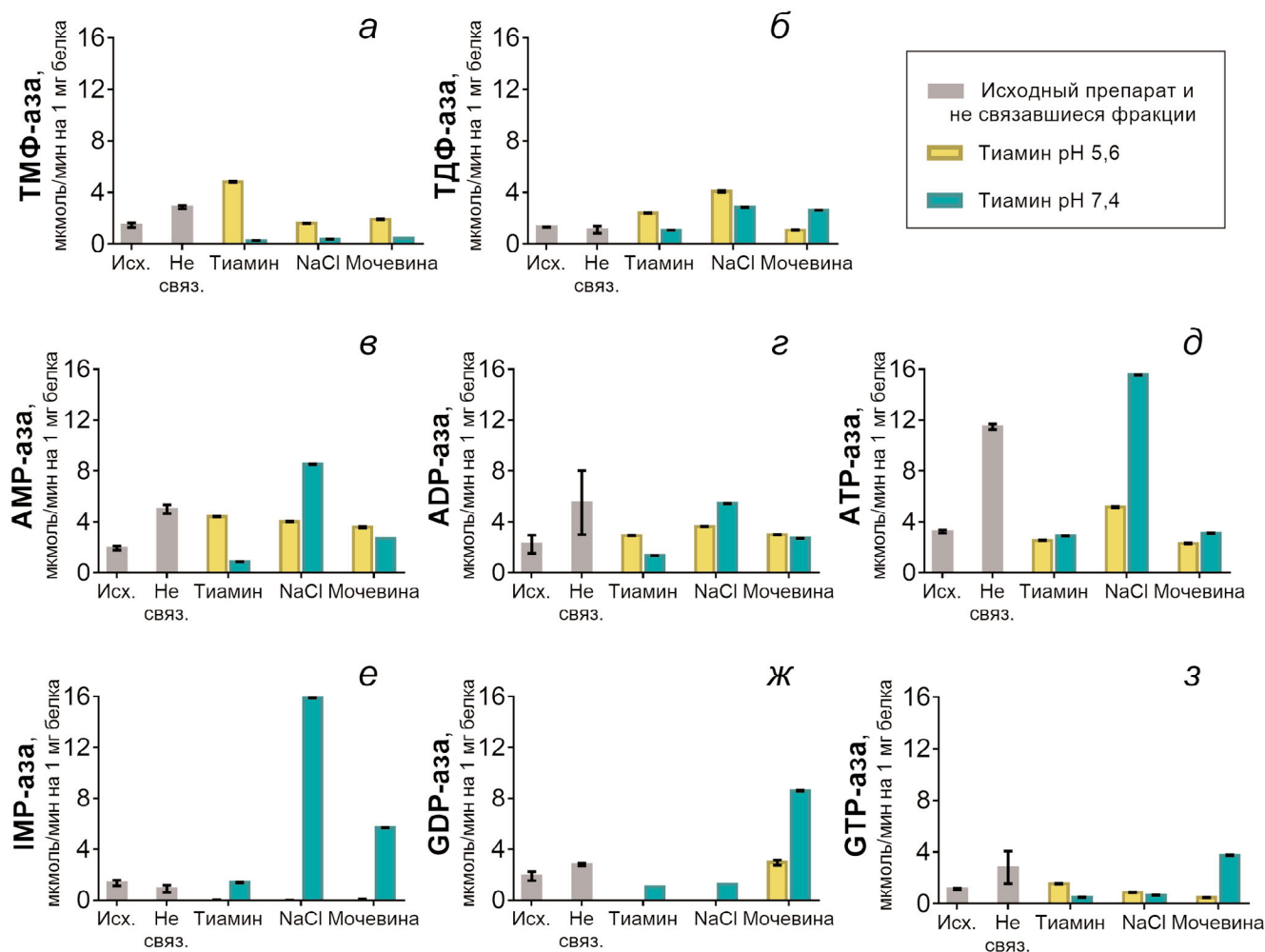


Рис. 1. Активности фосфатаз при хроматографии белков синапсомальной фракции мозга быка на тиамин-сефарозе. Показаны активности ТМФ-азы (а), ТДФ-азы (б), АМР-азы (в), АДР-азы (г), АТР-азы (д), ИМР-азы (е), ГДР-азы (ж) и ГТР-азы (з) в исходных препаратах (Исх.) и не связавшихся с тиамин-сефарозой (Не связ.) фракциях белков, а также в элюатах растворами тиамина (рН 5,6 или 7,4), NaCl и мочевиной. Хотя вариации рН элюента были лишь при аффинной элюции раствором тиамина, результаты последующей элюции NaCl и мочевиной зависели от первой стадии. Поэтому два цвета для активностей фосфатаз в элюатах даны для всех стадий элюции. Цветовой код указан в представленной на рисунке легенде. Данные получены по трем независимым хроматографическим экспериментам и представлены в виде средних значений $\pm$ SEM.

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

методы»). Определяемые в результате такого анализа наборы белков составляют так называемые тиаминовые протеомы [12, 13]. В элюируемой тиаминотом фракции масс-спектрометрически определили ~100 белков, наиболее представленными из которых были высоко экспрессируемые глутаматдегидрогеназа и малатдегидрогеназа, взаимодействующие с тиаминотом и его производными [13]. Поэтому аффинную очистку тиамин-зависимых фосфатаз, экспрессируемых в значительно меньшей степени, чем ферменты центрального метаболизма, нельзя охарактеризовать с помощью электрофоретического анализа исходного препарата и фракций элю-

ата. Вместо этого для характеристики степени очистки мы использовали увеличение удельной активности целевых ферментов (рис. 1) и количественную оценку представленности белка по покрытию его аминокислотной последовательности идентифицированными масс-спектрометрически пептидами аннотированных фосфатаз (таблица).

Поиск тиамин-зависимых фосфатаз в элюируемых протеомах проводили с использованием следующих критериев: идентифицированные пептиды должны принадлежать белкам, аннотированным как фосфатазы, их содержание в не связавшихся с тиамин-сефарозой фракциях

Представленность фосфатаз, их гомологов и белковых партнеров в элюатах белков синапсомембранной фракции мозга быка с тиамин-сефарозы, по данным масс-спектрометрии

Белок (ID)	Покрываемые пептидами, %, в элюатах с тиамин-сефарозы			
	Не св.	Тиамин (pH 5,6)	NaCl	Мочевина
Фосфатазы				
Фосфатаза L (P35482)	–	11	–	6
Экзополифосфатаза (Q9ZN70)	–	2	7	–
Белки семейства DING человека				
X-DING-CD4 (R4H484)	4	9	–	4
HPBP (P85173)	12	2	6	7
Партнер фосфат-связывающего белка человека HPBP				
Параоксоназа-1 (P27169)	–	–	–	6

Примечание. Суммированы результаты определения фосфатаз во фракции не связавшихся с тиамин-сефарозой белков (Не св.), при кислой (pH 5,6) элюции тиамин и последующих элюциях NaCl и мочевиной. При слабощелочной (pH 7,4) элюции тиамин и последующих элюциях NaCl и мочевиной данные белки не определялись. Покрываемые идентифицированными масс-спектрометрически пептидами указанных в таблице белков представлено в % общей длины пептидов от длины последовательности данного белка.

должно быть мало по сравнению с содержанием в элюатах с тиамин-сефарозы, а элюция должна определяться аффинной стадией. Из определенных в элюатах с аффинной колонки пептидов аннотированных фосфатаз данным критериям удовлетворяли лишь пептиды двух фосфатаз *Pseudomonas aeruginosa*: щелочной фосфатазы L (P35482) и экзополифосфатазы (Q9ZN70). Профили элюции пептидов этих двух фосфатаз отличались (таблица) аналогично профилям элюции ТМФ-азы и ТДФ-азы соответственно (рис. 1). При этом элюция обеих фосфатаз была чувствительна к аффинной стадии, т.к. ферменты были идентифицированы лишь после аффинной элюции при pH 5,6, но не 7,4 (таблица).

Относительная представленность пептидов данных фосфатаз во фракциях, элюируемых тиамин с тиамин-сефарозы (таблица), коррелировала с уровнями фосфатазных активностей в элюатах после аффинной хроматографии (рис. 1, а, б). Для пептидов фосфатазы L наблюдали корреляцию с уровнем активности ТМФ-аз, а для пептидов экзополифосфатазы — с уровнем активности ТДФ-аз (рис. 1, таблица). Так, наибольшую активность ТМФ-аз ($4,8 \pm 0,1$ мкмоль/мин на мг белка) детектировали при кислой (pH 5,6) элюции раствором тиамин. В элюате были определены пептиды фосфатазы L, покрывающие 11% ее последовательности. В элюате мочевиной, где активность ТМФ-азы составляла $1,9 \pm 0,1$ мкмоль/мин на

мг белка (рис. 1, а), было определено меньше пептидов фосфатазы L, покрытие последовательности 6% (таблица). Активности ТМФ-аз в других образцах были ниже и могли соответствовать фосфатазам, не имеющим высокой специфичности к ТМФ (рис. 1).

Активность ТДФ-аз была наибольшей ($4,1 \pm 0,1$ мкмоль/мин на мг белка) при элюции NaCl после кислой (pH 5,6) элюции раствором тиамин. В этих же условиях наблюдали наибольший уровень определения пептидов экзополифосфатазы (7% покрытия последовательности). На предшествующей стадии элюции тиамин (pH 5,6) и активность ТДФ-аз ($2,4 \pm 0,1$ мкмоль/мин на мг белка), и количество пептидов экзополифосфатазы (2% покрытия) были меньше по сравнению с их максимальным значением в элюате NaCl (рис. 1, таблица).

