

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 85, выпуск 5, 2020

Молекулярные мишени в химиотерапии коронавирусной инфекции (обзор) <i>О.П. Жирнов</i>	611
Мембранные контакты в составе плазмодесм: структурные компоненты и их функции (обзор) <i>А.В. Панкратенко, А.К. Атабекова, С.Ю. Морозов, А.Г. Соловьев</i>	620
Сборка комплекса 30S субъединицы рибосомы и фактора RbfA <i>S. aureus in vitro</i> для структурных исследований <i>А.Г. Бикмуллин, Л.И. Нуруллина, Н.С. Гараева, Э.А. Клочкова, Д.С. Блохин, А.А. Голубев, Ш.З. Валидов, И.Ш. Хусаинов, К.С. Усачев, М.М. Юсупов</i>	637
Иммуногенность и протективная активность инактивированных и живых вакцин против гомологичного и гетеросубтипического заражения вирусами гриппа <i>Е.Ю. Боравлева, А.В. Луницын, А.П. Каплун, Н.В. Быкова, И.В. Красильников, А.С. Гамбарян</i>	647
Расщепление по различным механизмам капсульных полисахаридов <i>Acinetobacter baumannii</i> фаговыми деполимеразами <i>Ю.А. Книрель, М.М. Шнейдер, А.В. Попова, А.А. Касимова, С.Н. Сенченкова, А.С. Шашков, А.О. Чижов</i>	663
Влияние положения последовательности HIS <sub>6</sub> на экспрессию и свойства фенилацетонмонооксигеназы из <i>Thermobifida fusca</i> <i>П.Д. Паршин, А.А. Пометун, У.А. Мартысюк, С.Ю. Клейменов, Д.Л. Атрошенко, Е.В. Пометун, С.С. Савин, В.И. Тишков</i>	672
Активация лимфоцитов в формировании иммунной толерантности у женщин с привычным выкидышем <i>Л.В. Кречетова, Л.В. Ванько, В.В. Вторушина, М.А. Николаева, Е.В. Инвиева, Н.К. Тетруашвили</i>	682
Роль аминокислотных остатков Arg243 и His239 в процессе узнавания поврежденного нуклеотида урацил-ДНК-гликозилазой человека SMUG1 <i>Д.А. Яковлев, И.В. Алексеева, Н.А. Кузнецов, О.С. Федорова</i>	695
Суперпродукция α-синуклеина в клетках нейробластомы приводит к накоплению тиофлавин S-позитивных агрегатов и уменьшению интенсивности гликолиза <i>А.К. Мельникова, Д.В. Поздышев, К.В. Барина, С.С. Кудрявцева, В.И. Муронец</i>	706
Оптимизация метода идентификации пола человека пептидомным анализом эмали зубов различной биологической генерации, археологического возраста и тафономической сохранности <i>Р.Х. Зиганин, Н.Я. Березина, П.Л. Александров, В.В. Рябинин, А.П. Бужилова</i>	718
Меланин лишайников <i>Cetraria islandica</i> и <i>Pseudevernia furfuracea</i> : особенности строения и физико-химические свойства <i>А.Е. Рассабина, О.П. Гурьянов, Р.П. Бекетт, Ф.В. Минибаева</i>	729
Два гликозил-1-фосфатных полимера и тейхулозоновая кислота из клеточной стенки <i>Glutamicibacter protophormiae</i> ВКМ Ас-2104 <sup>T</sup> <i>А.С. Шашков, Е.М. Тульская, Л.В. Дорофеева, Л.И. Евтушенко, Н.В. Потехина</i>	736

## ДИСКУССИИ

Трансплантация митохондрий: критический анализ <i>Б.В. Черняк</i>	743
Правила для авторов	749

# CONTENTS

Vol. 85, Publ. 5, 2020

Molecular Targets in the Chemotherapy of Coronavirus Infection (Review) <i>O. P. Zhirnov</i>	611
Membrane Contacts in Plasmodesmata: Structural Components and Their Functions (Review) <i>A. V. Pankratenko, A. K. Atabekova, S. Y. Morozov, and A. G. Solovyev</i>	620
<i>In vitro</i> Reconstitution of the <i>S. aureus</i> 30S Ribosomal Subunit and RbfA Factor Complex for Structural Studies <i>A. G. Bikmullin, L. I. Nurullina, N. S. Garaeva, E. A. Klochkova, D. S. Blokhin, A. A. Golubev, Sh. Z. Validov, I. Sh. Khusainov, K. S. Usachev, and M. M. Yusupov</i>	637
The Immune Response and Protective Efficacy of Inactivated and Live Influenza Vaccine Against Homologous and Heterosubtypic Challenge <i>E. Y. Boravleva, A. V. Lunitsin, A. P. Kaplun, N. V. Bykova, I. V. Krasilnikov, and A. S. Gambaryan</i>	647
Cleavage by Various Mechanisms of <i>Acinetobacter baumannii</i> Capsular Polysaccharides by Phage-Encoded Depolymerases <i>Y. A. Knirel, M. M. Shneider, A. V. Popova, A. A. Kasimova, S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, and A. O. Chizhov</i>	663
Influence of Position of HIS <sub>6</sub> -Sequence on Expression and Properties of Phenylacetone Monooxygenase from <i>Thermobifida fusca</i> <i>P. D. Parshin, A. A. Pometun, U. A. Martysuk, S. YU. Kleymentov, D. L. Atroshenko, E. V. Pometun, S. S. Savin, and V. I. Tishkov</i>	672
Lymphocyte Activation in Immune Tolerance Development in Women with Recurrent Pregnancy Loss <i>L. V. Krechetova, L. V. Vanko, V. V. Vtorushina, M. A. Nikolaeva, E. V. Inviyaeva, and N. K. Tetrushvili</i>	682
The Role of Amino Acid Residues Arg243 and His239 in the Process of Damage Recognition by Human Uracil-DNA-Glycosylase SMUG1 <i>D. A. Iakovlev, I. V. Alekseeva, N. A. Kuznetsov, and O. S. Fedorova</i>	695
Alpha-Synuclein Overexpression in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells Leads to Accumulation of Thioflavin S-Positive Aggregates and Impairment of Glycolysis <i>A. K. Melnikova, D. V. Pozdyshev, K. V. Barinova, S. S. Kudryavtseva, and V. I. Muronetz</i>	706
Optimization of the Method of Human Sex Identification by Peptidomic Analysis of Teeth Enamel of Different Biological Generation, Archaeological Age, and Taphonomic Preservation of Teeth <i>R. H. Ziganshin, N. Ya. Berezina, P. L. Alexandrov, V. V. Ryabinin, and A. P. Buzhilova</i>	718
Melanin of Lichens <i>Cetraria islandica</i> and <i>Pseudevernia furfuracea</i> : Structural Features and Physico-Chemical Properties <i>A. E. Rassabina, O. P. Gurjanov, R. P. Beckett, and F. V. Minibayeva</i>	729
Two Glycosyl 1-Phosphate Polymers and Teichulosonic Acid from <i>Glutamicibacter protophormiae</i> VKM Ac-2104 <sup>T</sup> Cell Wall <i>A. S. Shashkov, E. M. Tul'skaya, L. V. Dorofeeva, L. I. Evtushenko, and N. V. Potekhina</i>	736

## DISCUSSIONS

Mitochondrial Transplantation: A Critical Analysis <i>B. V. Chernyak</i>	743
Instructions to Authors	749

УДК 615.281.8

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ В ХИМИОТЕРАПИИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Обзор

© 2020 О.П. Жирнов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ООО «Русско-немецкая академия медицинских и биотехнологических наук», Инновационный центр Сколково, 121665 Москва, Сколково, Россия; электронная почта: zhirnov@inbox.ru

<sup>2</sup> Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, 123098 Москва, Россия

Поступила в редакцию 18.03.2020

После доработки 22.03.2020

Принята к публикации 22.03.2020

В патогенезе инфекционного процесса, вызванного в респираторном тракте коронавирусами SARS, MERS, Covid-2019 и др., можно выделить две стадии: раннюю (этиотропную) и позднюю (патогенетическую). На первой стадии, когда доминируют размножение и накопление вируса, показано применение химиотерапевтических средств, блокирующих размножение вируса. В статье рассмотрены 6 главных химиотерапевтических классов, направленных на различные вирусные мишени: ингибиторы вирусной РНК-полимеразы, ингибиторы вирусной протеазы Mpro, ингибиторы протеолитической активации вирусного белка S, осуществляющего вход вируса в клетку-мишень, ингибиторы вирусной депротеинизации в клеточных эндосомах, препараты экзогенного интерферона, препараты природных и рекомбинантных вируснейтрализующих антител. На второй стадии, когда размножение вируса падает и доминируют угрожающие патологические процессы избыточного воспаления, острого респираторного дистресс синдрома, отека легочной ткани, гипоксии и угрожающего сепсиса, на первый план выходят применение патогенетических средств, таких как экстракорпоральная оксигенация крови, дезинтоксикационные, противовоспалительные и антибактериальные терапевтические средства и мероприятия.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** коронавирусы, Covid-2019, химиотерапия, патогенез, лекарства.

**DOI:** 10.31857/S0320972520050012

### ВВЕДЕНИЕ

Семейство коронавирусов (Coronaviridae) образовано многочисленными вирусами человека и многих животных, включая вирусы сельскохозяйственных и диких животных (кошек, собак, летучих мышей, коров, верблюдов, свиней, птиц и др.). Семейство формируют два подсемейства (Letovirinae и Orthocoronavirinae), которые включают вирусы 5 родов и ~40 видов вирусов [1]. Подсемейство Orthocoronavirinae, в которое входят коронавирусы человека, состоит из четырех родов: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus*. Коронавирусы поражают различные органы и ткани инфицированного организма и являются возбудителями широкого круга заболеваний в том числе и тяжелого поражения респираторного тракта человека, так называемой атипичной пневмо-

нии. Как правило, вирусы данного семейства вызывают острую инфекцию с признаками воспаления, имеющего характерные свойства цитокинового шторма [2, 3].

Коронавирусы имеют липидную оболочку (оболочечные вирусы) и содержат геномную РНК позитивной полярности, которая транслируется рибосомами и направляет синтез вирусных белков и субгеномных РНК с последующей репликацией вирусного генома и сборкой вирусных частиц [1, 4]. Геномная РНК коронавирусов состоит у разных вирусов из  $(25-30) \times 10^3$  нуклеотидов и кодирует 22–29 вирусных генов и соответствующих белков, из которых 4 главных белка (N, S, M, E) формируют вирусные частицы (таблица). В состав вирионов могут входить и дополнительные минорные вирусные белки, выполняющие роль ионных каналов (виropорин) [5].

В настоящее время возник повышенный интерес к семейству коронавирусов, что обусловлено появлением опасной формы пневмонии у людей, вызванной штаммом бетакоронавируса

Принятые сокращения: MERS – ближневосточный респираторный синдром (Middle East Respiratory Syndrome); SARS – тяжелый острый респираторный синдром (Severe Acute Respiratory Syndrome).

## Гены и белки бетакоронавирусов и их ингибиторы

Название гена <sup>1)</sup>	Название белка (домена) и его размер (а.о.)	Присутствие в вирионе	Функция белка	Ингибитор вирусного белка <sup>2)</sup>	Ссылки
<i>Iab</i> <sup>3)</sup>	(7096)	–	–	–	–
<i>nsp1</i>	(180)	–	деградация клеточных мРНК, ингибирование ИНФ	–	–
<i>nsp2</i>	трансмембранный белок (638)	–	активация NFκB, усиление воспаления	–	–
<i>nsp3</i>	трансмембранный белок PLpro <sup>4)</sup> (1945)	–	цистеиновая протеаза, выключение p53 и индукции ИНФ	ритонавир/ лопинавир	[6–9]
<i>nsp4</i>	(500)	–	формирование DMV	–	–
<i>nsp5</i>	Mpro (306)	–	цистеиновая протеаза, ингибирование ИНФ	ритонавир/ лопинавир	[6–9]
<i>nsp6</i>	(290)	–	ограничение аутофагии, формирование DMV	–	–
<i>nsp7</i>	(83)	–	кофактор nsp8, nsp12	–	–
<i>nsp8</i>	(198)	–	кофактор nsp7, nsp12	–	–
<i>nsp9</i>	(113)	–	димеризация и связывание РНК	–	–
<i>nsp10</i>	(139)	–	платформа для nsp12, nsp14	–	–
<i>nsp11</i>	(13)	–	(?) <sup>5)</sup>	–	–
<i>nsp12</i>	Pol (932)	–	РНК-зависимая РНК полимераза	рибавирин фавипиравир ремдесивир	[10–12] [13] [6, 14, 15]
<i>nsp13</i>	(601)	–	РНК хеликаза, 5'-фосфатаза	–	–
<i>nsp14</i>	(527)	–	3'→5' экзо-рибонуклеаза	–	–
<i>nsp15</i>	(346)	–	эндо-рибонуклеаза, сенсор дцРНК	–	–
<i>nsp16</i>	(298)	–	2-O-MТаза, MDA5 сенсор, ингибитор пути ИНФ	–	–
<i>S</i>	белок оболочки («spike protein») (1278)	+	вход вируса в клетку-мишень	ингибиторы протеаз пептиды-ингибиторы слияния хлорохин антитела	[16–22] <sup>6)</sup> [23] <sup>7)</sup> [24–26] [27–32]
<i>3a</i>	(275)	(?) <sup>5)</sup>	усиление цитокинового ответа и воспаления через NLRP3	–	–
<i>E</i>	белок оболочки (виropорин) (75)	+	ионный канал, регулирует сборку вирионов	хлорохин антитела	[24–26] [27–32]
<i>M</i>	белок вирусного матрикса (222)	+	объединяет оболочку и нуклеокапсид	–	–

Окончание таблицы

Название гена <sup>1)</sup>	Название белка (домена) и его размер (а.о.)	Присутствие в вирионе	Функция белка	Ингибитор вирусного белка <sup>2)</sup>	Ссылки
<i>6</i>	(61)	(?)	–	–	–
<i>7a/b</i>	трансмембранный белок (121/43)	+	повышает продукцию вируса	–	–
<i>8a</i>	трансмембранный белок (121)	(?)	убиквитинирует IRF3, снижает выработку ИНФ	–	–
<i>9b</i>	(38)	(?)	–	–	–
<i>N</i>	белок нуклеокапсида (419)	+	вместе с РНК формирует внутренний нуклеокапсид	–	–

Примечание. <sup>1)</sup> Гены и их название (или их доменов) вируса Covid-2019 указаны по порядку от 5'-конца геномной РНК и их название [5]. При определении размера белков (указано количество аминокислотных остатков) использованы данные GenBank (ac.n. YP-009725301.1).

<sup>2)</sup> Приведены классы ингибиторов с идентифицированным механизмом действия.

<sup>3)</sup> Функции белков *nsp1-nsp16* (протеолитических продуктов полипротеина гена *lab*) приведены в публикациях [5, 33, 34].

<sup>4)</sup> У вируса Covid-2019 в белке *nsp3* отсутствует один из двух папаин-подобных протеазных доменов, но сохраняются убиквитиновые домены [35].

<sup>5)</sup> Знаком (?) отмечены продукты генов с неустановленной функцией (данные отсутствуют).

<sup>6)</sup> Протеазные ингибиторы (камостат, апротинин, лотевирин и др.) опосредованно блокируют активацию функции внедрения в клетку-мишень белка S через ингибирование его протеолитического расщепления на активные субъединицы S→S1/S2.

<sup>7)</sup> Олигопептидные ингибиторы фузионной активности белка S при внедрении вируса в клетку-мишень [23].