Поиск гомологов фосфатазы L из семейства DING, аннотированных у млекопитающих. Идентификация пептидов рассмотренных выше бактериальных ферментов при аффинной хроматографии белков быка указывала на присутствие в элюатах ортологичных бактериальным фосфатазам ферментов быка, последовательности которых отсутствуют в курируемой базе данных SwissProt. Поэтому для идентификации фосфатаз быка мы проводили направленный поиск идентифицированных пептидов аннотированных фосфатаз бактерий в последовательностях млекопитающих, используя базу UniProtKB/TrEMBL (см. «Материалы и методы»). В резуль-

тате поиска мы столкнулись с проблемой идентификации DING-белков, представителем которых была бактериальная фосфатаза L, в геномах млекопитающих [17–20]. Из семейства данных белков лишь последовательности белков человека HPBP [8, 21] и X-DING-CD4 [22, 23] (таблица) определены достоверно. Гомология данных белков человека с бактериальной фосфатазой L (таблица) следует из принадлежности к общему семейству белков DING и 54–66% сходства между последовательностями (рис. 2). Проведенный нами направленный поиск пептидов X-DING-CD4 показал, что данная фосфатаза была представлена в не связавшихся с тиамин-сефарозой белках меньше (4% покрытия), чем при специфической элюции тиамин (11% покрытия, таблица). При этом профиль элюции пептидов фосфатазы X-DING-CD4

совпадал с таковым для пептидов щелочной фосфатазы L (таблица), что указывает на принадлежность пептидов одному и тому же ортологичному белку DING из генома быка. Корреляция же представленности пептидов данных белков (таблица) с уровнями ТМФ-азной активности в элюатах (рис. 1, а) указывает на то, что ортолог бактериальной фосфатазы L у животных, такой как белок X-DING-CD4 или его гомолог, является ТМФ-азой. При выравнивании последовательностей один из идентифицированных пептидов, соответствующий консервативному для этих последовательностей участку, определен как общий для бактериальной фосфатазы L и X-DING-CD4 человека (рис. 2). Отсутствие совпадения других выявленных пептидов бактериальной фосфатазы L и X-DING-CD4 белка человека, очевидно, определено

X-DING-CD4	1	-----MA	DINGGGATLPQFLYQTS	-----VL	TAGFAPYIGVSGSGKGL
HPBP	1	-----	DINGGGATLPQKLYLTPD	-----VL	TAGFAPYIGVSGSGKGL
Aph L	1	MFKRSLIAASLSVAALVSAQAMAVT	GGGASLPAELYKGSADS	ILPANFSYAVT	GSGTGKN
X-DING-CD4	40	AFLNNDYSQFGTG	TKNVHWAGSDSKLTSTELSTYASTKQAAW	GKLIQVPSVATSV	VAIPF
HPBP	38	AFLNNDYSQFGTDT	TKNVHWAGSDSKLTSTELATYAADKEPCW	GKLIQVPSVATSV	VAIPF
Aph L	61	AFLTNNSLFGT	---TGTVHWAGSDSVLSGSELT	TYNSNYNCTY	GFLIQTPSVATSVTV
X-DING-CD4	99	NKAGSNAVDLSVD	QLCGVFSGRITTNWLPATGR	ICNIVVYRNEAS	SGTTELFTRFLNAK
HPBP	98	RKAGANAVDLSVKEL	CGVFSGRIDWSGITGAGRSGPIQVYRAESS	SGTTELFTRFLNAK	
Aph L	119	RKDGNTTLLNL	LSAQLCDAFSGAKTTWGQLLGT	TDSTPIRIVYRTGS	SGTTELFTRFLNSI
X-DING-CD4	159	CVNESKKEFVVT	TNFADESGVP	---AGAVPAV	---TSQGVMTKLN
HPBP	158	CTTEPGTEFAVTT	TTFANSYSILGLTEL	AGAVAAT	---GSDGVMAALNDTTVA
Aph L	179	CPTR	---FATNSTETNAR	---LPACGTLPSN	WVGVAATSTVWSTVKATNGS
X-DING-CD4	210	AAPTLAGLDDATK	VAKV	-----AGVSPAPDNV	SAAIAAV
HPBP	216	AAPTLAGLDDATK	VARV	GVKGVVNGVAVEGKSPAAANV	SAAISVV
Aph L	232	V	-----NINSNAEVS	RV	-----NGNLPTQANVSTAL
X-DING-CD4	259	PVFAAAADANDPS	VVPYPS	TGEPILGFTNLI	FSQ
HPBP	275	PVFCATT	---GGGVVAYPDS	GYPILGFTNLI	FSQCYANATQ
Aph L	277	PVFT	-----NPSAGYSIM	GMTNFEV	FGQCYKDAVS
X-DING-CD4					
HPBP	332	AAATEANAEV	PLPSNWKAAV	FASELT	ASNALSIGNTNVCNGKGRPQ
Aph L	324	AAVAAHGET	PLTPAWKSAT	VSAYTGTSEN	LAIGNTNVCNTKGRP

Рис. 2. Множественное выравнивание (Clustal Omega) последовательностей белков семейства DING, пептиды которых идентифицированы при аффинной хроматографии на тиамин-сефарозе. X-DING-CD4 – R4H484, HPBP – P85173, щелочная фосфатаза L (Aph L) – P35482. Найденные уникальные пептиды отмечены зелеными рамками.

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

структурными отличиями данных фосфатаз у человека и быка.

Определенные в элюатах пептиды другого представителя семейства DING белков млекопитающих — фосфат-связывающего белка HPBP — не совпадают с пептидами X-DING-CD4 и фосфатазы L при выравнивании их последовательностей (рис. 2). Наблюдаются и существенные отличия профилей элюции пептидов HPBP и фосфатазы L или X-DING-CD4 (таблица). Эти результаты свидетельствовали о присутствии как минимум двух DING-белков в элюатах с тиамин-сефарозы.

При элюции тиамин (pH 5,6) фосфат-связывающий белок HPBP практически не детектировался (2% покрытия), но был наиболее высоко представлен (12% покрытия) во фракции белков, не связавшихся с тиамин-сефарозой (таблица). При элюции белков с тиамин-сефарозы неспецифическими агентами (NaCl и мочевиной) HPBP детектировали на промежуточном уровне (6–7% покрытия). Такой профиль элюции не соответствует ни одной из детектированных нами фосфатазных активностей (рис. 1), хотя для HPBP показано наличие активности щелочной фосфатазы в стандартном анализе с пара-нитрофенилфосфатом [24]. Различия профилей элюции пептидов, соответствующих последовательностям щелочной фосфатазы L и белка HPBP, отсутствие корреляции уровня HPBP и активности ТМФ-аз или ТДФ-аз (рис. 1, а, б) и наличие значительной части этого белка во фракции белков, не связавшихся с тиамин-сефарозой (таблица), дает основания считать, что определенные в элюатах синапсом мозга быка пептиды соответствуют таковому бычьего ортолога HPBP, а не другому представителю DING белков — X-DING-CD4.

Следует отметить, что представленность пептидов HPBP во фракциях элюата с аффинной колонки была наиболее высока (7% покрытия) в элюате мочевиной, где также детектировали параоксоназу-1 (таблица). Гидролизующая лактоны, эфиры и фосфорорганические соединения параоксоназа-1 (ген *PONI*) прочно связывает HPBP и соочищается с ним при выделении из плазмы крови человека [9]. Взаимодействие этих белков функционально значимо для поддержания стабильности параоксоназы-1 [25]. В связи с этим возможно, что с тиамин-сефарозой связывается не сам HPBP, а прочно взаимодействующая с ним параоксоназа-1. В этом случае детекция значительной части HPBP во фракции не связавшихся с тиамин-сефарозой белков (таблица) может объясняться его свободным от параоксоназы состоянием. Наблюдаемый же профиль элюции HPBP может свидетельство-

вать о прочном связывании с тиамин-сефарозой комплекса HPBP с параоксоназой. Частичное разрушение данного комплекса идет под действием NaCl, приводя к элюции HPBP. Связь же параоксоназы с тиамин-сефарозой разрушается лишь при элюции мочевиной, приводя к идентификации обоих белков комплекса в данном элюате (таблица).

Таким образом, поиск бычьих ортологов известных DING-белков человека показал наличие двух представителей семейства DING во фракции синапсом мозга быка. Бычий ортолог фосфатазы X-DING-CD4 человека эффективно элюируется кислым раствором тиамина одновременно с ТМФ-азной активностью. Бычий ортолог фосфат-связывающего белка HPBP, по-видимому, связывается с тиамин-сефарозой через параоксоназу-1, а в изолированном виде находится среди не связавшихся с аффинным носителем белков. Хотя наши результаты не показали высокого уровня ТМФ-азной или ТДФ-азной активностей в элюируемой мочевиной фракции белков (рис. 1), это могло быть связано с инактивацией фермента в условиях элюции. Не исключено, что активность HPBP в отношении фосфатов тиамина требует комплекса с параоксоназой. В связи с известными данными об активности щелочной фосфатазы в отношении ТДФ [26] и наличием активности щелочной фосфатазы у HPBP [24] представляется перспективным дальнейшее исследование участия HPBP в метаболизме фосфатов тиамина.