Covid-2019 [4]. Этот штамм оказался близкородственным штаммам, изолированным от летучих мышей, а также вирусам тяжелого острого респираторного синдрома (SARS, Severe Acute Respiratory Syndrome) и ближневосточного респираторного синдрома (MERS, Middle East Respiratory Syndrome), которые вызвали вспышку тяжелой пневмонии у людей, так называемой атипичной пневмонии в 2003 и 2012 гг. соответственно. Эти вспышки не получили широкого пандемического распространения, но имели угрожающий характер, т.к. вызвали высокую смертность среди заболевших на уровне 9,6–35,5% [2, 36]. Возникшая угроза развития коронарусной пандемии диктует необходимость разработки высокоэффективных химиопрепаратов против коронавирусов, отработки принципов применения имеющихся противовирусных химиопрепаратов и разработки патогенетических подходов к лечению болезни.

На текущий момент можно выделить 6 основных химиотерапевтических классов веществ, воздействующих на различные вирусные мишени и способных останавливать размножение коронавируса и тормозить развитие заболевания. Эти классы веществ разработаны на основе современных знаний о репликации коронавирусов и патогенетических механизмов коронарусной инфекции. К данным классам

можно отнести: (1) ингибиторы вирусной полимеразы; (2) ингибиторы вирусной протеазы Mpro, участвующей в формировании активной полимеразы вируса; (3) ингибиторы клеточных протеаз, участвующих в активации вирусного белка S, регулирующего вход вируса в клетку-мишень; (4) ингибиторы депротенизации вируса в клеточных эндосомах; (5) препараты, полученные на основе рекомбинантных интерферонов  $\alpha 2$  и  $\beta 1$ ; (6) препараты, созданные на основе противовирусных антител.

## ИНГИБИТОРЫ ВИРУСНОЙ ПОЛИМЕРАЗЫ

Классической мишенью химиотерапевтического воздействия на вирусы служит его полимераз. Блокирование этого фермента ингибирует репликацию вирусного генома и останавливает размножение вируса. На сегодня имеются полиспецифические ингибиторы РНК полимераз, активные в отношении многих вирусов, поскольку структурные и функциональные свойства РНК-полимераз у различных вирусов имеют выраженное сходство [37]. Среди таких ингибиторов данного класса можно выделить *рибавирин* (фуранозил карбоксамид), обладающий высокой активностью в отношении многих вирусов [10] (включая коронавирусы) при кон-

центрации 10–25 нМ ( $IC_{50}$ ) с высоким индексом селективности на уровне  $>100$  [10–12]. Поскольку основной очаг инфекции, вызванный коронавирусами SARS, MERS и Covid-2019, локализован в респираторном тракте, оптимальной лечебной формой рибавирина при данных инфекциях служат аэрозольные ингаляции, которые позволяют создать эффективные противовирусные и нетоксичные концентрации лекарства в эпителии респираторного тракта при ингаляционном введении аэрозоля рибавирина. Этот вывод базируется на данных о низкой легочной биодоступности рибавирина (1%) при пероральном способе введения и, наоборот, высокой легочной биодоступности ( $>70\%$ ) и активации рибавирина посредством фосфорилирования в респираторном эпителии при его ингаляционном введении в форме аэрозоля [12]. Важно отметить, что прямое аэрозольное воздействие на респираторный эпителий будет наиболее активным и эффективным на ранних сроках после инфицирования организма, когда размножение вируса находится в стадии роста, а патологические процессы воспаления и отека не достигли угрожающего уровня.

Вторым кандидатным препаратом против коронавируса может служить препарат нового поколения *фавипиравир* и его рибозилированные дериваты [13]. Это соединение обладает высокой противовирусной активностью в отношении многих РНК-содержащих вирусов и обладает высоким уровнем селективности [13]. Третьим кандидатным препаратом можно рассматривать ингибитор вирусных полимераз широкого противовирусного действия, синтезированный на основе фосфорилированной формы 1-циано замещенного аденозина (*remdisivir*), имеющий высокий противовирусный потенциал ( $IC_{50}$ ) на уровне 50–70 нМ для разных вирусов, включая коронавирусы [14, 15]. Препарат *ремдисивир* находится на завершающей стадии клинических испытаний [6].

### ИНГИБИТОРЫ КОРОНАВИРУСНОЙ ПРОТЕАЗЫ Mpro

Первым этапом репликации коронавируса после внедрения в клетку-мишень является трансляция вирусной РНК с образованием полипротеина 1ab с ММ  $\sim 750$  кДа, который претерпевает аутопротеолитическое расщепление у разных вирусов на 14–16 фрагментов (nsp1–nsp16), которые выполняют функцию активной вирусной полимеразы и регулируют репликацию вирусного генома и синтез вирусных белков в инфицированных клетках [1]. Оказа-

лось, что разрезание полимеразного полипротеина 1ab (pp1ab) осуществляется доменом 5 (nsp 5) самого полипротеина (так называемым, протеазным доменом Mpro), который по своей специфичности протеолитических сайтов был близок к протеазе пикоронавирусов и вируса ВИЧ [38] и чувствителен к бинарному протеазному ингибитору лопинавир/ритонавир (препарат *калетра*) [6–9]. У ряда вирусов два начальных разрыва в полипротеине 1ab осуществляет белок nsp3 (PLpro), также имеющий папаин-подобный домен цистеиновой протеазы [35]. Препарат лопинавир/ритонавир, имитирующий протеолитические сайты-мишени в вирусных белках, оказывал заметный лечебный эффект при инфекциях, вызванных SARS и MERS, проявляя  $IC_{50}$  на уровне 5–20 нМ [6, 9]. Структурное сходство протеазного домена nsp5 у вирусов Covid-2019, SARS и MERS позволяет уверенно рекомендовать этот препарат для лечения пневмонии Covid-2019 [7, 9]. Особенно эффективно данный препарат будет работать в фазе активного размножения вируса на первых этапах инфекции.

### ИНГИБИТОРЫ КЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕАЗ

Внедрение вируса в клетку-мишень осуществляет вирусный гликопротеид S (ММ 150 кДа) [1]. Для активации этой функции белок S претерпевает специфическое разрезание на две субъединицы S1 и S2 в зоне специфического протеолитического сайта (641–687 а.о.) [38, 39]. Клеточная трансмембранная протеаза TMPRSS2 участвует в указанной протеолитической активации белка S [15, 38], а ингибиторы этой протеазы способны останавливать заражение клеток и распространение вируса в очаге инфекции [16]. Для практической реализации данного химиотерапевтического подхода можно рекомендовать разрешенные для клинического применения препараты протеазных ингибиторов: камостат [16] и апротинин [17–19].

Более того, указанные антипротеазные препараты обладают выраженной противовоспалительной активностью, так как способны ингибировать ряд провоспалительных цитокинов и их биохимических путей [19, 40]. Это свойство ингибиторов протеаз будет обеспечивать патогенетическое действие по снижению воспаления и отека легких, что будет оказывать благотворное действие во второй фазе инфекционного процесса, когда ведущее влияние на тяжесть заболевания оказывают патогенетические механизмы, связанные с чрезмерной активацией протеаз и сопутствующим повышением уровня активных провоспалительных цитокинов [41, 42].

Недавние сообщения из Китая позволяют предположить, что наряду с протеазой TMPRSS2 [16, 38] в протеолитической активации белка S и вируса Covid-2019 может участвовать клеточная протеаза фуринового типа и протеаза эндосом катепсин L [16, 39, 42]. Если предположение о роли фурина в активации вируса Covid-2019 подтвердится, для подавления этого класса протеаз с противовирусной целью можно рекомендовать природные ингибиторы растительного происхождения [20] и синтетические олигопептидные ингибиторы [21, 22].

### ИНГИБИТОР ВИРУСНОГО ВХОДА В КЛЕТКУ-МИШЕНЬ

В медицинской практике лечения малярии широко применяется препарат *хлорохин* (Chloroquine). Этот препарат имеет выраженную активность против коронавирусов в культуре клеток и на животных моделях [24]. Механизм действия данного агента против многих вирусов, включая и коронавирусы, обусловлен повышением кислого pH в зоне клеточных эндосом, что препятствует конформационному pH-зависимому переходу вирусных белков слияния (белка S у коронавирусов) в активное состояние, и как результат, тормозит стадию депротенинизации (так называемого «раздевания») вируса в клеточных эндосомах и предотвращает последующее инфицирование вирусом клетки-мишени; также препарат может изменять гликозилирование клеточных рецепторов, в том числе ACE2, который используется вирусами Covid-2019 и SARS для внедрения в клетку-мишень [25]. На этом основании препарат рекомендован для лечения инфекции, вызванной вирусом Covid-2019, и уже показал положительный лечебный эффект у больных коронавирусной инфекцией в Китае [26].

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ АНТИТЕЛ

Данный подход к терапии коронавирусной инфекции основан на использовании антител, которые способны нейтрализовать инфекционные свойства коронавируса. Также введение антител можно использовать и для ранней профилактики, так называемый метод пассивной иммунизации. Существуют две принципиальные возможности реализации метода терапии антителами [28–30]. Первая заключается в создании и получении на основе современной генной инженерии и биотехнологии противовирусных ан-

тител (или их активных противовирусных доменов) направленного вируснейтрализующего действия. Пока такие препараты антител против коронавирусов, включая Covid-2019, не созданы [27]. Вторая возможность, более традиционная и простая, заключается в использовании специфического противовирусного иммунного глобулина, который, как правило, получают от людей-реконвалесцентов после перенесенной коронавирусной инфекции, в частности Covid-2019, либо от животных, вакцинированных вирусом Covid-2019 или его компонентами [31, 32]. Имеются первые наблюдения успешного применения иммунного глобулина от людей-реконвалесцентов при инфекции MERS и Covid-2019 для лечения больных с аналогичной инфекцией в Китае во время последней вспышки в 2020 году [43].

Препараты противовирусных антител следует применять с некоторой осмотрительностью, так как имеются сообщения о возможности усиления инфекционности коронавирусов для клеток иммунной системы некоторыми вариантами антител, искусственно полученными к поверхностному белку S [44]. Однако такие типы антител в сыворотках реконвалесцентов пока обнаружить не удавалось [31]. Для успешного лечения необходимы препараты сыворотки крови реконвалесцентов с высоким содержанием антител, с титрами противовирусных антител в реакции РТГА 1/80 и выше [32].

### ПРЕПАРАТЫ ИНТЕРФЕРОНА

Для лечения близкородственных заболеваний, вызванных вирусами SARS, MERS и Covid-2019, применяли препараты интерферона человека субтипов  $\alpha 2$  и  $\beta 1$  [45, 46]. Незначительное лечебное действие оказывал интерферон  $\beta 1$ , тогда как препарат интерферона  $\alpha 2$  не проявлял заметной лечебной активности, но наиболее выраженный лечебный эффект наблюдали при применении интерферона  $\beta 1$  в комбинации с рибавирином [6, 11, 46]. При выборе лечебной тактики следует иметь в виду, что препараты интерферона могут быть наиболее эффективными лишь на самых ранних сроках заболевания, когда реакция организма-хозяина еще не достигла заметного уровня или своего апогея [2, 47, 48]. На более поздних этапах болезни применение экзогенного интерферона вряд ли целесообразно в силу высокого уровня собственного эндогенного интерферона, синтезированного в ответ на острую вирусную инфекцию коронавирусом. Более того, введение экзогенного интерферона на поздних этапах инфекционного процесса,

дополнительно повышая уже сформировавшийся высокий эндогенный уровень интерферонов, может усиливать цитокиновый шторм и воспаление в очаге инфекции и усугублять течение болезни [3, 48].

### КОМБИНИРОВАННАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ

Совместное применение нескольких лекарств (химиопрепаратов), воздействующих на различные этапы размножения вируса или патогенеза болезни, так называемая комбинированная химиотерапия, использовалась для лечения коронавирусной инфекции. Положительный лечебный эффект наблюдали при применении рибавирина, интерферона  $\beta 1$ , лопинавира/ритонавира [6, 11, 46]. Комбинированная химиотерапия позволяет (1) повысить эффективность лечения, (2) снизить лечебные дозы препаратов, (3) предотвратить возникновение опасных вирусных мутантов с повышенной вирулентностью. Известно, что при использовании комбинированной химиотерапии риск появления вирусных мутантов в пораженном организме сводится к минимуму [49].

### СООТНОШЕНИЕ ЭТИОТРОПНЫХ И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ХИМИОТЕРАПИИ ВИРУСНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

В динамике развития острого вирусного заболевания можно выделить две главные стадии. Ранняя (этиотропная) стадия, на которой доминирует размножение вируса, так называемая логарифмическая фаза размножения и накопления вируса (7–10 день от начала инфицирования макроорганизма вирусом). На этом этапе в ответ на вирус и инфицированные клетки начинает формироваться защитная реакция организма-хозяина специфического типа (синтез иммунных глобулинов, специфических клонов лейкоцитов, интерферона) и общего воспалительного типа на основе синтеза и активации хемокинов и цитокинов в очаге инфекции. На второй, более поздней стадии заболевания, размножение вируса падает и развивается вторая патогенетическая фаза болезни, когда формируются механизмы, критически влияющие на исход болезни и несущие угрозу осложнений. К таковым следует отнести развитие чрезмерного воспаления, формирование острого респираторного дистресс-синдрома, отека легких и гипоксии, присоединение патогенных микробов и возникновение сепсиса [2, 3, 50].

В соответствии с двухфазным развитием патогенеза целесообразно выстраивать лечебную тактику заболевания. На этиотропной стадии в лечебном арсенале необходимо максимальное применение специфических этиотропных химиопрепаратов. В случае коронавирусной инфекции к таковым следует отнести лопинавир/ритонавир, ингаляции аэрозольного рибавирина, инъекции специфических противовирусных антител, ингибиторы клеточных протеаз, препараты интерферона, в частности  $\beta 1$  (см. соответствующие разделы выше). На второй патогенетической стадии заболевания лечебная стратегия направлена на устранение или купирование патологических механизмов, угрожающих жизни пациента. Лечебная тактика строится на основе учета состояния и тяжести патологических процессов и, главным образом, направлена на устранение интоксикации, снижение отека легких, оксигенацию крови для компенсации легочной недостаточности, главным образом, методом экстракорпоральной оксигенации крови (ЭКМО) во избежание разрыва отечного легкого в случае применения принудительной ингаляционной оксигенотерапии. На этой стадии следует применять также противовоспалительные средства (но с осторожностью гормональные средства) для восстановления дыхательной функции легких, и особое значение имеет антибактериальная терапия для предотвращения возникновения и развития пневмонии и сопутствующего сепсиса [51, 52].

Во второй фазе болезни не имеет большого смысла применение противовирусной химиотерапии по двум причинам. Во-первых, к этому периоду болезни в организме образуются специфические противовирусные антитела и лейкоциты, ингибирующие размножение вируса и устраняющие инфицирование новых клеток [3, 28, 48]. Во-вторых, исключение химиопрепаратов будет способствовать снижению их побочного токсического воздействия на формирование полноценной иммунной реакции организма по образованию антител, лейкоцитов и интерферонов. Однако следует иметь в виду возможное для коронавирусов обострение патогенеза заболевания в результате эволюции и смены заражающего вируса в одном организме. Такой феномен описан для бетакоронавирусов, когда у одного больного в ходе болезни может возникнуть более вирулентный вирусный штамм, вызывающий существенное обострение течения болезни и угрозу смерти [53–55]. Поэтому в случае развития неполноценной иммунной реакции у пациента и наличия признаков остаточной вирусной инфекции следует продолжать применение противовирусных химиопрепара-

тов для снижения риска возникновения в организме вирусных мутантов с повышенной вирулентностью. Представляется важным, что для эффективного предотвращения возникновения высоковирулентных вирусных мутантов целесообразно уже на ранних этапах инфекции назначение комбинации химиопрепаратов, направленных на различные мишени в репродукции вируса.