Гомология DING-белка человека и бактериального тиамин-связывающего белка. Наличие структурного и/или функционального сходства может указывать на гомологию белков с низкой консервативностью аминокислотных последовательностей. Используя сервис PDBeFold и структуру DING-белка человека HPBP (PDB ID: 2v3q) — единственного DING-белка млекопитающих с известной пространственной структурой, — был проведен поиск его структурных гомологов (см. «Методы исследования»). Помимо бактериальных представителей семейства DING-белков данный поиск определил структурное сходство DING-белка человека HPBP с бактериальными субъединицами ABC-транспортеров. Хотя наибольшим структурным сходством с фосфат-связывающим DING-белком человека HPBP обладали фосфат-связывающие белки PstS, в качестве гомолога был идентифицирован также белок ThiB *Escherichia coli* (PDB ID: 2qru), связывающий тиамин, ТМФ и ТДФ. Гомологичные белки DING и PstS показывают до 30% идентичности по аминокислотной последовательности [17]. Сходство последовательностей HPBP и ThiB *E. coli* незначи-

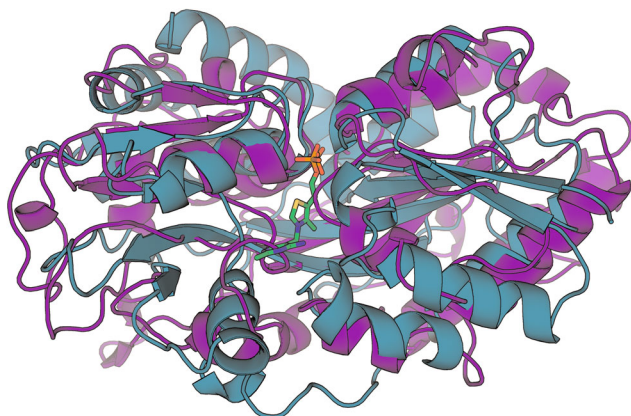


Рис. 3. Структурное выравнивание фосфат-связывающего белка человека HPBP из семейства DING (PDB ID: 2v3q, белок показан фиолетовым) и бактериального тиамин-связывающего белка ThiB (PDB ID: 2qgu, белок показан бирюзовым) с фосфатом (оранжевые связи с красными атомами кислорода) и ТМФ (зеленые атомы углерода) соответственно.

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

тельное — всего 15% идентичных остатков. Однако выравнивание структур белков HPBP и ThiB (рис. 3) показывает не только общее строение, проявляющееся в соответствии элементов вторичной структуры, но и совпадение центров белков, связывающих фосфат и фосфатную группу ТМФ (рис. 3). Таким образом, обнаружено функциональное и структурное сходство белков HPBP и ThiB.

Идентификация экзополифосфатазы как потенциальной ТДФ-азы. Профиль элюции пептидов экзополифосфатазы *P. aeruginosa*, идентифицированных при аффинной хроматографии на тиамин-сефарозе при кислой элюции тиаминном (пептид YAQAYTAAR) и NaCl (пептиды VQLAAGLDEER, YAQAYTAAR и HGAYLIEHSDLAGFSR), соответствует профилю элюции ТДФ-азной активности (таблица, рис. 1). Экзополифосфатаза относится к семейству экзополифосфатаз/гуанозинпентафосфатфосфогидролаз и является многофункциональным ферментом, гидролизующим полифосфаты до ортофосфатов при возможном сопряжении данной реакции с АДФ-киназной [27]. Таким образом, сведения о данном ферменте не исключают связывания и гидролиза ТДФ, обладающего структурным сходством с АДФ, в его активном центре.

Аминокислотная последовательность экзополифосфатазы *P. aeruginosa* не гомологична таковой экзополифосфатазы млекопитающих (ген *PRUNE1*). Определить гомологи бактериальной экзополифосфатазы у млекопитающих не удалось и с использованием поиска blast. При на-

правленном поиске идентифицированных пептидов экзополифосфатазы в базе данных UniProtKB/TrEMBL не были обнаружены значимые совпадения с имеющимися на данный момент последовательностями млекопитающих. Анализ доменной структуры экзополифосфатазы *P. aeruginosa* показал, что на *N*-конце ее последовательности аннотирован экзополифосфатазный/гуанозинпентафосфатфосфогидролазный домен Ppx-GppA (PF02541). Из недавно полученной трехмерной структуры гомолога этого фермента из *E. coli* следует, что оставшаяся часть последовательности экзополифосфатазы формирует второй не охарактеризованный С-концевой домен [28]. Используя разрешенную структуру ближайшего гомолога определенной нами экзополифосфатазы (PDB ID: 1u6z, идентичность 40%), мы провели поиск гомологичных белков млекопитающих с помощью PDBFold. Помимо бактериальных белков такой поиск обнаружил гомологию с эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролазами (апиразами) крысы (на примере одного из паралогов, кодируемого геном *ENTPD2*) [29]. Анализ найденного сходства показал, что апиразный домен (GDA1_CD39, PF01150) относится к тому же структурному семейству SCOP (Ppx/GppA phosphatase), что и *N*-концевой домен экзополифосфатаз/гуанозинпентафосфатфосфогидролаз (Ppx-GppA, PF02541).

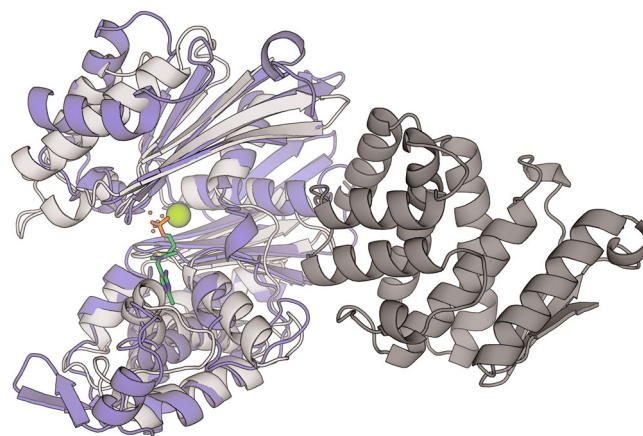


Рис. 4. Структурное выравнивание экзополифосфатазы и апиразы. В структуре экзополифосфатазы из *E. coli* (PDB ID: 1u6z) *N*-концевой домен показан светло-серым, а С-концевой домен — темно-серым. В структуре апиразы из *Legionella pneumophila* (PDB ID: 4brh) апиразный домен показан голубым. Апираза включает ион магния (показан в виде зеленой сферы) и ванадийсодержащий аналог ТДФ. Атомы ванадата показаны маленькими шариками, атомы углерода аналога ТДФ показаны зеленым, цвета других атомов даны в соответствии со стандартной цветовой схемой. С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Хотя в базе Pfam эти домены имеют разные идентификаторы, ввиду отсутствия достаточно-го сходства их аминокислотных последовательностей, пространственная структура *N*-концевого домена экзополифосфатазы хорошо выравнивается со структурой апиразы (рис. 4). Более того, известно связывание и гидролиз ТДФ апиразами [29]. Таким образом, экзополифосфатаза, идентифицированная по элюируемому с тиамин-сефарозы пептидам, не гомологична экзополифосфатазе млекопитающих, но имеет структурное сходство с апиразами.

Каталитической особенностью апираз является их способность гидролизовать как три-, так и дифосфатные производные при отсутствии способности расщеплять монофосфаты [29]. В этой связи следует отметить, что фосфатазная активность синапсомальных фракций по отношению к тиаминтрифосфату соотносится с фосфатазной активностью к ТДФ [4]. Такая особенность может указывать на принадлежность синапсомальной фосфатазы ТДФ и/или тиаминтрифосфата к группе апираз. Кроме того, свойства ранее выделенной, но не охарактеризованной на молекулярном уровне мембранной ТДФ-азы мозга крысы [30], во многом совпадают с известными свойствами апираз млекопитающих.

Аффинная хроматография экстракта синапсомом мозга быка на тиамин-сефарозе при кислой (рН 5,6) элюции тиаминном приводит к 4-кратной очистке ТМФ-азы и ТДФ-азы по максимальной удельной активности, определяемой

в элюатах тиаминном и NaCl соответственно. Профили элюции данных активностей коррелируют с масс-спектрометрической идентификацией пептидов фосфатаз, элюируемых с тиамин-сефарозы в зависимости от рН аффинной элюции. Структурный анализ аннотированных фосфатаз, включающих идентифицированные в элюатах с тиамин-сефарозы пептиды, показал, что ТМФ-аза мозга быка может быть ортологом белка человека X-DING-CD4, тогда как ТДФ-аза мозга быка может быть апиразой. Обнаружено опосредованное параоксоназой-1 связывание на тиамин-сефарозе DING-белка, ортологичного белку человека HPBP, обладающему активностью щелочной фосфатазы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-34-00235.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. В частности, все эксперименты с животными проводили с соблюдением этических норм согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденным директивой Евросоюза 2010/63/EU. Эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bunik, V.I., and Aleshin, V.A. (2017) Analysis of the protein binding sites for thiamin and its derivatives to elucidate the molecular mechanisms of the noncoenzyme action of thiamin (vitamin B1), in *Studies in natural products chemistry*, Vol. 53, pp. 375–429, Elsevier, Amsterdam, doi: 10.1016/b978-0-444-63930-1.00011-9.
2. Aleshin, V.A., Mkrtchyan, G.V., and Bunik, V.I. (2019) Mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin: protein targets and medical significance, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 829–850, doi: 10.1134/S0006297919080017.
3. Hurt, J.K., Coleman, J.L., Fitzpatrick, B.J., Taylor-Blake, B., Bridges, A.S., Vihko, P., and Zylka, M.J. (2012) Prostatic acid phosphatase is required for the antinociceptive effects of thiamine and benfotiamine, *PLoS one*, **7**, e48562, doi: 10.1371/journal.pone.0048562.
4. Parkhomenko, Y.M., Protasova, Z.S., Yanchiy, O.R., Khosla, K., and Donchenko, G.V. (2001) Localization of thiamine-binding protein in synaptosomes from the rat brain, *Neurophysiology*, **33**, 135–139, doi: 10.1023/a:1012840417285.
5. Постоевко В.А., Пархоменко Ю.М., Вовк А.И., Халмуратов А.Г., Донченко Г.В. (1987) Выделение и некоторые свойства тиаминсвязывающего белка синапсом головного мозга крыс, *Биохимия*, **52**, 1792–1797.
6. Pan, X., Sang, S., Fei, G., Jin, L., Liu, H., Wang, Z., Wang, H., and Zhong, C. (2017) Enhanced activities of blood thiamine diphosphatase and monophosphatase in Alzheimer's disease, *PLoS one*, **12**, e0167273, doi: 10.1371/journal.pone.0167273.
7. Sang, S., Pan, X., Chen, Z., Zeng, F., Pan, S., Liu, H., Jin, L., Fei, G., Wang, C., Ren, S., Jiao, F., Bao, W., Zhou, W., Guan, Y., Zhang, Y., Shi, H., Wang, Y., Yu, X., Wang, Y., and Zhong, C. (2018) Thiamine diphosphate reduction strongly correlates with brain glucose hypometabolism in Alzheimer's disease, whereas amyloid deposition does not, *Alzheimers Res. Ther.*, **10**, 26, doi: 10.1186/s13195-018-0354-2.
8. Diemer, H., Elias, M., Renault, F., Rochu, D., Contreras-Martel, C., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., and Chabriere, E. (2008) Tandem use of X-ray crystallography