Бетакоронавирусы, включая вирус Covid-2019, вызывают поражение респираторного тракта, которое нередко заканчивается угрожающим отеком легкого, тяжелой гипоксией и развитием сепсиса. В патогенезе заболевания можно выделить две стадии: этиотропную и патогенетическую. На первой стадии доминирует размножение и накопление вируса и появление начальных патологических нарушений в респираторном тракте. На второй стадии размножение вируса падает, но, как следствие действия вируса, развиваются патологические процессы, обусловленные, главным образом, чрезмерным воспалением и отеком легких. В первой фазе бо-

лезни представляется целесообразным применение химиотерапевтических средств и их комбинаций (аэрозольный рибавирин, лопинавир/ритонавир, ингибиторы протеаз, препараты интерферона, противовирусные антитела), направленных на подавление различных мишеней в размножении вируса. На второй стадии болезни представляется целесообразным и важным применение патогенетических средств для купирования угрожающих жизни процессов избыточного воспаления, интоксикации, гипоксии и сепсиса.

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю благодарность В.О. Жирновой за помощь в подготовке статьи, а также Ф.И. Чернышовой за критическое прочтение статьи.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fehr, R. A., and Perlman, S. (2015) Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis, *Methods Mol. Biol.*, **1282**, 1-23, doi: 10.1007/978-1-4939-2438-7\_1.
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., Gao, H., Guo, L., Xie, J., Wang, G., Jiang, R., Gao, Z., Jin, Q., Wang, J., and Cao, B. (2020) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China, *Lancet*, **395**, 497-506, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- Zheng, J., and Perlman, S. (2018) Immune responses in influenza A virus and human coronavirus infections: an ongoing battle between the virus and host, *Curr. Opin. Virol.*, **28**, 43-52, doi: 10.1016/j.coviro.2017.11.002.
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W. J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E. C., Gao, G. F., Wu, G., Chen, W., Shi, W., and Tan, W. (2020) Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding, *Lancet*, **395**, 565-574, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
- Chen, Y., Liu, Q., and Guo, D. (2020) Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis, *J. Med. Virol.*, **92**, 418-423, doi: 10.1002/jmv.25681.
- Sheahan, T. P., Sims, A. C., Leist, S. R., Schäfer, A., Won, J., Brown, A. J., Montgomery, S. A., Hogg, A., Babusis, D., Clarke, M. O., Spahn, J. E., Bauer, L., Sellers, S., Porter, D., Feng, J. Y., Cihlar, T., Jordan, R., Denison, M. R., and Baric, R. S. (2020) Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV, *Nat Commun.*, **11**, 222, doi: 10.1038/s41467-019-13940-6.
- Xue, X., Yu, H., Yang, H., Xue, F., Wu, Z., Shen, W., Li, J., Zhou, Z., Ding, Y., Zhao, Q., Zhang, X. C., Liao, M., Bartlam, M., and Rao, Z. (2008) Structures of two coronavirus main proteases: implications for substrate binding and antiviral drug design, *J. Virol.*, **82**, 2515-2527.
- Al-Tawfiq, J. A., and Memish, Z. A. (2017) Update on therapeutic options for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV), *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, **15**, 269-275, doi: 10.1080/14787210.2017.1271712.
- Liu, X., and Wang, X. J. (2020) Potential inhibitors for 2019-nCoV coronavirus M protease from clinically approved medicines, *BioRxiv*, doi: 10.1101/2020.01.29.924100.
- Sidwell, R. W., Robins, R. K., and Hillyard, I. W. (1979) Ribavirin: an antiviral agent, *Pharmacol. Ther.*, **6**, 123-146.
- Morgenstern, B., Michaelis, M., Baer, P. C., Doerr, H. W., and Cinatl, J. Jr. (2005) Ribavirin and interferon-beta synergistically inhibit SARS-associated coronavirus replication in animal and human cell lines, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **326**, 905-908.
- Gilbert, B. E., and Knight, V. (1986) Biochemistry and clinical applications of ribavirin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **30**, 201-205.
- Delang, L., Abdelnabi, R., and Neyts, J. (2018) Favipiravir as a potential countermeasure against neglected and emerging RNA viruses, *Antiviral. Res.*, **153**, 85-94, doi: 10.1016/j.antiviral.2018.03.003.
- Sheahan, T. P., Sims, A. C., Graham, R. L., Menachery, V. D., Gralinski, L. E., Case, J. B., Leist, S. R., Pyrc, K., Feng, J. Y., Trantcheva, I., Bannister, R., Park, Y., Babusis, D., Clarke, M. O., Mackman, R. L., Spahn, J. E., Palmiotti, C. A., Siegel, D., Ray, A. S., Cihlar, T., Jordan, R., Denison, M. R., and Baric, R. S. (2017) Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses, *Sci. Transl. Med.*, **9**, 396, doi: 10.1126/scitranslmed.aal3653.
- Lo, M. K., Jordan, R., Arvey, A., Sudhamsu, J., Shrivastava-Ranjan, P., Hotard, A. L., Flint, M.,

- McMullan, L. K., Siegel, D., Clarke, M. O., Mackman, R. L., Hui, H. C., Perron, M., Ray, A. S., Cihlar, T., Nichol, S. T., and Spiropoulou, C. F. (2017) GS-5734 and its parent nucleoside analog inhibit Filo-, Pnuemo-, and Paramyxoviruses, *Sci. Rep.*, **7**, 43395, doi: 10.1038/srep43395.
16. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., and Pöhlmann, S. (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor, *Cell*, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
17. Жирнов О. П. (2015) Комбинированный аэрозольный состав на основе ингибиторов протеаз и его получение, Патент РФ № 2711080.
18. Жирнов О. П. (2012) Фармацевтический аэрозольный состав ингибитора протеаз, Патент ЕАПО № 201201362.
19. Zhirnov, O. P., Klenk, H. D., and Wright, P. F. (2011) Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza, *Antiviral. Res.*, **92**, 27-36, doi: 10.1016/j.antiviral.2011.07.014.
20. Peng, M., Watanabe, S., Chan, K. W. K., He, Q., Zhao, Y., Zhang, Z., Lai, X., Luo, D., Vasudevan, S. G., and Li, G. (2017) Luteolin restricts dengue virus replication through inhibition of the proprotein convertase furin, *Antiviral. Res.*, **143**, 176-185, doi: 10.1016/j.antiviral.2017.03.026.
21. Shiryayev, S. A., Remacle, A. G., Ratnikov, B. I., Nelson, N. A., Savinov, A. Y., Wei, G., Bottini, M., Rega, M. F., Parent, A., Desjardins, R., Fugere, M., Day, R., Sabet, M., Pellecchia, M., Liddington, R. C., Smith, J. W., Mustelin, T., Guiney, D. G., Lebl, M., and Strongin, A. Y. (2007) Targeting host cell furin proprotein convertases as a therapeutic strategy against bacterial toxins and viral pathogens, *J. Biol. Chem.*, **282**, 20847-20853.
22. Braun, E., and Sauter, D. (2019) Furin-mediated protein processing in infectious diseases and cancer, *Clin. Transl. Immunol.*, **8**, e1073, doi: 10.1002/cti2.1073.
23. Xia, S., Yan, L., Xu, W., Agrawal, A. S., Algaissi, A., Tseng, C. K., Wang, Q., Du, L., Tan, W., Wilson, I. A., Jiang, S., Yang, B., and Lu, L. (2019) A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike, *Sci. Adv.*, **5**, eaav4580, doi: 10.1126/sciadv.aav4580.
24. Rolain, J. M., Colson, P., and Raoult, D. (2007) Recycling of chloroquine and its hydroxyl analogue to face bacterial, fungal and viral infections in the 21st century, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **30**, 297-308.
25. Colson, P., Rolain, J. M., and Raoult, D. (2020) Chloroquine for the 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **105923**, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105923.
26. Gao, J., Tian, Z., and Yang, X. (2020) Breakthrough: chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies, *Biosci. Trends*, **14**, 72-73, doi: 10.5582/bst.2020.01047.
27. Shanmugaraj, B., Siriwattananon, K., Wangkanont, K., and Phoolcharoen, W. (2020) Perspectives on monoclonal antibody therapy as potential therapeutic intervention for Coronavirus disease-19 (COVID-19), *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, **38**, 10-18, doi: 10.12932/AP-200220-0773.
28. Mair-Jenkins, J., Saavedra-Campos, M., Baillie, J. K., Cleary, P., Khaw, F. M., Lim, W. S., Makki, S., Rooney, K. D., Nguyen-Van-Tam, J. S., Beck, C. R., and Convalescent Plasma Study Group (2015) The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis, *J. Infect. Dis.*, **211**, 80-90, doi: 10.1093/infdis/jiu396.
29. Goo, J., Jeong, Y., Park, Y. S., Yang, E., Jung, D. I., Rho, S., Park, U., Sung, H., Park, P. G., Choi, J. A., Seo, S. H., Cho, N. H., Lee, H., Lee, J. M., Kim, J. O., and Song, M. (2020) Characterization of novel monoclonal antibodies against MERS-coronavirus spike protein, *Virus Res.*, **278**, 197863, doi: 10.1016/j.virusres.2020.197863.
30. Beigel, J. H., Voell, J., Kumar, P., Raviprakash, K., Wu, H., Jiao, J. A., Sullivan, E., Luke, T., and Davey, R. T. Jr. (2018) Safety and tolerability of a novel, polyclonal human anti-MERS coronavirus antibody produced from trans-chromosomal cattle: a phase 1 randomised, double-blind, single-dose-escalation study, *Lancet Infect. Dis.*, **18**, 410-418, doi: 10.1016/S1473-3099(18)30002-1.
31. Ko, J. H., Seok, H., Cho, S. Y., Ha, Y. E., Baek, J. Y., Kim, S. H., Kim, Y. J., Park, J. K., Chung, C. R., Kang, E. S., Cho, D., Müller, M. A., Drosten, C., Kang, C. I., Chung, D. R., Song, J. H., and Peck, K. R. (2018) Challenges of convalescent plasma infusion therapy in Middle East respiratory coronavirus infection: a single centre experience, *Antivir. Ther.*, **23**, 617-622, doi: 10.3851/IMP3243.
32. Arabi, Y. M., Hajeer, A. H., Luke, T., Raviprakash, K., Balkhy, H., Johani, S., Al-Dawood, A., Al-Qahtani, S., Al-Omari, A., Al-Hameed, F., Hayden, F. G., Fowler, R., Bouchama, A., Shindo, N., Al-Khairy, K., Carson, G., Taha, Y., Sadat, M., and Alahmadi, M. (2016) Feasibility of using convalescent plasma immunotherapy for MERS-CoV infection, Saudi Arabia, *Emerg Infect Dis.*, **22**, 1554-1561, doi: 10.3201/eid2209.151164.
33. Wang, L., Qiao, X., Zhang, S., Qin, Y., Guo, T., Hao, Z., Sun, L., Wang, X., Wang, Y., Jiang, Y., Tang, L., Xu, Y., and Li, Y. (2018) Porcine transmissible gastroenteritis virus nonstructural protein 2 contributes to inflammation via NF- $\kappa$ B activation, *Virulence*, **9**, 1685-1698, doi: 10.1080/21505594.2018.1536632.
34. Castaño-Rodríguez, C., Honrubia, J. M., Gutiérrez-Alvarez, J., DeDiego, M. L., Nieto-Torres, J. L., Jiménez-Guardaño, J. M., Regla-Nava, J. A., Fernández-Delgado, R., Verdía-Báguena, C., Queralt-Martín, M., Kochan, G., Perlman, S., Aguilera, V. M., Sola, I., and Enjuanes, L. (2018) Role of severe acute respiratory syndrome Coronavirus Viroproteins E, 3a, and 8a in replication and pathogenesis, *mBio*, **9**, e02325-17, doi: 10.1128/mBio.02325-17.
35. Lei, J., Kusov, Y., and Hilgenfeld, R. (2018) Nsp3 of coronaviruses: structures and functions of a large multi-domain protein, *Antiviral. Res.*, **149**, 58-74, doi: 10.1016/j.antiviral.2017.11.001.
36. Fung, T. S., and Liu, D. X. (2019) Human coronavirus: host-pathogen interaction, *Annu. Rev. Microbiol.*, **73**, 529-557, doi: 10.1146/annurev-micro-020518-115759.
37. Peersen, O. B. (2019) A comprehensive superposition of viral polymerase structures, *Viruses*, **11**, E745, doi: 10.3390/v11080745.
38. Kleine-Weber, H., Elzayat, M. T., Hoffmann, M., and Pöhlmann, S. (2018) Functional analysis of potential cleavage sites in the MERS-coronavirus spike protein, *Sci. Rep.*, **8**, 16597, doi: 10.1038/s41598-018-34859-w.
39. Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G., and Decroly, E. (2020) The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade, *Antiviral. Res.*, **176**, 104742, doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104742.
40. Жирнов О. П., Поярков С. В., Малышев Н. А. (2009) Мишени противовирусного и противовоспалительного действия апротинина: перспективы нового использования, *Пульмонология*, **33**, 27-33.
41. Wrapp, D., Nianshuang, W., Kizzmekia, S., Corbett, J. A., Goldsmith, C. L. H., Olubukola, A., Barney, S., Graham, J., and McLellan, S. (2020) Cryo-EM Structure of the 2019-

- nCoV spike in the prefusion conformation, *BioRxiv*, doi: 10.1101/2020.02.11.944462.
42. Ashour, H. M., Elkhatib, W. F., Rahman, M. M., and Elshabrawy, H. A. (2020) Insights into the recent 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) in light of past human corona-virus outbreaks, *Pathogens*, **9**, pii: E186, doi: 10.3390/pathogens9030186.
  43. Kruse, R. L. (2020) Therapeutic strategies in an outbreak scenario to treat the novel coronavirus originating in Wuhan, China, *F1000 Res.*, **9**, 72, doi: 10.12688/f1000research.22211.2.
  44. Wan, Y., Shang, J., Sun, S., Tai, W., Chen, J., Geng, Q., He, L., Chen, Y., Wu, J., Shi, Z., Zhou, Y., Du, L., and Li, F. (2020) Molecular mechanism for antibody-dependent enhancement of coronavirus entry, *J. Virol.*, **94**, e02015-19, doi: 10.1128/JVI.02015-19.
  45. Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H., and Doerr, H. W. (2003) Treatment of SARS with human interferons, *Lancet*, **362**, 293-294.
  46. Yin, Y., and Wunderink, R. G. (2018) MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia, *Respirology*, **23**, 130-137, doi: 10.1111/resp.13196.
  47. Mubarak, A., Alturaiki, W., and Hemida, M. G. (2019) Middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): infection, immunological response, and vaccine development, *J. Immunol. Res.*, **2019**, 6491738, doi: 10.1155/2019/6491738.
  48. Channappanavar, R., Fehr, A. R., Zheng, J., Wöhlford-Lenane, C., Abrahante, J. E., Mack, M., Sompallae, R., McCray, P. B. Jr., Meyerholz, D. K., and Perlman, S. (2019) IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes, *J. Clin. Invest.*, **130**, 3625-3639, doi: 10.1172/JCI126363.
  49. Lu, Y., Hards, K., Dahms, S. O., Böttcher-Friebertshäuser, E., Steinmetzer, T., Than, M. E., Klenk, H. D., and Garten, W. (2015) Peptidomimetic furin inhibitor MI-701 in combination with oseltamivir and ribavirin efficiently blocks propagation of highly pathogenic avian influenza viruses and delays high level oseltamivir resistance in MDCK cells, *Antiviral Res.*, **120**, 89-100, doi: 10.1016/j.antiviral.2015.05.006.
  50. Channappanavar, R., and Perlman, S. (2017) Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology, *Semin. Immunopathol.*, **39**, 529-539, doi: 10.1007/s00281-017-0629-x.
  51. WHO interim guidance 28 January 2020, *Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (2019-nCoV) infection is suspected*, URL: .
  52. Weiss, S. L., Peters, M. J., Alhazzani, W., Agus, M. S. D., Flori, H. R. et al. (2020) Surviving sepsis campaign international guidelines for the management of septic shock and sepsis-associated organ dysfunction in children, *Pediatr. Crit. Care Med.*, **21**, e52-e106, doi: 10.1097/PCC.0000000000002198.
  53. Licitra, B. N., Millet, J. K., Regan, A. D., Hamilton, B. S., Rinaldi, V. D., Duhamel, G. E., and Whittaker, G. R. (2013) Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus, *Emerg. Infect. Dis.*, **19**, 1066-1073, doi: 10.3201/eid1907.121094.
  54. Cheng, J., Zhao, Y., Xu, G., Zhang, K., Jia, W., Sun, Y., Zhao, J., Xue, J., Hu, Y., and Zhang, G. (2019) The S2 subunit of QX-type infectious bronchitis coronavirus spike protein is an essential determinant of neurotropism, *Viruses*, **11**, E972, doi: 10.3390/v11100972.
  55. Le Coupanec, A., Desforges, M., Meessen-Pinard, M., Dubé, M., Day, R., Seidah, N. G., and Talbot, P. J. (2015) Cleavage of a neuroinvasive human respiratory virus spike glycoprotein by proprotein convertases modulates neurovirulence and virus spread within the central nervous system, *PLoS Pathog.*, **11**, e1005261, doi: 10.1371/journal.ppat.1005261.