- and mass spectrometry to obtain ab initio the complete and exact amino acids sequence of HPBP, a human 38-kDa apolipoprotein, *Proteins*, **71**, 1708–1720, doi: 10.1002/prot.21866.
9. Renault, F., Chabriere, E., Andrieu, J.P., Dublet, B., Masson, P., and Rochu, D. (2006) Tandem purification of two HDL-associated partner proteins in human plasma, paraoxonase (PON1) and phosphate binding protein (HPBP) using hydroxyapatite chromatography, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **836**, 15–21, doi: 10.1016/j.jchromb.2006.03.029.
 10. Gonzalez, D., Elias, M., and Chabriere, E. (2014) The DING family of phosphate binding proteins in inflammatory diseases, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **824**, 27–32, doi: 10.1007/978-3-319-07320-0_4.
 11. Клящицкий Б.А., Поздnev В.Ф., Митина В.Х., Воскобоев А.И., Черникович И.П. (1980) Выделение и очистка биополимеров методом аффинной хроматографии. Аффинная хроматография пируватдекарбоксилазы из пивных дрожжей, *Биоорганическая химия*, **6**, 1572–1579.
 12. Mkrtchyan, G., Aleshin, V., Parkhomenko, Y., Kaehne, T., Di Salvo, M.L., Parroni, A., Contestabile, R., Vovk, A., Bettendorff, L., and Bunik, V. (2015) Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin in brain: biochemical, structural and pathway analysis, *Sci. Rep.*, **5**, 12583, doi: 10.1038/srep12583.
 13. Mezhsenska, O.A., Aleshin, V.A., Kaehne, T., Artiukhov, A.V., and Bunik, V.I. (2020) Regulation of malate dehydrogenases and glutamate dehydrogenase in animal brain with thiamine *in vitro* and *in vivo*, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 27–39, doi: 10.1134/S0006297920010034.
 14. Chan, K.M., Delfert, D., and Junger, K.D. (1986) A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity, *Anal. Biochem.*, **157**, 375–380, doi: 10.1016/0003-2697(86)90640-8.
 15. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
 16. Bunik, V., Kaehne, T., Degtyarev, D., Shcherbakova, T., and Reiser, G. (2008) Novel isoenzyme of 2-oxoglutarate dehydrogenase is identified in brain, but not in heart, *FEBS J.*, **275**, 4990–5006, doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06632.x.
 17. Berna, A., Bernier, F., Chabriere, E., Perera, T., and Scott, K. (2008) DING proteins; novel members of a prokaryotic phosphate-binding protein superfamily which extends into the eukaryotic kingdom, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **40**, 170–175, doi: 10.1016/j.biocel.2007.02.004.
 18. Collombet, J.M., Elias, M., Gotthard, G., Four, E., Renault, F., Joffre, A., Baubichon, D., Rochu, D., and Chabriere, E. (2010) Eukaryotic DING proteins are endogenous: an immunohistological study in mouse tissues, *PLoS One*, **5**, e9099, doi: 10.1371/journal.pone.0009099.
 19. Cherrier, T., Elias, M., Jeudy, A., Gotthard, G., Le Douce, V., Hallay, H., Masson, P., Janossy, A., Candolfi, E., Rohr, O., Chabriere, E., and Schwartz, C. (2011) Human-Phosphate-Binding-Protein inhibits HIV-1 gene transcription and replication, *Virol. J.*, **8**, 352, doi: 10.1186/1743-422X-8-352.
 20. Sachdeva, R., Li, Y., Shilpi, R.Y., and Simm, M. (2015) Human X-DING-CD4 mediates resistance to HIV-1 infection through novel paracrine-like signaling, *FEBS J.*, **282**, 937–950, doi: 10.1111/febs.13192.
 21. Morales, R., Berna, A., Carpentier, P., Contreras-Martel, C., Renault, F., Nicodeme, M., Chesne-Seck, M. L., Bernier, F., Dupuy, J., Schaeffer, C., Diemer, H., Van-Dorselaer, A., Fontecilla-Camps, J. C., Masson, P., Rochu, D., and Chabriere, E. (2006) Serendipitous discovery and X-ray structure of a human phosphate binding apolipoprotein, *Structure*, **14**, 601–609, doi: 10.1016/j.str.2005.12.012.
 22. Lesner, A., Shilpi, R., Ivanova, A., Gawinowicz, M.A., Lesniak, J., Nikolov, D., and Simm, M. (2009) Identification of X-DING-CD4, a new member of human DING protein family that is secreted by HIV-1 resistant CD4(+) T cells and has anti-viral activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **389**, 284–289, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.08.140.
 23. Ivanova, A., Shilpi, R.Y., Sachdeva, R., Li, G., and Simm, M. (2012) Native X-DING-CD4 protein secreted by HIV-1 resistant CD4⁺ T cells blocks activity of IL-8 promoter in human endothelial cells infected with enteric bacteria, *Innate Immun.*, **18**, 571–579, doi: 10.1177/1753425911427065.
 24. Porzio, E., De Maio, A., Ricciardi, T., Mistretta, C., Manco, G., and Faraone-Mennella, M.R. (2018) Comparison of the DING protein from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* with human phosphate-binding protein and *Pseudomonas fluorescens* DING counterparts, *Extremophiles*, **22**, 177–188, doi: 10.1007/s00792-017-0985-4.
 25. Rochu, D., Renault, F., Clery-Barraud, C., Chabriere, E., and Masson, P. (2007) Stability of highly purified human paraoxonase (PON1): association with human phosphate binding protein (HPBP) is essential for preserving its active conformation(s), *Biochim. Biophys. Acta*, **1774**, 874–883, doi: 10.1016/j.bbapap.2007.05.001.
 26. Вовк А.И., Бабий Л.В., Муравьева И.В. (2002) Относительная реактивность тиаминмонофосфата и тиаминдифосфата при взаимодействии со щелочной фосфатазой, *Укр. биохим. журн.*, **74**, 93–96.
 27. Beassoni, P.R., Gallarato, L.A., Boetsch, C., Garrido, M.N., and Lisa, A.T. (2015) *Pseudomonas aeruginosa* exopolyphosphatase is also a polyphosphate: ADP phosphotransferase, *Enzyme Res.*, **2015**, 404607, doi: 10.1155/2015/404607.
 28. Song, H., Dharmasena, M. N., Wang, C., Shaw, G. X., Cherry, S., Tropea, J. E., Jin, D. J., and Ji, X. (2019) Structure and activity of PPX/GppA homologs from *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*, *FEBS J.*, doi: 10.1111/febs.15120.
 29. Zebisch, M., Krauss, M., Schafer, P., Lauble, P., and Strater, N. (2013) Crystallographic snapshots along the reaction pathway of nucleoside triphosphate diphosphohydrolases, *Structure*, **21**, 1460–1475, doi: 10.1016/j.str.2013.05.016.
 30. Sano, S., Matsuda, Y., Miyamoto, S., and Nakagawa, H. (1984) Thiamine pyrophosphatase and nucleoside diphosphatase in rat brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**, 292–298, doi: 10.1016/0006-291x(84)91099-4.

PHOSPHATASES OF THIAMINE MONO- AND DIPHOSPHATES IN BOVINE BRAIN SYNAPTOSOMES

V. A. Aleshin^{1,2*}, O. A. Mezhenka³, Y. M. Parkhomenko³, T. Kaehne⁴, and V. I. Bunik^{1,2,5*}

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics,
119991 Moscow, Russia; E-mail: aleshinvasily@gmail.com; bunik@belozersky.msu.ru

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

³ Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, 01601 Kyiv, Ukraine

⁴ Institute of Experimental Internal Medicine, Otto von Guericke University, 39120 Magdeburg, Germany

⁵ Sechenov First Moscow State Medical University Ministry of Health of the Russian Federation, 119992 Moscow, Russia

Received December 31, 2019

Revised January 8, 2020

Accepted January 9, 2020

Activities of the thiamine mono- and diphosphate phosphatases change in neurodegenerative diseases, but molecular identification of these enzymes in mammals is incomplete. In this work, bovine brain synaptosomes fraction, enriched with phosphatase activities toward the thiamine derivatives, was subjected to affinity chromatography using thiamine-Sepharose. Proteins bound to the affinity sorbent were sequentially eluted with solutions of thiamine (pH 7.4 or 5.6), sodium chloride and urea, and the eluates were assayed for phosphatase activities toward thiamine monophosphate (ThMP), thiamine diphosphate (ThDP) and structurally similar purine nucleotides. Protein sets in each eluted fraction were identified by mass-spectrometry; the SwissProt database for all organisms was used due to insufficient annotation of the bovine genome. In the acidic thiamine eluates, we identified peptides of two bacterial phosphatases – alkaline phosphatase L from the family of DING proteins and exopolyphosphatase. The representation of the peptides of phosphatase L and exopolyphosphatase in the eluates correlated with the elution of the ThMPase and ThDPase activities, respectively. The elution profiles of these phosphatase activities differed from those of nucleotide phosphatases, pointing to the phosphatase specificities toward the thiamine derivatives. Targeted search for mammalian DING phosphatases in eluates from thiamine-Sepharose revealed predominant elution of X-DING-CD4 protein with acidic (pH 5.6) thiamine solution. Structural similarity of the exopolyphosphatase (identified by peptides) with apyrases possessing ThDPase activity was revealed. The results obtained support the correspondence of ThMPase and ThDPase activities to mammalian DING proteins and apyrases, respectively.