## MOLECULAR TARGETS IN THE CHEMOTHERAPY OF CORONAVIRUS INFECTION

### Review

O. P. Zhirnov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *The Russian-German Academy of Medical and Biotechnological Sciences, Skolkovo Innovation Center, 121205 Moscow, Skolkovo, Russia*

<sup>2</sup> *Ivanovsky Institute of Virology, Gamaleya Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 123098 Moscow, Russia*

Received March 18, 2020

Revised March 22, 2020

Accepted March 22, 2020

In the pathogenesis of the infectious process in the respiratory tract by SARS, MERS, and COVID-19 coronaviruses, two stages can be distinguished: early (etiologic) and late (pathogenetic) ones. In the first stage, when the virus multiplication and accumulation are prevalent under insufficient host immune response, the use of chemotherapeutic agents blocking the reproduction of the virus is reasonable to suppress the development of the disease. This article considers six major chemotherapeutic classes aimed at certain viral targets: inhibitors of viral RNA polymerase, inhibitors of viral protease Mpro, inhibitors of proteolytic activation of viral protein S allowing virus entry into the target cell, inhibitors of virus uncoating in cellular endosomes, compounds of exogenous interferons, and compounds of natural and recombinant virus-neutralizing antibodies. In the second stage, when the multiplication of the virus decreases and threatening pathological processes of excessive inflammation, acute respiratory distress syndrome, pulmonary edema, hypoxia, and secondary bacterial pneumonia and sepsis events develop, a pathogenetic therapeutic approach including extracorporeal blood oxygenation, detoxification, and anti-inflammatory and anti-bacterial therapy seems to be the most effective way for the patient's recovery.

**Keywords:** coronaviruses, COVID-19, chemotherapy, pathogenesis, drugs

УДК 577.2

## МЕМБРАННЫЕ КОНТАКТЫ В СОСТАВЕ ПЛАЗМОДЕСМ: СТРУКТУРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ И ИХ ФУНКЦИИ

### Обзор

© 2020 А.В. Панкратенко<sup>1</sup>, А.К. Атабекова<sup>1</sup>, С.Ю. Морозов<sup>1,2</sup>, А.Г. Соловьев<sup>1,2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра вирусологии, 119991 Москва, Россия*

<sup>2</sup> *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119992 Москва, Россия; электронная почта: solovyev@belozersky.msu.ru*

<sup>3</sup> *Институт Молекулярной Медицины, Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова, 119991 Москва, Россия*

<sup>4</sup> *Всероссийский Научно-Исследовательский Институт Сельскохозяйственной Биотехнологии, 127550 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 12.02.2020

После доработки 10.03.2020

Принята к публикации 16.03.2020

Плазмодесмы представляют собой каналы, соединяющие клетки в тканях растений. В плазмодесмах происходит соединение цитоплазмы, плазматической мембраны (ПМ) и эндоплазматического ретикула (ЭПР) соседних клеток. Через плазмодесмы происходит активный транспорт макромолекул, таких как белки и РНК, что обеспечивает функциональную целостность тканей растений и передачу сигналов, необходимых для индивидуального развития и ответов на внешние воздействия. Исследования последних лет показали, что в состав плазмодесм входят мембранные контакты (МК), специализированные структуры, которые формируются при участии ряда белковых компонентов, соединяющих мембраны ЭПР и ПМ. В общем случае, как показано преимущественно для клеток животных, МК между ЭПР и ПМ участвуют в транспорте липидных и белковых компонентов между этими мембранными компартментами, а также в поддержании структурной целостности ЭПР и ответе на стрессы. Структура МК в составе плазмодесм растений изучена существенно хуже, и в настоящее время активные исследования структурных элементов плазмодесм, обеспечивающих связь между ЭПР и ПМ в составе этих органелл, только начинают разворачиваться. В настоящем обзоре рассмотрены белковые компоненты, для которых показано или предполагается участие в формировании МК в плазмодесмах, их структурные и функциональные особенности. Кроме того, обсуждается роль цитоскелета, липидных микродоменов в составе мембран и компонентов клеточной стенки в поддержании структуры МК плазмодесм и ее ремоделировании в ответ на различные биотические и абиотические воздействия.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** плазмодесмы, мембранные контакты, эндоплазматический ретикулум, плазматическая мембрана, мембранные микродомены, белки плазмодесм, белки мембранных контактов, вирусы растений.

DOI: 10.31857/S0320972520050024

### ВВЕДЕНИЕ

Координация различных метаболических процессов, протекающих в клетках растений,

требует взаимодействия между органеллами. Значительная роль в этом взаимодействии принадлежит процессам, протекающим в зонах мембранных контактов (МК), — структурах,

Принятые сокращения: ЖК — жидкокристаллический; МК — мембранный контакт; ПМ — плазматическая мембрана; ЭПР — эндоплазматический ретикулум; GIPC — гликозилинозитолфосфорил церамиды (glycosyl inositol phosphoglyceramides); GPI — гликозилфосфатидилинозитол (glycosylphosphatidylinositol); Lo — упорядоченные ЖК микродомены мембран; LTP — липид-транспортирующие белки (lipid transfer proteins); PA — фосфатидная кислота (phosphatidic acid); PI(4,5)P<sub>2</sub> — фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate); PI(4)P — фосфатидилинозитол-4-фосфат (phosphatidylinositol-4-phosphate); PIP — фосфатидилинозитолфосфаты (phosphatidylinositol phosphate); PS — фосфатидилсерин (phosphatidylserine); PDCB — семейство белков плазмодесм, связывающих каллозу (plasmodesmata callose binding family); RTNLB — ретикулон-подобные белки (reticulon-like proteins); SEL — предельная пропускная способность (size-exclusion limit).

\* Адресат для корреспонденции.

обеспечивающих физическое взаимодействие и транспорт различных молекул между состыкованными мембранами двух органелл.

Различные типы МК были обнаружены в клетках млекопитающих, дрожжей, растений и, по всей видимости, являются эволюционно консервативными для эукариот [1, 2]. МК характеризуются малым (~10–30 нм) расстоянием между мембранами, а также специфическим липидным и белковым составом, в частности, наличием связующих элементов белковой природы, благодаря которым мембраны удерживаются вместе, не сливаясь [3]. Такое строение МК позволяет органеллам функционально взаимодействовать друг с другом посредством кальций-зависимых сигналов, обмена молекулами липидов или транс-взаимодействий белковых комплексов, которые, находясь на одной мембране, могут регулировать процессы, протекающие на другой [4, 5]. В растительных клетках МК участвуют в целом ряде процессов, таких как регуляция развития [6], межклеточная коммуникация [7], а также ответы на стресс, в которые вовлекаются пластиды, митохондрии, пероксисомы и другие органеллы клетки [2, 8, 9].

Особым типом МК, характерным только для растений, являются МК в составе плазмодесм – цитоплазматических каналов, которые соединяют растительные клетки и представляют собой основной путь межклеточной коммуникации и обмена веществами в тканях растений [10]. Поскольку плазмодесмы, имеющие диаметр ~30–50 нм, образованы плазматической мембраной (ПМ) и содержат в центре трубочку ЭПР (десмотрубочку), они представляют собой систему (длиной обычно ~500 нм [11]) из двух мембранных трубок, вставленных одна в другую. ПМ и мембрана десмотрубочки расположены чрезвычайно близко друг к другу (на расстоянии ~10–15 нм [12], а в некоторых случаях это расстояние может достигать 3 нм [13]) и по всей длине канала плазмодесм скреплены неизвестными элементами, подобными спицам колеса и имеющими, по всей видимости, белковую природу [12]. Таким образом, система из двух мембранных структур в составе плазмодесмы может рассматриваться как специализированный МК [1]. В настоящее время сформировалось представление о том, что именно компоненты МК в составе плазмодесм организуют и поддерживают их внутреннюю структуру, а также участвуют в изменении функционального состояния плазмодесм в ответ на различные воздействия. В соответствии с этими взглядами, выявление молекулярных компонентов МК в составе плазмодесм и расшифровка механизмов их функционирования может стать одним из ключей к по-

ниманию механизмов межклеточной коммуникации в растениях, основанной на транспорте через плазмодесмы. Ниже рассмотрены имеющиеся к настоящему времени данные о структуре и функциях МК в составе плазмодесм.

### БЕЛКОВЫЕ КОМПОНЕНТЫ МК ПЛАЗМОДЕСМ

Несмотря на то, что белки, локализующиеся в плазмодесмах, были объектом пристального интереса исследователей, и для их идентификации применяли самые различные подходы [14], долгое время представления о белковом составе плазмодесм оставались довольно ограниченными. Значительный прорыв произошел в последние годы благодаря разработке новых стратегий анализа на основе масс-спектрометрии, субклеточного фракционирования и других методов [15–17].

На сегодняшний день установлено, что в функционировании плазмодесм принимает участие множество различных белков, как непосредственно локализующихся в этих структурах, так и регулирующих их работу извне [15, 16]. В частности, было показано, что в плазмодесмах локализируются белки семейств PDLP (семейство белков, локализующихся в плазмодесмах, *plasmodesmata-located protein family*) [18], влияющие на пропускную способность плазмодесм и, по всей видимости, участвующие в развитии системной приобретенной устойчивости растений [19], и семейство белков плазмодесм, связывающих каллозу (PDCB, *plasmodesmata callose binding family*) [20], а также рецептор-подобные киназы [21, 22], гермин-подобные белки (GLP, *germin-like proteins*) [23] и ретикулон-подобные белки (RTNLB) [24].

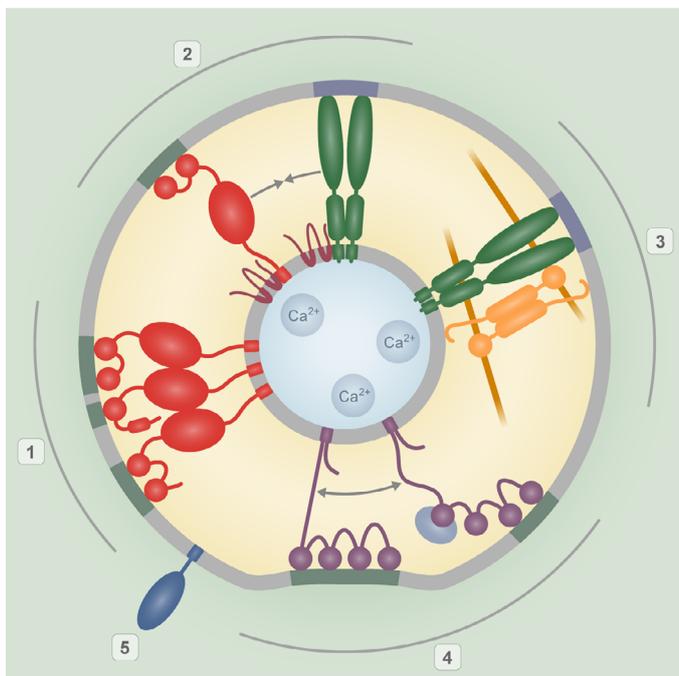
Природа белковых структур, связующих мембраны плазмалеммы и десмотрубочки в плазмодесмах, до сих пор не установлена. Однако, основываясь на структуре уже изученных МК [1, 2], можно предположить, что белки МК в составе плазмодесм имеют следующие характерные черты: они (1) избирательно концентрируются в зонах МК, (2) содержат ЭПР-якорные домены, (3) имеют липид-связывающие мотивы, позволяющие им взаимодействовать с липидами ПМ, (4) обладают достаточным размером, чтобы обеспечивать контакт мембран через разделяющее их цитозольное пространство напрямую (или, возможно, опосредованно через взаимодействие с другими белками). Также можно предположить, что в образовании МК в составе плазмодесм задействованы белки различных семейств, как характерных непосредственно для

плазмодесм, так и функционирующих в других типах МК [1]. Среди семейств растительных белков известно по меньшей мере три, которые участвуют в создании МК между ЭПР и ПМ: белки VAP (the vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein) [6], синаптогамины (SYT) [25], а также МСТР [26] (рисунок).

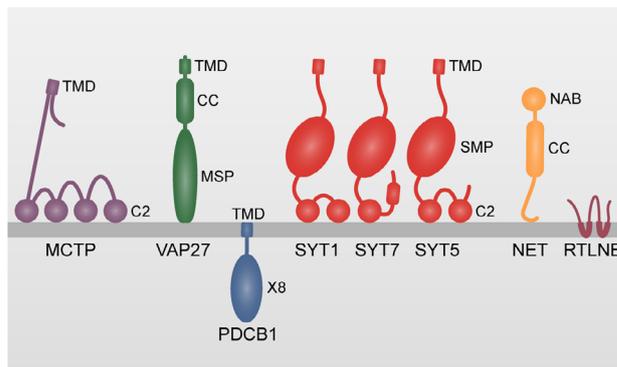
**Семейство VAP.** Белки семейства VAP консервативны для эукариот и включают C-концевой трансмембранный домен, центральный coiled-coil домен и N-концевой домен MSP (major sperm protein domain) [27]. Домен MSP способен взаимодействовать с фосфатидилинозитол-4-фосфатом [PI(4)P] и фосфатидилсерин (PS) плазмалеммы [28], а также с белками

ПМ, содержащими мотив FFAT (two phenylalanines in an acid tract), тем самым обеспечивая образование МК между ПМ и ЭПР [29] (рисунок). У различных эукариот с белками VAP могут взаимодействовать белки, которые содержат мотив StART (sterol-binding steroidogenic acute regulatory (StAR)-related lipid-transfer motif) и участвуют в переносе липидов между мембранами [3], а также белки, содержащие домен PH (phosphoinositide-binding pleckstrin homology domain) и/или оксистерол-связывающий мотив, которые предположительно необходимы для состыковки мембран в зоне контакта [30]. Показано взаимодействие VAP27 с белками RTNLB3 и RTNLB6 [31] (рисунок).