Keywords: apyrase, thiamine, thiamine monophosphatase, thiamine diphosphatase, DING-phosphatase, HPBP, X-DING-CD4

УДК 578.832.1;579.22

УНИКАЛЬНАЯ БИПОЛЯРНАЯ АРХИТЕКТУРА ГЕНОВ В РНК-ГЕНОМЕ ВИРУСА ГРИППА А

© 2020 О.П. Жирнов^{1,2}

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Минздрава России, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского,
123098 Москва, Россия; электронная почта: zhirnov@inbox.ru

² Русско-немецкая академия медицинских и биотехнологических наук,
121205 Москва, Сколково, Россия

Поступила в редакцию 06.11.2019

После доработки 22.12.2019

Принята к публикации 22.12.2019

Геном вируса гриппа А состоит из 8 сегментов одноцепочечной РНК негативной полярности. Посредством классической негативно-полярной стратегии восьмой сегмент NS кодирует анти-интерфероновый белок NS1 (27 кДа) и белок ядерного экспорта NEP (14 кДа). В сегменте NS обнаружена дополнительная открытая рамка, имеющая позитивную полярность прямой трансляции вирионной РНК для третьего белка (NSP8 – negative strand protein; 18–25 кДа у различных штаммов). Обнаруженная локализация трех и более разнополярных генов на одном участке одноцепочечной молекулы РНК представляется уникальным для биосферы типом экономичной геномной архитектуры. Анализ *in silico* геномов вирусов гриппа, циркулирующих среди людей и животных, показал, что ген *NSP8* сформировался у вируса гриппа А ~100 лет назад («юный» ген) и имеет высокую эволюционную изменчивость. Получены данные, подтверждающие возможность экспрессии гена *NSP8* в организме инфицированных животных, что укрепляет концепцию о биполярной (амбисенс) стратегии генома вируса гриппа А. Обнаруженная высокая изменчивость белка NSP8 наводит на мысль о том, что этот «юный» ген находится в стадии оптимизации своей функции, и после накопления мутаций и перехода их количества в новое функциональное качество зрелого белка NSP8 возникнет полноценный биполярный вирус гриппа, который может приобрести новые непредсказуемые и угрожающие для человека и животных свойства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус гриппа, стратегия генома, ген *NSP*, амбисенс-вирусы, структура генов.

DOI: 10.31857/S0320972520030148

Вирус гриппа А имеет липидную оболочку (оболочечный вирус). Его геном состоит из 8 сегментов одноцепочечной РНК с размерами $(0,9–3,2) \times 10^3$ нуклеотидных оснований. Сегменты РНК имеют негативную полярность, так как не транслируются рибосомами, но транскрибируются вирусной полимеразой с образованием матричных РНК, с которых транслируются вирусные белки (рис. 1, а, б). У некоторых вирусных сегментов транскрипция сопряжена со сплайсингом мРНК, а трансляция происходит с различных AUG кодонов и со сдвигом трансляционной рамки. В результате геном вируса гриппа А обеспечивает синтез 16 уникальных вирусных белков по негативно-полярному пути [1, 2]. Наименьший сегмент NS вируса гриппа кодирует по негативному пути два вирусных белка: неструктурный антиинтерфероновый

белок (NS1), выполняющий функцию супрессора интерферона, и белок ядерного экспорта (NEP), регулирующий ядерный экспорт вирусных рибонуклеопротеидов в инфицированных клетках. мРНК для белка NEP претерпевает сплайсинг, приводящий к сдвигу рамки трансляции относительно гена *NS1* (рис. 1, а).

У подавляющего большинства штаммов вируса гриппа А человека геномная РНК сегмента NS имеет протяженную открытую рамку трансляции (OPT) в позитивной ориентации (рис. 1, а) [3–9]. Эту рамку обозначили, как ген белка негативной цепи сегмента 8 (NSP8) (negative strand protein; segment 8) [4, 5]. Наличие протяженной трансляционной рамки в геномной NS РНК вируса, содержащей инициаторный AUG, терминирующий UGA, и структурированную на 5' конце зону, имеющую элементы, характерные для IRES [10], предполагает, что геномная NS РНК может проявлять свойства матричной РНК и транслироваться с образованием протяженного белка NSP8. Следует отметить,

Принятые сокращения: НА – гемагглютинин; НА – нейраминидаза; NS1 – антиинтерфероновый белок; NEP – белок ядерного экспорта; NSP8 – белок негативной цепи сегмента 8; OPT – открытая рамка трансляции.

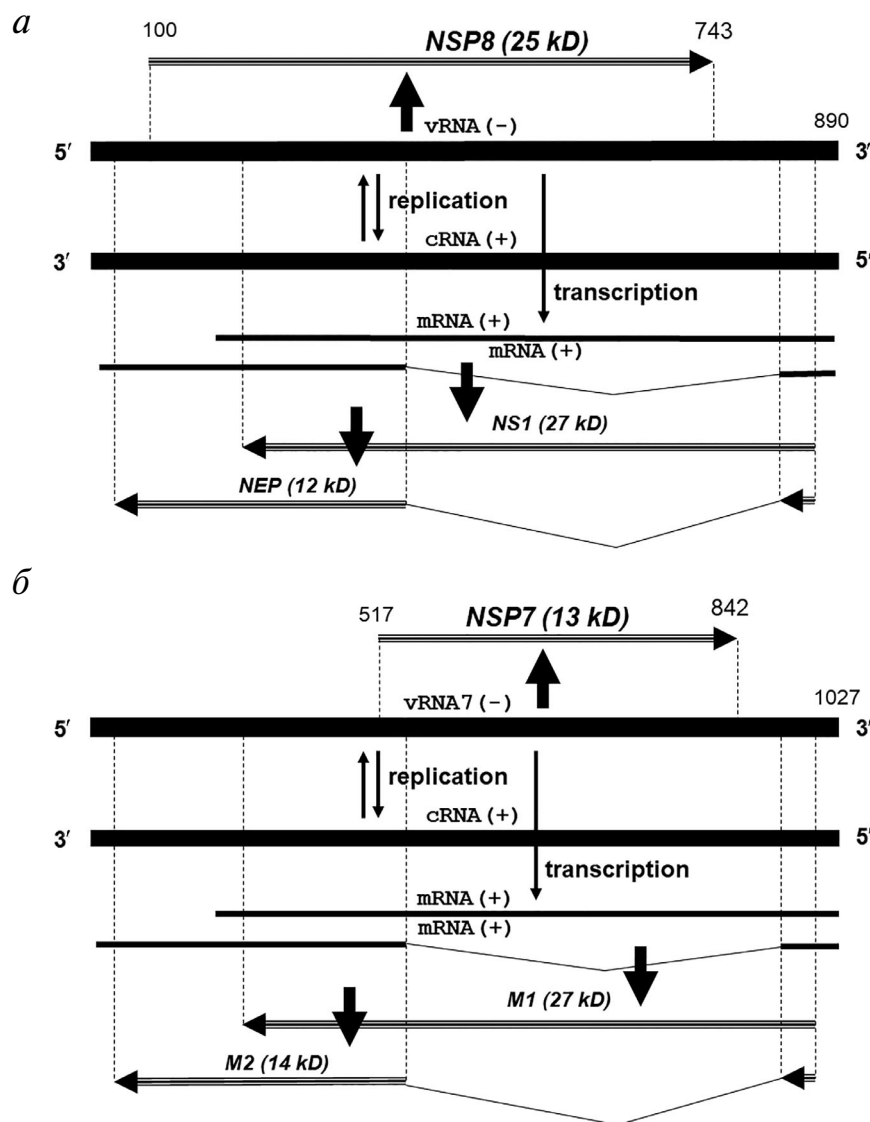


Рис. 1. Схема архитектуры генов в сегментах 7 (M) и 8 (NS) РНК вируса гриппа А. Показана локализация генов в сегменте NS (a) и M (б) (GenBank ac.n. CY121121.1 и CY121118.1 соответственно) вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). Цифрами обозначены позиции нуклеотидов от 5'-конца вирионной vRNA. vRNA – вирионная RNA отрицательной полярности; cRNA – комплементарная RNA (репликативная форма) положительной полярности. Экзоны генов для белков NS1, NEP и NSP8 показаны стрелками. Ломаной линией показана зона сплайсинга мРНК гена NEP

что отсутствие стоп-кодонов в гене *NSP8* вирусов гриппа человека не обусловлено простым структурным запретом их появления в результате возможного сцепленного повреждения генов *NS1* и/или *NEP*. На это указывает, в частности, наличие множественных стоп-кодонов, не повреждающих гены *NS1* и *NEP* в теле гена *NSP8*, как у подавляющего большинства вирусов гриппа А птиц и других животных [5], так и присутствие стоп-кодонов в гене *NSP8* у пандемического вируса гриппа А человека H1N1pdm09 (см. ниже). Более того, колокализация генов в вирусной РНК сегмента NS выстроена так, что третий нуклеотид кодона в рамке трансляции NSP8 совпадает с 3-м и 2-м нуклеотидами в ко-

донах рамок трансляции *NS1* и *NEP* соответственно (рис. 1, a). Это дает свободу синонимичных замен в положении 3 гена *NSP8* без повреждения гена *NS1*. Примечательно, что ОРТ гена *NSP8* у вирусов гриппа А человека сформировалась лишь ~100 лет назад, т.е. этот ген можно считать «юным» в плане его эволюционного развития. Это наблюдение было сделано на основании филогенетического сравнения нуклеотидных последовательностей РНК сегмента NS известных вирусов гриппа А человека и животных методом мультиметрического алгоритма (см. Suppl. в статье Zhirnov et al. [5]).

Функция белка NSP8 пока не установлена, и получены лишь первые наблюдения о том, что

при экспрессии гена *NSP8* в клетках насекомых посредством бакуловируса этот белок синтезировался в форме полноразмерного продукта гена и имел цитоплазматическую локализацию по периферии клеточного ядра [11]. Анализ *in silico* не выявляет полной гомологии белка NSP8 с известными белками из доступных баз данных и показывает частичное сходство в первичной структуре белка NSP8 с Q-мотивом DEAD-доменной РНК хеликазы гриба *Ceraceosorus bombacis*, паразитирующего на растениях [12], участком протеазного домена гидролаз класса C19, к которым относится убиквитин гидролаза шампиньона *Agaricus bisporus* var. *Burnettii* [13], трансмембранным доменом потенциал-зависимого кальциевого ионного канала одноклеточного эукариота (протиста) *Salpingoeca rosetta* [14]. Параметры обнаруженного сходства приведены в табл. 1 и показаны на рис. 2. Не исключено, что белок NSP8 может обладать полифункциональными свойствами. Структурное сходство с рядом функциональных белков может указывать на наличие у него как сходной функции, так и ингибирующей ингибиторной активности против этих функций в организме-хозяине. Для раскрытия

функции нового класса негативно-полярных белков необходимы дальнейшие исследования.

Обнаружение нового гена у вирусов гриппа А поставило ряд важных вопросов относительно его происхождения, функции и эволюционной изменчивости. Один из принципиальных вопросов состоит в том, как мог возникнуть новый ген *NSP8* в позитивной ориентации на геномном участке, кодирующем два других гена в негативной ориентации? Появление амбиполярного гена наводит на мысль о существовании пока неизвестного закона соответствия (или правила обратного детерминирования) амбиполярных генов на одном участке молекулы РНК. Возможно, закон состоит в том, что определенный предсуществующий ген может предопределять свойства и механизм возникновения нового амбиполярного гена. При отсутствии механизма детерминирования следует допустить хаотичное накопление мутаций, ведущее к появлению нового функционально смыслового гена с последующим отбором. Вероятность такого события мала, учитывая амбиполярное перекрывание предсуществующих нескольких генов, когда изменения в одном гене ведут к изменению в сцепленных амби-

Таблица 1. Параметры сходства первичной структуры

Источник аминокислотной последовательности белка NSP8	Участок сравнения в белке NSP8 ¹⁾	Участок гомологии в белке сравнения ²⁾	Параметры сходства ³⁾	Функция домена в белке сравнения ³⁾	Ссылки
NS сегмент вирус гриппа A/WSN/33 (H1N1) ac.n. U13683.1	1–108 (121)	Убиквитин гидролаза (UH) 479–600 (1121)	E: 6.1e-1, ид.: 31%, поз.: 46%	спасение белков от протеосомальной деградации в клетках посредством отщепления убиквитина	[14]
NS сегмент вирус гриппа A/Moscow/328/2003 (H3N2) ac.n. AAZ38747.1	8–195 (216)	α 1 субъединица потенциал-зависимого кальциевого канала G1 158–321 (2453)	E: 4.6e-1, ид.: 26%, поз.: 41%	трансмембранный транспорт ионов Ca ²⁺ , участвуют в регуляции апоптоза и аутофагии клеток, а также в канцерогенезе раковых клеток	[15, 16]
NS сегмент вирус гриппа A/Moscow/328/2003 (H3N2) ac.n. AAZ38747.1	43–120 (216)	Q-мотив DEAD РНК хеликазы 306–383 (904)	E: 2.4e-0, ид.: 33%, поз.: 47%	отвечает за связывание и гидролиз АТФ при функционировании РНК хеликазы	[13]

¹⁾ Указаны позиции аминокислот в NSP8 на участке гомологии. В скобках указано общее количество аминокислот в белке NSP8.

²⁾ Указаны позиции аминокислот в белке сравнения на участке гомологии. В скобках указано общее количество аминокислот в белке сравнения.

³⁾ Параметры сходства определены на основании попарного сравнения первичных структур белков в программе UniProt (рис. 2). Указаны величины E (мера количества ожидаемых совпадений в случайной базе данных), процент идентичных (ид.) и позитивных (поз.) аминокислотных позиций в сравниваемых участках белков. Позитивные аминокислотные замены — обозначают позиции, в которых идентифицированы замены на аминокислоты со сходными свойствами. Белки сравнения: трансмембранный домен субъединицы альфа-1/G1 потенциал-зависимого кальциевого ионного канала типа T (α 1/G1) одноклеточного эукариота *Salpingoeca rosetta* (ID: F2U5C1), участок протеазного домена убиквитин гидролаза (UH) типа C19 шампиньона *Agaricus bisporus* var. *Burnettii* (ID: K5Y1E3), Q-мотив DEAD РНК хеликазы растительного гриба *Ceraceosorus bombacis* (ID: A0A0P1BHD7).

a	NSP	8	FQLFLVCVSLQLSAILSLQTFDLAVLAIFRFC-FGVSGGPPFSSLLLOANLCRFLERTRTVLSF	66
			FQ + V+LL I L + LA+L +F FC FG+ G + +L Q L V S	
	$\alpha 1/G1$	158	FQSLQLLVALLLDIIPMLGS--LAITLFLFCTFGLVGVQMWKGLRQRCYDSNLTAHFVPST	215
	NSP	67	HSSPPMRTPIAFLTSSIVCPGKEGNGEISPTIAPSSVKALSN-TMVSSRSKITLKFAFNMMFF	125
			H++PP T CP PSSV N T ++ S IT	
	$\alpha 1/G1$	216	HATPPWTHYICGAPDFTCP-----PPSSVVGGENVTNTTTTSSITASV-----	262
	NSP	126	SMIAWSILMQRGPSFTCLGISMNQFLDNSSIVMSVIYREAGVETMVILSASSDSSFRIFSTICF	195
			+ A+ + R P+ F +S DN +I + +++ +ET + A+ + ++ I F	
	$\alpha 1/G1$	263	-VDAFPVCAARAPNPFAGAVS---FDNIAIACNTVFQVITLETWGNIMAAVQK AHSFWAFIYF	321
b	NSP	1	QANLCRDSETRTVLLFHS----SPPMRTPTAFLT---SSSVCPGREGSGEISPTIVPSSVK	54
			++ + E++++ L HS SP M P F+ SSS G SG+ SP+I PSS	
	UH	479	ESEVVHAGESQSISLQHSASSPKMANPIPFMNGLSSTSGSASSGQFSPSI-PSSSP	537
	NSP	55	ALSNIRVSSRSKITLKFAFSMMFL-----SMIAWSILIQRGPATFCLGMSMNQCLDISS	108
			L N + RS ++L S L + A + +QR PA L +S N C+ +S	
	UH	538	RLPNHVGNNHRSAMSLDQNPSTRLPAEANHTGGTYNAGASSLQRRPAMVRLSISQNVCTIFNS	600

Рис. 2. Частичное сходство первичной структуры белка NSP8 с белком кальциевого ионного канала (а) и убиквитин гидролазы (б). Первичную структуру белка NSP8 вируса гриппа А/Moscow/328/2003 (H3N2) (ас.н. AAZ38747.1) (а) и А/WSN/33 (H1N1) (ас.н. U13683.1) (б) анализировали в программе UniProt (<https://www.uniprot.org/blast/>) с матриксом BLOSUM-62 с брешами в режиме 250 обратных сравнений. Параметры сходства (Е — мера количества ожидаемых совпадений в случайной базе данных, процент идентичных (ид.) и позитивных (поз.) аминокислотных позиций в сравниваемых участках белков) приведены в табл. 1. Цифры на рисунке показывают позиции аминокислот в соответствующих бел-

полярных генах. В этом случае изменчивость и отбор мутаций должны быть взаимосвязаны сразу в трех вирусных генах: *NS1*, *NEP* и *NSP8*.

Возможно, что амбисенс стратегия имеет место и в других сегментах РНК вируса гриппа А. Об этом свидетельствуют протяженные ОПТ, которые обнаружены в сегментах PB1, PB2, PA, NP и М (рис. 1, б). Белковые продукты перечисленных вирусных ОПТ пока не идентифицированы в биологических системах, однако данные *in silico* указывают на трансмембранные свойства ионных каналов у выявленных гипотетических продуктов указанных позитивно-полярных генов [4, 7]. Присутствие серии амбисенс генов во многих сегментах РНК подразумевает наличие у вируса гриппа А человека и животных универсального механизма, позволяющего реализовать в клетках-мишенях как негативно-, так и позитивно-полярную стратегию генома.

Второй важный вопрос связан с высокой вариабельностью белка NSP у вирусов гриппа А человека. Наши исследования показывают, что белок NSP имеет высокую вариабельность, которая близка таковой у наиболее изменчивых гликопротеидов гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (НА), расположенных на поверхнос-

ти вирионов и являющихся главной мишенью для противовирусных факторов специфического иммунитета организма-хозяина (табл. 2). При этом два других негативно-полярных гена, *NS1* и *NEP*, в сегменте NS имеют более низкую степень вариабельности [17]. Возможны два объяснения такого различия. Во-первых, белок NSP8 может локализоваться на поверхности вирионов или инфицированных клеток, подобно НА и NA, и поэтому служить мишенью воздействия факторов врожденного и специфического иммунитета организма-хозяина, провоцирующих его повышенную изменчивость. Во-вторых, белок NSP, будучи молодым вирусным продуктом, может находиться в стадии оптимизации уровня экспрессии и своей функции по отношению к вирусным или клеточным партнерам, что и обуславливает его приспособительную изменчивость к данным партнерам. Результаты сравнительного анализа первичной структуры сегмента NS вирусов гриппа А субтипа H3N2, показывающие высокое содержание несинонимичных мутаций в гене *NSP8* ($dN/dS > 1,5$) по сравнению с генами *NS1* и *NEP* ($dN/dS \leq 1$) (табл. 3), полностью согласуются с объяснением о повышенной изменчивости гена *NSP8* и нали-

Таблица 2. Коэффициенты эволюционной изменчивости белков вируса гриппа А/Н3N2 за период 1968–2018 гг.