*a*



*б*



Предполагаемые компоненты мембранных контактов в составе плазмодесм. *a* – Схематическое изображение аксиальной проекции канала плазмодесм. Показано пространственное расположение белков и белковых комплексов, образующих контакты между мембраной десмотрубочки (в центре) и плазматической мембраной, прилегающей к клеточной стенке. (1) Межмембранный контакт через комплекс белков SYT1, SYT5 и SYT7. (2) Белки SYT1 и VAP27 напрямую взаимодействуют с ретикулонами семейства RTNLB и опосредованно – друг с другом. Последнее взаимодействие отмечено стрелками. (3) Межмембранный контакт через комплекс белков VAP27 и NET. VAP27 взаимодействует с белком семейства NET через MSP домен, NET связывается с актином через домен NAB и с мембраной через C-концевой участок. VAP27 взаимодействует с липидами и/или белками плазмалеммы, а также с элементами клеточной стенки. (4) Межмембранный контакт через МСТР белки. МСТР белок взаимодействует с отрицательно заряженными липидами мембраны через C2 домены. Взаимодействие с регуляторными белками или изменение концентрации ионов  $Ca^{2+}$  приводит к изменению конформации МСТР и сокращению или увеличению расстояния между плазмалеммой и десмотрубочкой. Обратимое изменение конформации МСТР показано стрелкой. (5) GPI-заякоренный белок PDCB1, имеющий сродство к Ло-микродоменам мембраны, связывающийся с каллозой своим X8-доменом и участвующий в процессах отложения каллозы. Мобилизация белка PDCB1 в плазмодесмы может происходить в ответ на индуцированное перераспределение липидов в бислое и образование новых микродоменов. Выделены участки плазмалеммы, обогащенные отрицательно заряженными липидами, которые взаимодействуют с C2-доменами, и зоны контакта VAP27, плазмалеммы и клеточной стенки.  $Ca^{2+}$  – ионы кальция. *б* – Белки, формирующие мембранные контакты в составе плазмодесм, и их домены. TMD – трансмембранный домен, C2 – C2-домен, CC – coiled-coil домен, MSP – major sperm protein домен, X8 – X8-домен, SMP – synaptotagmin-like mitochondrial lipid-binding protein домен, NAB – NET-actin-binding домен. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

В геноме *Arabidopsis thaliana* обнаружено 10 генов, представляющих семейство VAP27 у растений. Нарушения в уровне экспрессии определенных белков этого семейства приводят к плейотропным дефектам в развитии семян, пыльцы и корневых волосков [6]. Белки VAP27 подразделяются на три клады. Клада II характеризуется отсутствием трансмембранного домена; ее представители являются периферическими белками плазмалеммы и не локализируются в зонах МК между ЭПР и ПМ. Представители клады I и III являются интегральными белками ЭПР и участвуют в образовании МК; для белка VAP27-1 показано взаимодействие через MSP-домен с белком NET3C, представителем растительного суперсемейства NET, которое обеспечивает связь актинового цитоскелета с различными мембранными компартментами клетки [32]. Следует отметить, что оба белка, по-видимому, функционируют в виде ди/олигомеров [27]. Для образования МК между ЭПР и плазмалеммой необходимы как трансмембранный домен, так и домен MSP белка VAP27; кроме того, в этот процесс, по всей видимости, вовлечены система цитоскелета и клеточной стенки [6, 27] (рисунок).

На сегодняшний день не получено однозначных доказательств существования пула VAP27 и/или NET3C в плазмодесмах. Следует отметить, однако, что другой представитель семейства NET, белок NET1A, локализуется в плазмодесмах [32]. Также показано опосредованное взаимодействие VAP27 с белком SYT1 *A. thaliana* из семейства синаптоагминов, который участвует в ряде процессов в плазмодесмах [25, 33].

**Семейство SYT.** Синаптоагмины растений (белки SYT) охарактеризованы относительно недавно; известно, что представители этого семейства участвуют в образовании МК между ЭПР и ПМ [7, 34] и гомологичны белкам E-Syt и Tcb, которые являются связующими элементами в зонах МК клеток млекопитающих и дрожжей [35]. В геноме *A. thaliana* обнаружено семь генов SYT (SYT1–SYT7) [34], и наиболее хорошо изученным является белок SYT1.

SYT1 содержит 1) N-концевой трансмембранный домен, заякоренный в ЭПР; 2) линкерный участок длиной ~40 аминокислот, что соответствует дистанции в ~15 нм и может быть достаточным для состыковки мембран сквозь цитозольное пространство в области МК; 3) цитоплазматический домен SMP (synaptotagmin-like mitochondrial lipid-binding protein domain), который необходим для димеризации E-Syt в клетках млекопитающих и осуществляет перенос липидов между органеллами, образуя, по всей видимости, гидрофобный канал для переноса молекул

от мембраны к мембране [36, 37]; 4) два C-концевых C2 (Ca<sup>2+</sup>-dependent lipid-binding domain) домена. Трансмембранный домен и домен SMP, по-видимому, ограничивают локализацию SYT1 в зонах контакта ЭПР и ПМ, в то время как C2 домены обеспечивают электростатическое взаимодействие белка с отрицательно заряженными фосфолипидами плазмалеммы [25].

В клетках SYT1, по всей видимости, функционирует в составе комплексов, т.к. молекулы SYT1 способны взаимодействовать друг с другом, а также с белками SYT5 и SYT7, которые локализируются в зонах МК между ЭПР и плазмалеммой [34] (рисунок). Действуя вместе, эти белки обеспечивают состыковку мембран и формирование неподвижных трубочек ЭПР, а также сжатие ЭПР перед входом в плазмодесмы для образования десмотрубочек в этих каналах. Отсутствие функционального комплекса SYT1–SYT5–SYT7 приводит к нарушениям в морфологии ЭПР и влияет на межклеточный транспорт и внутриклеточную локализацию транспортного белка вируса YomV (Yousai Mosaic Virus); возможно, это свидетельствует об участии SYT белков в процессах активного транспорта липидов и мембранных белков в десмотрубочках плазмодесм [34].

Ряд других данных также указывает на роль SYT в функционировании плазмодесм: так, например, SYT1 перемещается к плазмодесмам во время вирусной инфекции [7], а утрата его функции приводит к изменениям в регуляции защитных ответов при инфекции [19]. Наконец, в протеоме плазмодесм *A. thaliana* обнаружено несколько SYT белков [1, 17].

SYT1 физически контактирует с рядом белков, таких как стигмастерол-связующий белок ROSY1 [38], ретикулоны RTNLB3 и RTNLB6, которые обнаруживаются в плазмодесмах и необходимы для формирования трубочек ЭПР и поддержания кривизны мембраны ЭПР [31] (рисунок), а также белок VST (VAP-RELATED SUPPRESSOR OF TMM), который задействован в сигналинге с участием киназы ERECTA-LIKE2 (ERL2) из семейства LRR-RLK (leucine-rich repeat receptor-like kinase), локализующейся в ПМ [39]. Кроме того, SYT1 взаимодействует с комплексом SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), участвующим в слиянии везикул [19]; возможно, SYT1 регулирует этот процесс Ca<sup>2+</sup>-зависимым способом, аналогично белкам SYT млекопитающих [35].

Изменение морфологии ЭПР при функциональной инактивации SYT1 [7] сопровождается частичной деполимеризацией актинового цитоскелета и повышением чувствительности рас-

тений к абиотическим стрессам, связанным с изменением тургора клеток, например, осмотическому стрессу или замораживанию [40, 41], а также к механическому стрессу. При механическом стрессе возрастает экспрессия SYT1. Таким образом, можно предположить, что SYT1, вероятно, является элементом системы механорецепции в растительной клетке. Зоны МК между ЭПР и плазмалеммой могут служить своеобразными деформируемыми платформами, координирующими ответ кортикального ЭПР и цитоскелета на механический стресс, что позволяло бы быстро минимизировать нагрузку на плазмалемму, возникающую в результате механического стресса. Альтернативная модель, основанная на данных, полученных для клеток млекопитающих, предполагает, что механический стимул приводит к сокращению расстояния между ЭПР и ПМ, тем самым, вероятно, усиливая структурную стабилизацию и перенос сигналов между этими компартментами [25].

Еще одна гипотеза предполагает участие SYT1 в передаче кальциевых сигналов по аналогии с E-Syt белками МК млекопитающих. Известно, что у млекопитающих  $Ca^{2+}$ -сигналы стимулируют образование и стабилизацию МК или сокращение расстояния между ЭПР и ПМ [42, 43], что сопровождается высокоафинным связыванием  $Ca^{2+}$  белками E-Syt, их кластеризацией и усилением электростатического взаимодействия между E-Syt и отрицательно заряженными фосфолипидами плазмалеммы [35]. Схожие процессы могут протекать и в растительных клетках с участием белков МК, содержащих  $Ca^{2+}$ -чувствительные модули, например, C2-домены SYT1. Через такие модули кальциевые сигналы могут стимулировать взаимодействие белков SYT с определенными липидами и/или белковыми партнерами с последующим изменением архитектуры зон МК. Подобная модель объясняет ряд наблюдаемых явлений, например,  $Ca^{2+}$ -зависимое перемещение ионных каналов от субдоменов ЭПР в субдомены плазмалеммы при солевом стрессе [44], изменение локализации зон МК и  $Ca^{2+}$ -зависимую активацию иммунных секреторных путей в ответ на грибковую инфекцию [19] и  $Ca^{2+}$ -зависимое изменение пропускной способности плазмодесм [45].

**Белки семейства МТСР.** Недавно опубликованное исследование показывает, что еще одним классом связующих элементов в зонах МК плазмодесм, вероятно, являются белки семейства МТСР (белки со множественными доменами C2 и трансмембранным районом, multiple C2 domains and transmembrane region proteins) [26]. Два представителя белков МТСР *A. thaliana*, AtMCTP1/Flower Locus T Interacting Protein

(FTIP) и AtMCTP15/QUIRKY (QKY), были ранее описаны как белки плазмодесм, участвующие в межклеточном транспорте сигналов развита [46, 47].

Белки МТСР структурно сходны с синаптогаминами и содержат несколько C-концевых трансмембранных доменов, заякоренных в ЭПР, и, возможно, участвующих в поддержании определенной степени изгиба его мембраны, а также от трех до четырех доменов C2 в N-концевой части, способных связываться с отрицательно заряженными фосфолипидами ПМ, в частности, с PI(4)P и с PS. Вероятно, наличие нескольких C2-доменов позволяет белкам МТСР изменять расстояние между мембранами МК за счет изменения конформации в ответ на различные сигналы, например, изменение уровня  $Ca^{2+}$ , состава ПМ или появление каких-либо транспортируемых мобильных сигналов [26] (рисунков). Это позволяло бы координировать межклеточный транспорт и взаимодействия между органеллами (вероятно, при участии и других белков).

Установлено, что AtMCTP1/FTIP является партнером белка FT (Flowering Locus T) и необходим для его загрузки во флоэму [46]; AtMCTP15/QUIRKY взаимодействует с рецептор-подобной киназой STRUBBELIG, локализуемой в ПМ и, в том числе, в плазмодесмах [47]; белки AtMCTP3/AtMCTP4 регулируют межклеточный транспорт белка SHOOTMERIS-TEMLESS в апикальную меристему побега [48]. Показано, что белки AtMCTP3 и AtMCTP4 локализованы в плазмодесмах, причем мутация *Atmctp3.Atmctp4* приводит к снижению интенсивности межклеточного транспорта в клетках эпидермиса листа и значительным изменениям в протеоме плазмодесм. Кроме того, экспрессия AtMCTP4 в значительной степени восстанавливает образование МК между ЭПР и плазмалеммой в мутантной линии дрожжей, лишенной шести собственных связующих белков МК [26]. Таким образом, вполне вероятно, что белки МТСР координируют процессы, протекающие в зонах МК плазмодесм, и межклеточную передачу сигналов.

**Роль белков цитоскелета.** Среди других белков в качестве потенциальных кандидатов на роль связующих элементов в МК плазмодесм также рассматривают некоторые миозины, которые, возможно, способны связываться с ПМ через собственный C-концевой домен, а через «головку», содержащую моторную область, — с F-актином, ассоциированным с десмотрубочкой [49]. Например, миозин АТМ1 класса VIII, который ассоциирован с плазмодесмами, содержит в C-концевом домене кластер основных

аминокислот, взаимодействующих с кислыми фосфолипидами [50], и способен к димеризации (что согласуется с V-образной формой некоторых связующих элементов, обнаруженной с помощью электронной микроскопии) [12]. По своим кинетическим свойствам он скорее является сенсором натяжения, чем моторным белком, поскольку АТМ1 имеет высокое сродство к актину, но низкую скорость скольжения относительно него и низкую АТФазную активность по сравнению с миозинами других классов [51]. Другие исследования также указывают на то, что в функционировании плазмодесм задействован цитоскелет. Так, установлено, что пропускная способность плазмодесм связана с работой актин-миозиновой системы, и разрушение актиновых филаментов может влиять на вирусный межклеточный транспорт [52]. Участие миозинов класса VIII в регулировании пропускной способности плазмодесм подтверждается экспериментами, в которых показано, что ингибирование любого из трех миозинов этого класса блокирует способность транспортного белка вируса табачной мозаики локализоваться в плазмодесмах и супрессирует межклеточный транспорт вируса [53]. Тем не менее вопрос о роли элементов цитоскелета в создании и поддержании МК плазмодесм остается открытым, и большая часть нынешних представлений об этих процессах основана на данных, полученных для МК между ЭПР и ПМ в других частях клетки.

Было показано, что молекулярные взаимодействия между МК, содержащими SYT1, VAP27 и кортикальным актиновым цитоскелетом необходимы для стабилизации системы кортикального ЭПР [33]. NET3C, партнер VAP27, связывается с F-актином через N-концевой домен NAB (NET-actin-binding domain) [27] (рисунок). По-видимому, F-актин не определяет исходную локализацию NET3C, но стабилизирует его ассоциацию с липидами и/или другими мембранными белками плазмалеммы, а также участвует в обновлении пула NET3C. Мобильность и скорость обновления пула VAP27 связана скорее с функционированием микротрубочек. Это указывает на участие элементов цитоскелета в организации МК между ЭПР и плазмалеммой наравне со связующими элементами МК. Были предложены две возможные модели, описывающие этот процесс: (1) VAP27 напрямую соединяет ЭПР и плазмалемму, взаимодействует с NET3C, который локализуется в обоих типах мембран, а также с некоторыми другими белками ПМ, или (2) NET3C при участии других белков образует в зоне МК некие базовые структуры, к которым VAP27 перемещается пос-

ле определенного сигнала или модификации. В обоих вариантах цитоскелет стабилизирует локализацию NET3C и VAP27 в зонах МК [27].

Ряд других данных свидетельствует о том, что, вероятно, система кортикального цитоскелета также предоставляет информацию для образования и позиционирования новых зон МК между ЭПР и ПМ. При этом уже существующие зоны МК, содержащие SYT1 и VAP27, располагаются в областях, лишенных микротрубочек. Таким образом, можно предполагать, что кортикальные микротрубочки не требуются для поддержания уже установленных МК и даже, наоборот, служат для них стерическим препятствием [25].