Вирусные белки	Молекулярная масса белка (Да)	Общее количество проанализированных последовательностей	Количество выявленных замен в белке	Коэффициент вариабельности (КВ)*
PB1	86 000	13 215	23	0,05
HA	75 000	19 639	139	0,4
NA	56 000	17 147	114	0,4
M1	27 000	16 145	12	0,09
NS1	27 000	13 847	34	0,25
NEP	12 000	13 739	5	0,08
NSP8	25 000	14 331	38	0,35

* Коэффициент вариабельности (КВ) определяли по количеству аминокислотных замен в отдельном вирусном белке у штаммов вируса гриппа человека А/Н3N2 за период 1968–2018 гг. КВ рассчитывали как общее количество аминокислотных замен за один год в расчете на 100 аминокислот в каждом белке [17]. Использовали данные GenBank. Вирусные белки: PB1 – субъединица вирусной полимеразы; HA – гемагглютинин; NA – нейраминидаза; M1 – внутренний матрикс вируса; NS1 – антиинтерфероновый белок; NEP – белок ядерного эксперта; NSP8 – белок негативной цепи сегмента 8.

чии фактора(ов) позитивной селекции (адаптации) в его эволюции [18]. Количественное накопление мутаций в ходе эволюции вируса может привести к качественному скачку в его функциональной активности. В этом случае может появиться новая разновидность вируса гриппа с неожиданными и непредсказуемыми свойствами, что таит угрозу для людей и животных. Изучение нового гена и раскрытие функции возникшего белка NSP8 позволит нейтрализовать возможность такой угрозы либо методами вакцинопрофилактики против данного белка, либо разработкой лекарственных ингибиторов данного белка или его гена.

С предположением о приспособительной изменчивости коррелирует динамика эволюции сегмента NS пандемического вируса гриппа человека H1N1pdm09, который вызвал у людей пандемию «мексиканского» гриппа в 2009 году [19]. Этот штамм вируса гриппа А, представляющий тройной реассортант вирусов гриппа человека, свиней и птиц, мигрировал к человеку из природного ареала и имел сегмент NS птичьего типа, лишённого полноценного гена *NSP*, в теле которого обнаруживалось 2 стоп-кодона. Однако в ходе прошедшей 10-летней эволюции вируса H1N1pdm09 в популяции людей этот ген утратил 1 стоп-кодон и сейчас увеличил непрерывную протяженность гена *NSP* до 240 н.о. Логично ожидать, что в ближайшее десятилетие при дальнейшей циркуляции и сохранении вируса в популяции людей вирус утратит оставшийся стоп-кодон и сформирует полноценный ген *NSP*, что при его дальнейшей оптимизации может придать вирусу неожиданные и опасные для человека свойства.

Эволюционная оптимизация гена *NSP8* может затрагивать регулирующие элементы гена. Так, например, отмечается увеличение количества AUG кодонов в стартовой зоне гена *NSP8* в ходе 50-летней эволюции вируса гриппа А человека субтипа H3N2: с одного в 1968 году до 4-х в настоящее время [5]. Увеличение количества AUG кодонов в зоне трансляционного старта может приводить к облегчению распознавания вирусной РНК факторами инициации трансляции и затем рибосомами и повышению уровня ее трансляции в инфицированной клетке-мишени. Более того, такое накопление старт-кодонов в вирусной РНК-матрице может способствовать увеличению дефектной трансляции гена *NSP8*, включая инициацию трансляции с

Таблица 3. Соотношение несинонимичных и синонимичных замен в генах *NSP8*, *NS1*, *NEP* вирусов гриппа А субтипа H3N2 за период 1968–2019 гг.

Вирусный ген	Соотношение dN/dS ¹⁾
<i>NSP8</i>	1,73
<i>NS1</i>	1,25
<i>NEP</i>	0,23

¹⁾ Соотношение несинонимичных и синонимичных мутаций (dN/dS) рассчитывали на основании данных первичной структуры сегмента NS вирусов гриппа А/Н3N2 человека из базы данных GenBank за период 1968–2019 гг. При расчете анализировали первичные последовательности соответствующих мРНК для белков NSP8, NS1, NEP. Представлены вирусные гены для белков: NS1 – антиинтерфероновый белок; NEP – белок ядерного эксперта; NSP8 – белок негативной цепи сегмента 8.

альтернативных AUG кодонов, приводящей к образованию так называемых дефектных пептидов (DRiPs), которые могут вовлекаться в регуляцию МНС-I — зависимого противовирусного иммунного ответа [20]. Однако принимая во внимание, что в бакуловирусной системе [11] и в системе трансляции *in vitro* [10] синтезировался полноразмерный и стабильный белок NSP8, идея о дефектной трансляции гена *NSP8* не кажется главным механизмом экспрессии.

Заслуживает внимания вопрос уникальности обнаруженной архитектуры биполярных генов. Локализация трех и более разнополярных генов на одном участке одноцепочечной молекулы РНК представляется уникальным типом архитектуры генов среди разнообразных организмов биосферы. Он показывает пример экономии генетической информации на уровне РНК и ее эффективной реализации для синтеза разнообразных белковых продуктов и создания максимального белкового разнообразия на единицу генетической информации в геноме РНК. Уникальность биполярной архитектуры генов в сегменте NS вируса гриппа А имеет явное отличие от амбисенс локализации генов, обнаруженной в геноме РНК флело-, тоспо-, аренавирусов животных и тениувирисов растений [21]. В отличие от перечисленных вирусов, у которых два амбиполярных гена не перекрываются и размещены в разных участках молекулы РНК, у вирусов гриппа А человека три амбиполярных гена локализованы один над другим (так называемая «стопка») на одном участке РНК (рис. 1, а, б). При неперекрывающейся архитектуре биполярных генов их изменчивость напрямую не сцеплена между собой, и они могут изменяться независимо друг от друга.

Белковый продукт гена *NSP* пока не обнаружен в биологических системах, таких как инфицированные вирусом клеточные культуры или организм животных, но имеются данные, подтверждающие возможность экспрессии вирусного РНК-генома по позитивному пути в биологических системах. Так, полноценный белок NSP8 синтезируется в системе трансляции *in vitro* с рибосомами млекопитающих на матрице полноразмерной вирионной РНК вируса гриппа [10], а также в организме инфицированных животных удается детектировать формирование спе-

цифических иммунных лейкоцитов против данного белка или его компонентов [17, 22, 23]. Свойства NSP8, как «белка-невидимки», могут быть обусловлены низким уровнем его экспрессии, лабильностью и коротким уровнем полужизни, а также возможной тканезависимой экспрессией гена *NSP8* лишь в определенных типах клеток-мишеней, содержащих факторы, необходимые для регуляции экспрессии позитивного гена *NSP*. Дальнейшее изучение должно пролить свет на эти предположения.

Заключительный пункт, связанный с обнаружением гена *NSP8*, относится к возможному изменению классификации семейства ортомиксовирусов (Orthomyxoviridae) и выделению отдельного рода амбиполярных альфа-инфлюэнза-вирусов («*Ambisense Alfabinfluenzavirus*»). Пока прямой продукт гена *NSP8* точно не идентифицирован в биологических системах вопрос о классификации остается открытым. Вместе с тем сохранение полноценного гена *NSP8* в популяции вирусов гриппа человека в течение более 100 лет указывает на функциональную необходимость этого гена для пока гипотетической группы амбиполярных вирусов гриппа. Важно отметить, что при выраженной эволюционной изменчивости белка NSP8 не обнаруживалось возникновения терминирующих стоп-кодонов, нарушающих ген *NSP8*, что также укрепляет идею о биологической детерминированности данного гена.

Финансирование. Работа выполнена при частичной поддержке научной программой SFB 293 Немецкого научного общества (DFG).

Благодарности. Автор выражает благодарность академику РАН Георгиеву Г.П. за поддержку работы и полезные дискуссии, а также д-ру D. Anhlan (Институт вирусологии Университета г. Мюнстер, Германия) за помощь в анализе вариативности гена *NSP*.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящий обзор не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dou, D., Revol, R., Ostbye, H., Wang, H., and Daniels, R. (2018) Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement, *Front. Immunol.*, **9**, 1581, doi: 10.3389/fimmu.2018.01581.
2. Vasin, A.V., Temkina, O.A., Egorov, V.V., Klotchenko, S.A., Plotnikova, M.A., and Kiselev, O.I. (2014) Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins, *Virus Res.*, **185**, 53–63, doi: 10.1016/j.virusres.2014.03.015.
3. Baez, M., Zazra, J.J., Elliott, R.M., Young, J.F., and Palese, P. (1981) Nucleotide sequence of the influenza A/duck/Alberta/60/76 virus NS RNA: conservation of the NS1/NS2 overlapping gene structure in a divergent influenza virus RNA segment, *Virology*, **113**, 397–402.