Следует отметить, что популяция белка SYT1 в растительных клетках неоднородна: помимо пула кортикального SYT1, который преимущественно образует стационарные структуры в зонах МК между ЭПР и плазмалеммой, наблюдается также пул высокоподвижного внутриклеточного белка, чей транспорт прекращается при деполимеризации F-актина. Это указывает на роль актинового цитоскелета в адресном транспорте и обновлении популяции SYT1 в клетке [25]. Важно также подчеркнуть, что регуляция распределения SYT1 системой цитоскелета различается в клетках эпидермиса побега и в зрелых клетках устьиц [25], что, вероятно, свидетельствует о взаимосвязи между этими процессами и клеточной дифференцировкой.

Недавнее исследование белка млекопитающих E-Syt1 указывает на вероятную связь между цитоскелет-зависимым установлением МК и передачей кальциевого сигнала. Так, было обнаружено, что  $Ca^{2+}$ -опосредованная активация PERK, сенсора стресса, локализованного в ЭПР, приводит к перераспределению связующих структур E-Syt1, при участии в этом процессе F-актина [54]. В растительных клетках перестройка и динамика цитоскелета часто интегрирована с сигнальными путями  $Ca^{2+}$ /кальмодулина [55]. Можно предположить, что координация этих процессов происходит в зонах МК между ЭПР и ПМ. В пользу данной гипотезы свидетельствует наблюдение, что различные представители семейства растительных белков IQD (IQ67 DOMAIN), партнеров кальмодулина, локализируются в статичных субдоменах ПМ, по всей вероятности, являющихся функционально различными сигнальными модулями, которые взаимодействуют с микротрубочками. Однако на данный момент нет однозначного подтверждения, что эти субдомены являются зонами МК [56].

**Белки 4/1 и PVL.** В функционировании МК плазмодесм могут принимать участие белки, которые мобилизуются в эти структуры в ответ на

определенные воздействия, в частности стрессы различной природы. К этой категории могут относиться белки *Nicotiana tabacum* 4/1 (Nt-4/1) и PBL (plant Bar31-like protein), взаимодействующие друг с другом *in vivo* и *in vitro* [57]. Белок 4/1, который специфичен для растений и не содержит известных функциональных доменов [58], локализуется как в ядре, так и в цитоплазме. Цитоплазматический пул белка образует тельца, ассоциированные с мембранами ЭПР и, вероятно, эндосом. Кроме того, 4/1-содержащие тельца взаимодействуют с актиновым цитоскелетом, который участвует в их внутриклеточном транспорте, и могут быть ассоциированы с плазмодесмами [57, 59, 60]. Делеция N-концевого фрагмента белка Nt-4/1 длиной 90 а.о. нарушает ассоциацию белка с мембранами и его внутриклеточное распределение, приводя к диффузной локализации делеционного мутанта в цитоплазме [57]. Было обнаружено, что ко-экспрессия с NbVAP27 или NtPBL меняет внутриклеточное распределение делеционного варианта Nt-4/1 и приводит к его локализации вдоль трубочек кортикального ЭПР. Кроме того, в условиях механического стресса делеционный вариант Nt-4/1 мобилизуется в сферические структуры, ассоциированные с микротрубочками [61].

Белок NtPBL эволюционно родственен белку млекопитающих Bar31, участвующему в образовании МК между митохондриями и ЭПР [4]. Показано, что NtPBL является интегральным мембранным белком, эффективно связывающим предшественники микро-РНК (миРНК), и экспрессия его РНК-связывающего домена в растениях приводит к фенотипу, характерному для нарушений функций миРНК [62]. Поскольку Nt-4/1 также имеет РНК-связывающую активность, взаимодействуя преимущественно с несовершенными дуплексами РНК [60], эта пара белков может быть вовлечена в сигналинг, связанный с транспортом РНК через плазмодесмы. С учетом изменения локализации мутанта Nt-4/1 в условиях механического стресса и данных о том, что уровень экспрессии гена 4/1 может значительно изменяться при инфекции патогенных грибов [60], можно предположить, что такого рода сигналинг связан с ответом на стрессовые воздействия. В связи с возможной ролью белков Nt-4/1 и PBL в межклеточном транспорте РНК интересно отметить, что белок Nt-4/1 имеет структурное сходство с белком дрожжей She2p [60], являющимся РНК-связывающим белком, обеспечивающим направленный транспорт РНК Ash1, в которой She2p узнает шпилечные участки, являющиеся специфическими сигналами внутриклеточного транспорта [63]. Согласно компьютерным предска-

ниям, третичная структура белка Nt-4/1 формируется преимущественно  $\alpha$ -спиралями и проявляет определенное сходство с пространственной укладкой полипептидной цепи белка She2p [58–60]. С другой стороны, показано, что белок Nt-4/1 способен к нуклео-цитоплазматическому транспорту [59]. С учетом этих данных можно предположить, что белок Nt-4/1 взаимодействует в ядре с молекулами РНК, включающими элементы вторичной структуры, которые являются сигналами транспорта, и обеспечивает их выход в цитоплазму. Дальнейший внутриклеточный транспорт таких комплексов может происходить с участием белка PBL, взаимодействующего как с белком Nt-4/1, так и с транспортируемыми молекулами РНК. Поскольку белок PBL является интегральным белком ЭПР, такой транспорт, вероятнее всего, происходит вдоль трубочек кортикального ЭПР.

### РОЛЬ ЛИПИДОВ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ МК ПЛАЗМОДЕСМ

Функционирование мембран в клетке определяется их белковым и липидным составом. Для мембран плазмалеммы, ЭПР и других оргanelл характерно образование мембранных микродоменов, представляющих собой отдельные функциональные зоны мембраны, которые имеют специфические липидные и белковые профили; в частности, был показан специфический липидный состав для мембран плазмодесм [64]. В основе образования микродоменов лежат различные факторы: свойства молекул липидов, биофизические характеристики мембраны (текучесть, толщина бислоя, изгиб, электростатические свойства), а также согласованная работа определенных белковых комплексов. Возникающие микродомены позволяют создать сложную систему, распознаваемую различными белками с липид-сенсорными доменами и обеспечивающую адресную доставку и специфическую локализацию многих мембранных белков в клетке [11, 20]. По всей вероятности, строгий контроль липидного состава и латеральной организации мембраны имеет большое значение для архитектуры и структурной пластичности плазмодесм [1].

Текучесть мембраны и формирование липидных микродоменов во многом обуславливаются разделением жидкокристаллических (ЖК) фаз, которое возникает в результате взаимодействия молекул стеролов с белками и липидами, содержащими насыщенные углеводородные цепочки. Благодаря этому формируются стерол-

обогащенные упорядоченные ЖК микродомены (Lo) и неупорядоченные ЖК микродомены (Ld). Стабильность этого разделения фаз поддерживается благодаря наличию липидов с ненасыщенными ацильными цепями [65, 66]. Степень жесткости/текучести мембраны связана с относительным содержанием в ней стеролов, поскольку плоская жесткая структура их молекул создает ограничения для ацильных цепей соседних молекул липидов [67]. Уровень содержания стеролов вкуче с упорядоченностью и длиной ацильных цепей липидов влияет на толщину бислоя [66].

Ряд данных указывает на связь между свойствами липидных микродоменов и характеристиками интегральных белков (в частности, их трансмембранных доменов), что лежит в основе механизма сортировки мембранных белков, называемого принципом гидрофобного несоответствия [68]. Так, например, исследование, описывающее протеом плазмодесм *Populus trichocarpa*, показало, что длина трансмембранных доменов белков плазмодесм увеличена по сравнению с белками микросом [69]. Таким образом, можно предположить, что ПМ в составе плазмодесм обладает сравнительно большей толщиной и имеет структуру, подобную стерольным/сфинголипидным Lo-микродоменам [10]. Возможно, субкомпартиментализация в мембранах плазмодесм происходит согласно другой модели: определенные интегральные белки или липиды могут выступать в качестве «затравки», вокруг которой бислой переходит в твердое состояние (гель-фазу), образуя специфический упорядоченный микродомен [70].

Одна из гипотез предполагает, что в растительных клетках образование микродоменов ПМ происходит с участием специфических для растений сфинголипидов GIPC (гликозилитолфосфорил церамидов). GIPC характеризуются очень длинными (до 28 атомов углерода) насыщенными ацильными цепями и, по всей видимости, локализируются преимущественно в наружном слое мембраны [71]. Обнаружено, что полигликозилированные GIPC способствуют увеличению размеров и жесткости фитостерол-зависимых упорядоченных микродоменов Lo [72]. Кроме того, длинные ацильные цепи GIPC могут взаимодействовать с ацильными цепями липидов в полифосфоинозитид-обогащенных микродоменах внутреннего липидного слоя ПМ, что приводит к «сцеплению» доменов внутреннего и наружного слоев ПМ между собой [71]. Согласно ряду данных, определенные зоны МК обогащены сфинголипидами и фитостеролами, однако, до сих пор неизвестно, какое значение имеет поддержание такого мик-

роокружения для взаимодействия между органеллами [11].

Один из потенциальных механизмов поддержания стабильности микродоменов в ПМ может заключаться в «ограждении» этих доменов структурными элементами, которые связаны с кортикальным цитоскелетом [73] и влияют на мобильность периферических и интегральных белков. Кроме того, стеролы могут напрямую взаимодействовать с каркасными белками, например, из семейства тетраспанинов, которые, в частности, обнаружены в плазмодесмах [64].

На образование и стабильность микродоменов мембраны влияют также ее искривление и упаковка липидов в бислое. Эти параметры могут определять взаимодействие с различными периферическими белками, которые узнают особенности локальной упаковки липидов. Примером могут служить белки, чувствительные к изгибам мембраны, которые взаимодействуют с ней своими амфипатическими спиральями [74]. Изгиб мембраны сам по себе может являться движущей силой для сортировки молекул в зависимости от их свойств, как это было показано для липидов [75] и некоторых трансмембранных белков [76]. В свою очередь, определенные белки, такие как, например, полипептиды, несущие домен ENTH (Epsin N-terminal homology domain; домен N-концевой гомологии с эпсином) или локальные изменения в составе липидов (см. ниже), могут вызывать искривление мембраны [77].

В плазмодесмах мембраны плазмалеммы и десмотрубочки имеют существенную кривизну. Из-за особенностей упаковки липидов во внешнем слое мембраны и кластеризации липидов, имеющих маленькие полярные группы, вероятно, происходит образование локальных липидных микродоменов и пространственная сегрегация белков, взаимодействующих с такими субдоменами, что обеспечивает функциональное разделение разных зон МК [1, 11].

Механизм, который вызывает и стабилизирует изгиб ПМ в плазмодесмах, неизвестен. С другой стороны, недавно было показано, что формирование десмотрубочки в первичных плазмодесмах происходит, по-видимому, с участием ретикулонов RTNLB3 и RTNLB6 [24]. Локальная геометрия мембраны в краевых участках плазмодесмы может стимулировать кластеризацию стеролов и сфинголипидов, что в определенных условиях, вероятно, играет роль при сортировке гликофосфатидилинозитол (GPI)-заякоренных белков [64]. Следует отметить, что метаболизм липидов может иметь значение для процессов передачи сигналов, протекающих с участием плазмодесм, поскольку было показа-

но, что сфингоидные основания, продукт расщепления сфинголипидов, выступают вторичными мессенджерами при клеточной гибели, индуцированной патогенами [78].

Некоторые из известных белков, являющихся связующими элементами МК, имеют домены, ассоциирующиеся с изгибами мембран. Так, например, белок Osh4p имеет мотив LPS (lipid-packing sensor), который может обеспечивать взаимодействие белка с искривленными мембранами [79]; домены C2 белков SYT млекопитающих могут стимулировать  $Ca^{2+}$ -зависимый локальный изгиб мембраны [80]. Можно предположить, что AtSYT1, локализующийся в плазмодесмах и содержащий два домена C2 [25], преимущественно ассоциируется с положительно изогнутыми концевыми участками плазмодесм, а C2-мотивы, связывая конические липиды, такие, как PIP, усиливают их кластеризацию во внутреннем слое мембраны и вызывают перестройку мембранных структур [1].

Кроме растительных белков МСТР и синаптоагминов, описанных выше, стоит отметить также липид-транспортирующие белки (LTP, lipid transfer proteins), которые осуществляют транспорт липидов и в ряде случаев сами могут являться связующими элементами МК [81]. Многие белки LTP содержат определенные комбинации доменов, что, возможно, обеспечивает их точную адресацию к зонам тех или иных МК [5]. Часто встречающимися типами доменов LTP являются домены C2 и PH (pleckstrin homology) [82], которые взаимодействуют с отрицательно заряженными липидами. Кроме того, некоторые домены LTP содержат мотив ALPS (ArfGAP1 lipid-packing sensor), способный связываться с сильно искривленными мембранами [83].

Заряд полярных групп липидов является еще одним важным фактором, влияющим на разделение мембран на различные функциональные зоны. Основной группой отрицательно заряженных липидов, которые определяют электростатические характеристики внутреннего слоя ПМ, являются фосфатидилинозитол-4-фосфат PI(4)P и фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат PI(4,5)P<sub>2</sub> [84, 85]. Недавние исследования показывают, что, по-видимому, электростатическое поле мембраны регулируется сочетанием нескольких типов анионных липидов (фосфатидная кислота (PA), PI(4)P и PS) [86]. Это комбинирование создает специфические заряды в различных зонах мембраны и позволяет обеспечить локализацию в этих зонах катионных белков, таких как регулятор транспорта brassinостероидов BK11 (BR11 KINASE INHIBITOR1) или AGC-киназы PINOID и

D6PK (D6-PROTEIN KINASE) [85, 86]. Зоны МК характеризуются повышенной концентрацией анионных липидов, что указывает на их роль в поддержании и функционировании этих структур, возможно, связанную со взаимодействием таких липидов с компонентами МК [11]. На сегодняшний день неизвестно, какие виды фосфатидилинозитол фосфатов (PIP) ассоциированы с плазмодесмами. Однако существование белков плазмодесм, имеющих C2-домены, таких, как SYT1 и QUIRKY, позволяет предположить, что PI(4)P и PI(4,5)P<sub>2</sub> декорируют ПМ в этих каналах [7, 47].

При рассмотрении взаимодействий между анионными липидами и различными белками следует учитывать влияние таких факторов, как локальные модификации липидов, pH, а также градиентные и локальные концентрации ионов, которые влияют на электростатический профиль мембраны [11]. Так, зоны МК являются сайтами передачи  $Ca^{2+}$  сигналов, и  $Ca^{2+}$  модулирует функционирование E-Syt1 [87]. Однако, с другой стороны, ионы  $Ca^{2+}$  могут экранировать полярные группы PIP, тем самым препятствуя связыванию белков и липидов в этих областях [88]. В недавних исследованиях показано, что локальные колебания в концентрации бивалентных катионов влияют на форму мембран, содержащих анионные липиды, из-за того, что ионные взаимодействия приводят к кластеризации PS и PI(4,5)P<sub>2</sub>, что, в свою очередь, вызывает возникновение кривизны липидного бислоя [89]. Эти и другие изменения в микроокружении элементов МК, связывающих две мембраны, влияют на их структурные модификации, что позволяет инициировать и передать сигнал на уровне МК в целом за счет сокращения расстояния между мембранами, обмена молекулами липидов, сборки или разборки белковых комплексов [87].

Важную роль в функционировании МК играет липидный обмен. При этом белки LTP связываются с анионными липидами мембран и производят перенос определенных молекул липидов от донорной мембраны к акцепторной, экранируя липиды от водного окружения с помощью транспортных доменов [90]. В частности, было показано, что белки OSBP и ORP/Osh (OSBP-Related Proteins) в зонах МК взаимодействуют с белками VAP для обеспечения обмена молекулами стеролов, PS и PIP между ЭПР и плазмалеммой [91]. Osh4 использует дисбаланс в распределении PI(4)P, возникающий в результате работы фосфатазы Sac1p, для обмена PI(4)P из транс-цистерн аппарата Гольджи на молекулы стеролов ЭПР, тем самым обогащая мембраны транс-АГ стеролами и поддерживая пул

PI(4)P в мембранах ЭПР [79]. Еще одним примером регуляции липидного состава является перенос PS от мембраны ЭПР к плазмалемме в обмен на PI(4)P и PI(4,5)P<sub>2</sub>, переносимые из плазмалеммы к ЭПР [92, 93], который обеспечивается белками ORP5/8. Интересно, что поддержание пула PI(4)P в мембранах ЭПР связано с белком CERT, который обеспечивает перенос сфинголипидов к мембранам транс-цистерн АГ [94]. Следует отметить, что некоторые белки E-Syt млекопитающих, например, E-Syt2, вероятно, участвуют в транспорте липидов за счет образования липидных туннелей с помощью SMP-доменов [36].

Липидный обмен в зонах МК формирует специфичность мембран и позволяет создавать липидные градиенты, необходимые для работы различных молекулярных механизмов [78, 91, 94]. Хотя наличие липидного обмена в плазмодесмах не установлено окончательно, этот процесс мог бы иметь большое значение для их функционирования, учитывая, что из-за значительной длины этих каналов, особенно в зрелых тканях, доставка везикул вглубь плазмодесм может быть сильно затруднена [11]. Кроме того, регулируемый перенос липидов позволял бы регулировать форму мембран, поскольку ассиметричное распределение липидов конической формы между двумя слоями мембраны может вызвать ее искривление независимо от эффекта интегрированных белков [95].

### ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕМ МК И КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКОЙ

В последние годы появляются данные, которые указывают на области МК между ЭПР и плазмалеммой как на часть интегрированной системы «ЭПР–плазмалемма–клеточная стенка». Например, отсутствие клеточной стенки влияет на мобильность VAR27 в зонах МК [6, 40]. Элементы внеклеточного матрикса взаимодействуют с белками и липидами ПМ, ограничивая их латеральную подвижность и стабилизируя микродомены плазмалеммы. Подобные взаимодействия в зонах МК, вероятно, позволяют также стабилизировать структуру кортикального ЭПР и интегрировать сигналы, поступающие от его компарментов и клеточной стенки [43]. Можно предположить, что эти процессы играют важную роль в функционировании плазмодесм, поскольку в этих структурах ПМ и клеточная стенка тесно контактируют между собой.

МК в плазмодесмах, вероятнее всего, могут напрямую определять их пропускную способ-

ность (SEL, size-exclusion limit). Существующие на данный момент модели предполагают, что SEL зависит от физических характеристик цитоплазматического рукава, основным регулятором которых является β-1,3-глюкан каллоза: многочисленные исследования показывают, что каллозо-опосредованное изменение SEL плазмодесм происходит в ответ на широкий спектр сигналов развития и биотических/абиотических стимулов [96, 97]. Откладывание и удаление каллозы во внеклеточном матриксе, окружающем плазмодесму, вызывает сближение или расхождение плазмалеммы и десмотрубочки, тем самым влияя на объем цитоплазматического рукава и определяя SEL. Однако данные, полученные в последние годы, свидетельствуют о том, что регуляция проводимости плазмодесм значительно сложнее и, по-видимому, связана в первую очередь не с собственно их архитектурой, а с изменением их молекулярного состава [1].

Уровень отложения каллозы определяется работой трансмембранных каллозо-синтазных комплексов и β-1,3-глюканазы, заякоренных в мембране и обращенных основной частью в апопласт. Было показано, что фенотипы растений, мутантных по синтезу стеролов и каллозо-синтазным комплексам, сходны между собой [98]. На основании этого исследователи выдвинули гипотезу, согласно которой в обмене каллозы в плазмодесмах играют роль структурные стеролы. Следует учесть, что сайт-специфичное отложение каллозы в краевых участках плазмодесм означает, что ферменты, участвующие в этом процессе, должны адресно доставляться в определенные субдомены ПМ. Это тоже может служить аргументом в пользу взаимосвязи между каллозным обменом и регуляцией липидного состава мембраны [10, 98].

Было обнаружено, что в клетках меристемы перед удалением каллозных пробок в районе плазмодесм наблюдается транспорт липидных телец, являющихся производными ЭПР, которые располагаются в местах входа в плазмодесму и содержат β-1,3-глюканазы. Можно предположить, что эти ферменты встраиваются в ПМ в обход секреторного пути, вероятно, взаимодействуя с липидными микродоменами ее внутреннего слоя. Этот механизм мог бы обеспечивать доставку к плазмодесмам и других их компонентов [99].

Отложение каллозы в области плазмодесм регулируется целым рядом различных белков. Синтез каллозы индуцируется в ответ на активацию рецепторов LYM2 и FLS2, локализованных в плазмодесмах, а также рецептор-подобных белков PDLP [22, 100, 101]. Кроме того, каллозный обмен регулируется GPI-заякоренными

белками PDCB, что также указывает на роль липидного состава мембраны в регуляции SEL. Белки PDCB не имеют энзиматической активности, но могут связываться с каллозой через X8-домен [20]. Было показано, что PDCB1 риза совместно с белком группы 6 семейства реморин-ов регулируют проводимость плазмодесм, за-действуя отложение каллозы [102], и что реморин группы 1 в листьях *Nicotiana benthamiana* влияет на вирусный транспорт, по-видимому, являясь негативным регулятором SEL [103].

Интересно отметить, что сигналом локализации в плазмодесмах двух белков метаболизма каллозы,  $\beta$ -1,3-глюканазы BG<sub>par</sub> и PDCB1, является GPI, имеющий сродство к Lo-микро-доменам мембраны [104]. В соответствии с этими данными изменение биосинтеза стеролов влияет на распределение GPI-заякоренных белков в плазмодесмах при делении клеток и, как следствие, на отложение каллозы и пропускную способность плазмодесм [64] (рисунок).

Следует отметить, что в ряде случаев процессы отложения каллозы могут регулироваться белками, которые перемещаются к плазмодесмам в ответ на различные стрессы. Так, недавно предложенная модель изменения SEL при солевом стрессе постулирует, что повышенные концентрации соли индуцируют кальциевый сигнал, который, в свою очередь, активирует фосфолипазу PLD $\alpha$ 1 и вызывает ее перераспределение из цитоплазмы к ПМ; это, в свою очередь, приводит к образованию PA и изменению свойств мембраны. В результате рецептор-подобная киназа CRK2, в норме локализующаяся в ПМ, мобилизуется к определенным доменам плазмодесм и там взаимодействует с каллозо-синтазой CALS1. Это приводит к отложению каллозы и повышает устойчивость растения к солевому стрессу [22]. Мобилизация к плазмодесмам в ответ на осмотический стресс была показана и для рецептор-подобных киназ QSK1 (Qiān Shou Kinase) и IMK2 (Inflorescence Meristem Kinase2). Обработка клеток маннитолом, вызывающая осмотический стресс, приводила к фосфорилированию QSK1 и стремительному перераспределению этих белков. В результате потеря функции QSK1 вызывала замедленное развитие боковых корней у *Arabidopsis thaliana* и повышенную чувствительность к осмотическому стрессу, а также снижение уровня отложения каллозы в плазмодесмах [21].

Контроль SEL может осуществляться и другими путями, не связанными с каллозным обменом. Так, показано, что внеклеточный матрикс, в котором пролегают плазмодесмы, отличается пониженным содержанием целлюлозы и обога-

щен пектиновыми полисахаридами, которые образуют гидрированный гель, облегчающий создание новых каналов в этой области клеточной стенки [105]. Модификация пектинов влияет на жесткость клеточной стенки, а для плазмодесм была показана активность пектин-метил-эстеразы и пектиназы [106, 107], что, очевидно, связано с локальным изменением свойств клеточной стенки при осцилляции пор плазмодесм [1]. В протеоме плазмодесм был также обнаружен ряд других белков, участвующих в росте и модификации клеточной стенки [17].

Важную роль в регуляции проводимости плазмодесм играет передача Ca<sup>2+</sup>-сигналов. Было показано, что около плазмодесм локализуются белки ЭПР из семейства кальретикулинов, обладающие Ca<sup>2+</sup>-связывающей активностью [108] и, кроме того, накопление активных форм кислорода, вызывающее отложение каллозы в клеточной стенке, индуцирует всплеск уровня Ca<sup>2+</sup> в цитозоле [109, 110]. Наконец, закупоривание ситовидных элементов флоэмы при атаке патогена, по-видимому, связано с локальным возрастанием концентрации Ca<sup>2+</sup> около ситовидных пластинок и в области плазмодесм, соединяющих ситовидные элементы с клетками-спутницами [45]. Поскольку десмотрубочка может выступать резервуаром Ca<sup>2+</sup> в этих процессах, можно представить, что Ca<sup>2+</sup>-каналы плазмалеммы и ЭПР могут действовать скоординировано, локализуясь в зонах МК плазмодесм [1].

Согласно одной из моделей рецептор-индуцированного сигнала Ca<sup>2+</sup> в зонах МК между ЭПР и плазмалеммой, повышение уровня Ca<sup>2+</sup> вызывает расширение области МК и последующее привлечение белка Nir2, участвующего в переносе PI из мембраны ЭПР к плазмалемме [29]. Этот перенос обеспечивает индукцию локального сигнала за счет образования инозитол-трифосфата (IP3). Кроме того, как уже обсуждалось выше, ионы кальция, наряду с анионными липидами, могут влиять на функционирование связующих элементов в зонах МК: индуцированное изменение конформации белков может вызывать сокращение или увеличение цитозольного пространства между мембранами, тем самым изменяя пропускную способность плазмодесм (рисунок). Кроме того, структура МК и, соответственно, значение SEL может изменяться при перераспределении связующих элементов. Совокупность этих процессов, вероятно, обеспечивает динамичную перестройку плазмодесм в процессе их функционирования [1], а также контроль межклеточного транспорта. В совокупности это указывает на плазмодесмы как на крайне важные узлы сигнальных путей в растительных клетках.

### УЧАСТИЕ ОБЛАСТЕЙ МК В РАЗВИТИИ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Плазмодесмы являются единственным путем межклеточного транспорта вирусной инфекции в растении. Транспортные белки вирусов обеспечивают достаточную пропускную способность этих каналов и транслокацию вирусного генома по их цитоплазматическому рукаву. Вирусы также взаимодействуют с зонами МК и на другой стадии инфекции: РНК-вирусы реплицируются на значительно модифицированных внутриклеточных мембранах хозяина, образуя сложные «вирусные фабрики», содержащие плотно состыкованные, сетеподобные или изогнутые мембранные структуры [111]. Связующие белки МК могут быть вовлечены в образование этих «фабрик». Так, например, вирус кустистой карликовости томата (*Tomato bushy stunt virus*) при репликации в клетках дрожжей и растений мобилизует белок дрожжей Scs2 и его растительный гомолог VAP27-3, а также участвующие в липидном обмене белки ORP1 дрожжей и ORP3 растений, чтобы индуцировать пролиферацию мембран в сайтах синтеза вирусной РНК [6, 112]. Интересно, что, по-видимому, в ряде случаев взаимодействие вирусов с компонентами МК для транспорта и для репликации может быть функционально связано: некоторые вирусы создают сайты репликации на модифицированных мембранах непосредственно у входа в плазмодесмы [7, 113]. До сих пор неясно, требуется ли это всего лишь для большей скорости и эффективности межклеточного транспорта вирусных рибонуклеопротеидов или необходимо непосредственно для модификации и открытия каналов плазмодесм. Однако тот факт, что SYT1 необходим для транспорта ряда вирусов и при инфекции перемещается к плазмодесмам [7], говорит в пользу второго предположения.

Растительные клетки препятствуют вирусному транспорту с помощью индукции отложений каллозы в клеточных стенках вокруг плазмо-

десм; транспортные белки вирусов, в свою очередь, взаимодействуют с клеточными факторами, которые ингибируют эти процессы [1, 114, 115]. Эти наблюдения также указывают на взаимосвязь между развитием вирусной инфекции и изменением в работе плазмодесм на уровне липидных и белковых систем, в частности, на уровне МК.

Накопление знаний о плазмодесмах, длившееся десятилетиями, привело к пониманию того, что внутренняя структура плазмодесм имеет характерные черты МК между ПМ и ЭПР. Развитие этих представлений позволило уйти от механистического понимания плазмодесм как межклеточных каналов, пропускная способность которых определяется несколькими простыми факторами, и создало концептуальную базу для дальнейших функциональных исследований плазмодесм как сложных, многокомпонентных систем, интегрирующих черты МК, специализированных мембранных микродоменов и связанных с этими структурами функционально обособленных районов клеточной стенки. Полученные к настоящему дню данные показывают, что МК в составе плазмодесм представляют собой динамические структуры, вносящие важный вклад в регулирование пропускной способности плазмодесм. Дальнейшее изучение компонентов МК в составе плазмодесм, а также молекулярных механизмов функционирования этих структур и способов их регуляции приближает нас к пониманию общих механизмов межклеточной коммуникации в растениях.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-14-01032).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Данная статья не содержит исследований, в которых в качестве объектов использовали людей или животных.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tilsner, J., Nicolas, W., Rosado, A., and Bayer, E. M. (2016) Staying tight: plasmodesmal membrane contact sites and the control of cell-to-cell connectivity in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **67**, 23.1-23.28, doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-111840.
2. Prinz, W. A., Toulmay, A., and Balla, T. (2020) The functional universe of membrane contact sites, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 7-24, doi: 10.1038/s41580-019-0180-9.
3. Alpy, F., Rousseau, A., Schwab, Y., Legueux, F., Stoll, I., Wendling, C., Spiegelhalter, C., Kessler, P., Mathelin, C., Rio, M. C., Levine, T. P., and Tomasetto, C. (2013) STARD3/STARD3NL and VAP make a novel molecular tether between late endosomes and the ER, *J. Cell Sci.*, **126**, 5500-5512, doi: 10.1242/jcs.139295.
4. Iwasawa, R., Mahul-Mellier, A. L., Datler, C., Pazarentzos, E., and Grimm, S. (2011) Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction, *EMBO J.*, **30**, 556-568, doi: 10.1038/emboj.2010.346.
5. Hanada, K. (2018) Lipid transfer proteins rectify inter-organelle flux and accurately deliver lipids at membrane contact sites, *J. Lipid Res.*, **59**, 1341-1366, doi: 10.1194/jlr.R085324.