4. Zhirnov, O.P., Poyarkov, S.V., Vorob'eva, I.V., Safonova, O.A., Malyshev, N.A., and Klenk, H.D. (2007) Segment NS of influenza A virus contains an additional gene NSP in positive-sense orientation, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **414**, 127–33, doi: 10.1134/s1607672907030106.
5. Zhirnov, O.P., Vorobjeva, I.V., Safonova, O.A., Poyarkov, S.V., Ovcharenko, A.V., Anhlán, D., Malyshev, A.N., and Klenk, H.D. (2009) Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells, *J. Clin. Virol.*, **45**, 322–333, doi: 10.1016/j.jcv.2009.05.030.
6. Clifford, M., Twigg, J., and Upton, C. (2009) Evidence for a novel gene associated with human influenza A viruses, *Virology*, **6**, 198, doi: 10.1186/1743-422X-6-198.
7. Gong, Y.N., Chen, G.W., Chen, C.J., Kuo, R.L., and Shih, S.R. (2014) Computational analysis and mapping of novel open reading frames in influenza A viruses, *PLoS One*, **9**, e115016, doi: 10.1371/journal.pone.0115016.
8. Yang, C.W., and Chen, M.F. (2016) Uncovering the potential pan proteomes encoded by genomic strand RNAs of influenza A viruses, *PLoS One*, **11**, e0146936, doi: 10.1371/journal.pone.0146936.
9. Sabath, N., Morris, J.S., and Graur, D. (2011) Is there a twelfth protein-coding gene in the genome of influenza A? A selection-based approach to the detection of overlapping genes in closely related sequences, *J. Mol. Evol.*, **73**, 305–315, doi: 10.1007/s00239-011-9477-9.
10. Zhirnov, O.P., Akulich, K.A., Lipatova, A.V., and Usachev, E.V. (2017) Negative-sense virion RNA of segment 8 (NS) of influenza A virus is able to translate in vitro a new viral protein, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **473**, 122–127, doi: 10.1134/S1607672917020090.
11. Жирнов О.П., Кленк Х.Д. (2010) Интеграция гена *NSP* вируса гриппа А в геном бакуловируса и его экспрессия в клетках насекомых, *Вопросы вирусологии*, **55**, 4–8.
12. Cunningham, J.L., Bakshi, B.K., Lentz, P.L., and Gilliam, M.S. (1976) Two new genera of leaf-parasitic fungi (*Basidiomycetidae: Brachybasidiaceae*), *Mycologia*, **68**, 640–654.
13. Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques, J., Doere, M., and Linder, P. (2001) The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis, *Mol. Cell.*, **11**, 127–138.
14. Quesada, V., Dýřaz-Perales, A., Gutiérrez-Fernández, A., Garabaya, C., Cal, S., and López-Otín, C. (2004) Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**, 54–62, doi: 10.1016/j.bbrc.2003.12.050.
15. Vervliet, T., Clerix, E., Seitaj, B., Ivanova, H., Monaco, G., and Bultynck, G. (2017) Modulation of Ca²⁺ signaling by anti-apoptotic B-cell lymphoma 2 proteins at the endoplasmic reticulum-mitochondrial interface, *Front. Oncol.*, **7**, 75, doi: 10.3389/fonc.2017.00075.
16. Lauren, A., and Martin-Caraballo, M. (2019) T-type calcium channels in cancer, *Cancers*, **11**, 134, doi: 10.3390/cancers11020134.
17. Zhirnov, O.P., Konakova, T.E., Anhlán, D., Ludwig, S., and Isaeva, T.I. (2019) Cellular immune response in infected mice to NSP protein encoded by the negative strand NS RNA of influenza A virus, *Microbiol. Indep. Res. J.*, **6**, 10–17, doi: 10.18527/2500-2236-2019-6-1-28-36.
18. Yang, Z., and Bielawski, J.P. (2000) Statistical methods for detecting molecular adaptation, *Trends Ecol. Evol.*, **15**, 496–503, doi: 10.1016/s0169-5347(00)01994-7.
19. York, I., and Donis, R.O. (2013) The 2009 pandemic influenza virus: where did it come from, where is it now, and where is it going? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **370**, 241–257, doi: 10.1007/82_2012_221.
20. Wei, J., and Yewdell, J.W. (2018) Flu DRiPs in MHC class I immunosurveillance, *Virology*, **54**, 162–167, doi: 10.1007/s12250-018-0061-y.
21. Nguyen, M., and Haenni, A.L. (2003) Expression strategies of ambisense viruses, *Virus Res.*, **93**, 141–150, doi: 10.1016/s0168-1702(03)00094-7.
22. Zhong, W., Reche, P.A., Lai, C.C., Reinhold, B., and Reinherz, E.L. (2003) Genome-wide characterization of a viral cytotoxic T lymphocyte epitope repertoire, *J. Biol. Chem.*, **278**, 45135–45144, doi: 10.1074/jbc.M307417200.
23. Hickman, H.D., Mays, J.W., Gibbs, J., Kosik, I., Magadan, J.G., Takeda, K., and Yewdell, J.W. (2018) Influenza A virus negative strand RNA is translated for CD8⁺ T cell immunosurveillance, *J. Immunol.*, **201**, 1222–1228, doi: 10.4049/jimmunol.1800586.

UNIQUE BIPOLAR GENE ARCHITECTURE IN THE RNA GENOME OF INFLUENZA A VIRUS

O. P. Zhirnov

¹ *Ivanovsky Institute of Virology, Gamaleya Scientific Research Center of Epidemiology and Microbiology, Russian Ministry of Health, 123098 Moscow, Russia; E-mail: zhirnov@inbox.ru*

² *Russian-German Academy of Medical and Biotechnological Sciences, 121205 Moscow, Skolkovo, Russia*

Received November 6, 2019

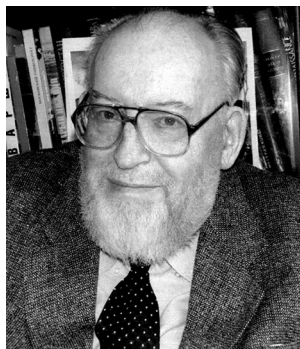
Revised December 22, 2019

Accepted December 22, 2019

The genome of influenza A virus consists of eight single-stranded negative-polarity RNA segments. The eighth segment (NS) encodes the anti-interferon protein NS1 (27 kDa) and the nuclear export protein NEP (14 kDa) via the classic negative-sense strategy. It also contains an additional positive-sense open reading frame can be directly translated into the negative strand protein 8 (NSP8; 18–25 kDa in different strains). The existence of three or more genes of the opposite polarity in the same locus of a single-stranded RNA appears to be a unique (“economical”) type of gene architecture in living organisms. *In silico* analysis of genomes of human and animal influenza A viruses revealed that the *NSP8* gene had emerged in the influenza A virus population about 100 years ago (“young” gene) and is highly evolutionary variable. The obtained experimental data suggest that *NSP8* gene is expressed in the infected animals, which strengthens the concept of bipolar (ambisense) strategy of the influenza A virus genome. The high variability of the NSP8 protein suggests that the “young” *NSP8* gene is in the process of functional optimization. Further accumulation of mutations may alter the functions of mature NSP8 protein and lead to the emergence of mature bipolar influenza A virus with some unexpected properties that would be threatening for humans and animals.

Keywords: influenza virus, genome strategy, *NSP* gene, ambisense viruses, gene structure

90-ЛЕТИЕ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ И.С. КУЛАЕВА



В марте 2020 года исполняется 90 лет со дня рождения Игоря Степановича Кулаева (26.03.1930–30.10.2013) — ученого, стоявшего у истоков развития современной биохимии микроорганизмов в нашей стране.

Игорь Степанович родился в Москве. В 1953 г. он окончил Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, затем аспирантуру на кафедре биохимии растений биологического факультета МГУ, был профессором этой кафедры. С 1956 года Игорь Степанович работал в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, а затем в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, где руководил существующей и сегодня лабораторией регуляции биохимических процессов. В 1957 г. Игорь Степанович стал кандидатом, в 1969 г. — доктором биологических наук. В 1970 г. ему было присвоено звание профессора, а в декабре 1987 г. он был избран членом-корреспондентом РАН.

И.С. Кулаев был создателем и признанным лидером одной из крупных научных школ биохимиков России. Под его руководством было защищено более 90 кандидатских диссертаций, а 22 его ученика стали докторами наук. Благодаря стараниям И.С. Кулаева сохранялись и развивались традиции, заложенные основателями российской биохимии и молекулярной биологии академиками А.И. Опариным и А.Н. Белозерским: эволюционный подход к проблемам жизнедеятельности микробной клетки в условиях изменяющейся окружающей среды. В русле его широких научных интересов всегда находились вопросы эволюционной биохимии, происхождения жизни и эндосимбиотической теории.

В течение многих лет И.С. Кулаев был членом редколлегий журналов «Микробиология» и

«Биохимия» и вносил большой вклад в их развитие. Его исследования получили широкое признание в нашей стране и за рубежом. В 2007 году за цикл работ «Биохимические и молекулярно-биологические аспекты метаболизма неорганических полифосфатов у микроорганизмов» И.С. Кулаеву была присуждена премия Президиума РАН имени А.Н. Белозерского. Его монографии по биохимии полифосфатов, дважды переизданные в нашей стране и за рубежом, до сих пор являются базовым руководством для исследователей этих уникальных молекул.

И.С. Кулаев и руководимые им научные коллективы внесли важный вклад в создание современных концепций биогенеза, структуры и функций клеточных оболочек микроорганизмов, роли неорганических полифосфатов в регуляторных процессах, функционирования бактериолитических ферментных комплексов. Важнейшим направлением его деятельности была разработка биотехнологий получения новых ферментных антимикробных средств для применения в медицине и ветеринарии. Многие направления исследований, инициированные И.С. Кулаевым, в настоящее время продолжают его ученики.

Большое внимание Игорь Степанович уделял подготовке молодых ученых, проводил огромную работу по воспитанию и закреплению молодежи в науке. Стиль его руководства был основан на максимальной самостоятельности сотрудников, постановке интересных и не рутинных задач для студентов и аспирантов, на обстановке взаимопомощи и творческой научной дискуссии в коллективе. Его высочайшая эрудиция, широта научного поиска, уроки настоящего отношения к науке навсегда останутся в памяти учеников и коллег.

Сотрудники Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, сотрудники кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ им. Ломоносова, ученики