6. Wang, P., Richardson, C., Hawkins, T. J., Sparkes, I., Hawes, C., and Hussey, P. J. (2016) Plant VAP27 proteins: domain characterization, intracellular localization and role in plant development, *New Phytol.*, **210**, 1311-1326, doi: 10.1111/nph.13857.
7. Levy, A., Zheng, J. Y., and Lazarowitz, S. G. (2015) Synaptotagmin SYTA forms ER-plasma membrane junctions that are recruited to plasmodesmata for plant virus movement, *Curr. Biol.*, **25**, 2018-2025, doi: 10.1016/j.cub.2015.06.015.
8. Liu, L., and Li, J. (2019) Communications between the endoplasmic reticulum and other organelles during abiotic stress response in plants, *Front. Plant Sci.*, **10**, 749, doi: 10.3389/fpls.2019.00749.
9. Michaud, M., and Jouhet, J. (2019) Lipid trafficking at membrane contact sites during plant development and stress response, *Front. Plant Sci.*, **10**, 2, doi: 10.3389/fpls.2019.00002.
10. Bayer, E. M., Mongrand, S., and Tilsner, J. (2014) Specialized membrane domains of plasmodesmata, plant intercellular nanopores, *Front. Plant Sci.*, **5**, 507, doi: 10.3389/fpls.2014.00507.
11. Petit, J. D., Immel, F., Lins, L., and Bayer, E. M. (2019) Lipids or proteins: who is leading the dance at membrane contact sites, *Front. Plant Sci.*, **10**, 198, doi: 10.3389/fpls.2019.00198.
12. Ding, B., Turgeon, R., and Parthasarathy, M. V. (1992) Substructure of freeze-substituted plasmodesmata, *Protoplasma*, **169**, 28-41, doi: 10.1007/BF01343367.
13. Nicolas, W. J., Grison, M. S., Tréput, S., Gaston, A., Fouché, M., Cordelières, F. P., Oparka, K., Tilsner, J., Brocard, L., and Bayer, E. M. (2017) Architecture and permeability of post-cytokinesis plasmodesmata lacking cytoplasmic sleeves, *Nat. Plants*, **3**, 17082, doi: 10.1038/nplants.2017.82.
14. Faulkner, C., and Maule, A. (2011) Opportunities and successes in the search for plasmodesmal proteins, *Protoplasma*, **248**, 27-38, doi: 10.1007/s00709-010-0213-x.
15. Salmon, M. S., and Bayer, E. M. F. (2013) Dissecting plasmodesmata molecular composition by mass spectrometry-based proteomics, *Front. Plant Sci.*, **3**, 307, doi: 10.3389/fpls.2012.00307.
16. Kraner, M. E., Müller, C., and Sonnewald, U. (2017) Comparative proteomic profiling of the Choline transporter-like1 (CHER1) mutant provides insights into plasmodesmata composition of fully developed *Arabidopsis thaliana* leaves, *Plant J.*, **92**, 696-709, doi: 10.1111/tpj.13702.
17. Fernandez-Calvino, L., Faulkner, C., Walshaw, J., Saalbach, G., Bayer, E., Benitez-Alfonso, Y., and Maule, A. (2011) *Arabidopsis* plasmodesmal proteome, *PLoS One.*, **6**, e18880, doi: 10.1371/journal.pone.0018880.
18. Thomas, C. L., Bayer, E. M., Ritzenthaler, C., Fernandez-Calvino, L., and Maule, A. J. (2008) Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication, *PLoS Biol.*, **6**, e7, doi: 10.1371/journal.pbio.0060007.
19. Kim, H., Kwon, H., Kim, S., Kim, M. K., Botella, M. A., Yun, H. S., and Kwon, C. (2016) Synaptotagmin 1 negatively controls the two distinct immune secretory pathways to powdery mildew fungi in *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiol.*, **57**, 1133-1141, doi: 10.1093/pcp/pcw061.
20. Simpson, C., Thomas, C., Findlay, K., Bayer, E., and Maule, A. J. (2009) An *Arabidopsis* GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking, *Plant Cell.*, **21**, 581-594, doi: 10.1105/tpc.108.060145.
21. Grison, M. S., Kirk, P., Brault, M. L., Wu, X. N., Schulze, W. X., Benitez-Alfonso, Y., Immel, F., and Bayer, E. M. (2019) Plasma membrane-associated receptor-like kinases relocalize to plasmodesmata in response to osmotic stress, *Plant Physiol.*, **181**, 142-160, doi: 10.1104/pp.19.00473.
22. Hunter, K., Kimura, S., Rokka, A., Tran, H. C., Toyota, M., Kukkonen, J. P., and Wrzaczek, M. (2019) CRK2 Enhances salt tolerance by regulating callose deposition in connection with PLD $\alpha$ 1, *Plant Physiol.*, **180**, 2004-2021, doi: 10.1104/pp.19.00560.
23. Ham, B. K., Li, G., Kang, B. H., Zeng, F., and Lucas, W. J. (2012) Overexpression of *Arabidopsis* plasmodesmata germin-like proteins disrupts root growth and development, *Plant Cell*, **24**, 3630-3648, doi: 10.1105/tpc.112.101063.
24. Knox, K., Wang, P., Kriechbaumer, V., Tilsner, J., Frigerio, L., Sparkes, I., Hawes, C., and Oparka, K. (2015) Putting the squeeze on plasmodesmata: a role for reticulons in primary plasmodesmata formation, *Plant Physiol.*, **168**, 1563-1572, doi: 10.1104/pp.15.00668.
25. Pérez-Sancho, J., Vanneste, S., Lee, E., McFarlane, H. E., Esteban Del Valle, A., Valpuesta, V., Friml, J., Botella, M. A., and Rosado, A. (2015) The *Arabidopsis* synaptotagmin1 is enriched in endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites and confers cellular resistance to mechanical stresses, *Plant Physiol.*, **168**, 132-143, doi: 10.1104/pp.15.00260.
26. Brault, M. L., Petit, J. D., Immel, F., Nicolas, W. J., Glavier, M., Brocard, L., Gaston, A., Fouché, M., Hawkins, T. J., Crowet, J. M., Grison, M. S., Germain, V., Rocher, M., Kraner, M., Alva, V., Claverol, S., Paterlini, A., Helariutta, Y., Deleu, M., Lins, L., Tilsner, J., and Bayer, E. M. (2019) Multiple C2 domains and transmembrane region proteins (MCTPs) tether membranes at plasmodesmata, *EMBO Rep.*, **20**, e47182, doi: 10.15252/embr.201847182.
27. Wang, P., Hawkins, T. J., Richardson, C., Cummins, I., Deeks, M. J., Sparkes, I., Hawes, C., and Hussey, P. J. (2014) The plant cytoskeleton, NET3C, and VAP27 mediate the link between the plasma membrane and endoplasmic reticulum, *Curr. Biol.*, **24**, 1397-1405, doi: 10.1016/j.cub.2014.05.003.
28. Kagiwada, S., and Hashimoto, M. (2007) The yeast VAP homolog Scs2p has a phosphoinositide-binding ability that is correlated with its activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **364**, 870-876, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.10.079.
29. Chang, C. L., Hsieh, T. S., Yang, T. T., Rothberg, K. G., Azizoglu, D. B., Volk, E., Liao, J. C., and Liou, J. (2013) Feedback regulation of receptor-induced Ca<sup>2+</sup> signaling mediated by E-Syt1 and Nir2 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions, *Cell Rep.*, **5**, 813-825, doi: 10.1016/j.celrep.2013.09.038.
30. Murphy, S. E., and Levine, T. P. (2016) VAP, a versatile access point for the endoplasmic reticulum: review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 952-961, doi: 10.1016/j.bbali.2016.02.009.
31. Kriechbaumer, V., Botchway, S. W., Slade, S. E., Knox, K., Frigerio, L., Oparka, K., and Hawes, C. (2015) Reticulomics: protein-protein interaction studies with two plasmodesmata-localized reticulon family proteins identify binding partners enriched at plasmodesmata, endoplasmic reticulum, and the plasma membrane, *Plant Physiol.*, **169**, 1933-1945, doi: 10.1104/pp.15.01153.
32. Deeks, M. J., Calcutt, J. R., Ingle, E. K., Hawkins, T. J., Chapman, S., Richardson, A. C., Mentlak, D. A., Dixon, M. R., Cartwright, F., Smertenko, A. P., Oparka, K., and Hussey, P. J. (2012) A superfamily of actin-binding proteins at the actin-membrane nexus of higher plants, *Curr. Biol.*, **22**, 1595-1600, doi: 10.1016/j.cub.2012.06.041.

33. Siao, W., Wang, P., Voigt, B., Hussey, P. J., and Baluska, F. (2016) Arabidopsis SYT1 maintains stability of cortical endoplasmic reticulum networks and VAP27-1-enriched endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites, *J. Exp. Bot.*, **67**, 6161-6171, doi: 10.1093/jxb/erw381.
34. Ishikawa, K., Tamura, K., Fukao, Y., and Shimada, T. (2019) Structural and functional relationships between plasmodesmata and plant endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites consisting of three synaptotagmins, *New Phytol.*, doi: 10.1111/nph.16391.
35. Fernández-Busnadiego, R., Saheki, Y., and De Camilli, P. (2015) Three-dimensional architecture of extended synaptotagmin-mediated endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E2004-E2013, doi: 10.1073/pnas.1503191112.
36. Schauder, C. M., Wu, X., Saheki, Y., Narayanaswamy, P., Torta, F., Wenk, M. R., De Camilli, P., and Reinisch, K. M. (2014) Structure of a lipid-bound extended synaptotagmin indicates a role in lipid transfer, *Nature*, **510**, 552-555, doi: 10.1038/nature13269.
37. Reinisch, K. M., and De Camilli, P. (2016) SMP-domain proteins at membrane contact sites: structure and function, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 924-927, doi: 10.1016/j.bbali.2015.12.003.
38. Dalal, J., Lewis, D. R., Tietz, O., Brown, E. M., Brown, C. S., Palme, K., Muday, G. K., and Sederoff, H. W. (2016) ROSY1, a novel regulator of gravitropic response is a stigmaterol binding protein, *J. Plant Physiol.*, **196-197**, 28-40, doi: 10.1016/j.jplph.2016.03.011.
39. Ho, C. M., Paciorek, T., Abrash, E., and Bergmann, D. C. (2016) Modulators of stomatal lineage signal transduction alter membrane contact sites and reveal specialization among ERECTA kinases, *Dev. Cell.*, **38**, 345-357, doi: 10.1016/j.devcel.2016.07.016.
40. Schapire, A. L., Voigt, B., Jasik, J., Rosado, A., Lopez-Cobollo, R., Menzel, D., Salinas, J., Mancuso, S., Valpuesta, V., Baluska, F., and Botella, M. A. (2008) Arabidopsis synaptotagmin 1 is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability, *Plant Cell*, **20**, 3374-3388, doi: 10.1105/tpc.108.063859.
41. Yamazaki, T., Kawamura, Y., Minami, A., and Uemura, M. (2008) Calcium-dependent freezing tolerance in Arabidopsis involves membrane resealing via synaptotagmin SYT1, *Plant Cell*, **20**, 3389-3404, doi: 10.1105/tpc.108.062679.
42. Dickson, E. J., Jensen, J. B., and Hille, B. (2016) Regulation of calcium and phosphoinositides at endoplasmic reticulum-membrane junctions, *Biochem. Soc. Trans.*, **44**, 467-473, doi: 10.1042/BST20150262.
43. Bayer, E. M., Sparkes, I., Vanneste, S., and Rosado, A. (2017) From shaping organelles to signalling platforms: the emerging functions of plant ER-PM contact sites, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **40**, 89-96, doi: 10.1016/j.pbi.2017.08.006.
44. Held, K., Pascaud, F., Eckert, C., Gajdanowicz, P., Hashimoto, K., Corratgé-Faillie, C., Offenborn, J. N., Lacombe, B., Dreyer, I., Thibaud, J. B., and Kudla, J. (2011) Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex, *Cell Res.*, **21**, 1116-1130, doi: 10.1038/cr.2011.50.
45. Musetti, R., Buxa, S. V., De Marco, F., Loschi, A., Polizzotto, R., Kogel, K. H., and van Bel, A. J. (2013) Phytoplasma-triggered Ca<sup>2+</sup> influx is involved in sieve-tube blockage, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **26**, 379-386, doi: 10.1094/MPMI-08-12-0207-R.
46. Liu, L., Liu, C., Hou, X., Xi, W., Shen, L., Tao, Z., Wang, Y., and Yu, H. (2012) FTIP1 is an essential regulator required for florigen transport, *PLoS Biol.*, **10**, e1001313, doi: 10.1371/journal.pbio.1001313.
47. Vaddepalli, P., Herrmann, A., Fulton, L., Oelschner, M., Hillmer, S., Stratil, T. F., Fastner, A., Hammes, U. Z., Ott, T., Robinson, D. G., and Schneitz, K. (2014) The C2-domain protein QUIRKY and the receptor-like kinase STRUBBELIG localize to plasmodesmata and mediate tissue morphogenesis in Arabidopsis thaliana, *Development*, **141**, 4139-4148, doi: 10.1242/dev.113878.
48. Liu, L., Li, C., Song, S., Teo, Z. W. N., Shen, L., Wang, Y., Jackson, D., and Yu, H. (2018) FTIP-dependent STM trafficking regulates shoot meristem development in Arabidopsis, *Cell Rep.*, **23**, 1879-1890, doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.033.
49. Robyn L. Overall, R. L., and Blackman, L. M. (1996) A model of the macromolecular structure of plasmodesmata, *Trends Plant Sci.*, **1**, 307-311, doi: 10.1016/S1360-1385(96)88177-0.
50. Knight, A. E., and Kendrick-Jones, J. (1993) A myosin-like protein from a higher plant. *J. Mol. Biol.*, **231**, 148-154, doi: 10.1006/jmbi.1993.1266.
51. Haraguchi, T., Tominaga, M., Matsumoto, R., Sato, K., Nakano, A., Yamamoto, K., and Ito, K. (2014) Molecular characterization and subcellular localization of Arabidopsis class VIII myosin, ATM1, *J. Biol. Chem.*, **289**, 12343-12355, doi: 10.1074/jbc.M113.521716.
52. Su, S., Liu, Z., Chen, C., Zhang, Y., Wang, X., Zhu, L., Miao, L., Wang, X. C., and Yuan, M. (2010) Cucumber mosaic virus movement protein severs actin filaments to increase the plasmodesmal size exclusion limit in tobacco, *Plant Cell*, **22**, 1373-1387, doi: 10.1105/tpc.108.064212.
53. Amari, K., Di Donato, M., Dolja, V. V., and Heinlein, M. (2014) Myosins VIII and XI play distinct roles in reproduction and transport of tobacco mosaic virus, *PLoS Pathog.*, **10**, e1004448, doi: 10.1371/journal.ppat.1004448.
54. Van Vliet, A. R., Giordano, F., Gerlo, S., Segura, I., Van Eygen, S., Molenberghs, G., Rocha, S., Houcine, A., Derua, R., Verfaillie, T., Vangindertael, J., De Keersmaecker, H., Waelkens, E., Tavernier, J., Hofkens, J., Annaert, W., Carmeliet, P., Samali, A., Mizuno, H., and Agostinis, P. (2017) The ER stress sensor PERK coordinates ER-plasma membrane contact site formation through interaction with filamin-A and F-actin remodeling, *Mol. Cell*, **65**, 885-899, doi: 10.1016/j.molcel.2017.01.020.
55. Hepler, P. K. (2016) The Cytoskeleton and its regulation by calcium and protons, *Plant Physiol.*, **170**, 3-22, doi: 10.1104/pp.15.01506.
56. Bürstenbinder, K., Möller, B., Plötner, R., Stamm, G., Hause, G., Mitra, D., and Abel, S. (2017) The IQD family of calmodulin-binding proteins links calcium signaling to microtubules, membrane subdomains, and the nucleus, *Plant Physiol.*, **173**, 1692-1708, doi: 10.1104/pp.16.01743.
57. Pankratenko, A. V., Atabekova, A. K., Lazareva, E. A., Baksheeva, V. E., Zhironkina, O. A., Zernii, E. Y., Owens, R. A., Solovyev, A. G., and Morozov, S. Y. (2017) Plant-specific 4/1 polypeptide interacts with an endoplasmic reticulum protein related to human BAP31, *Planta*, **245**, 193-205, doi: 10.1007/s00425-016-2601-8.
58. Makarova, S. S., Minina, E. A., Makarov, V. V., Semenyuk, P. I., Kopertekh, L., Schiemann, J., Serebryakova, M. V., Erokhina, T. N., Solovyev, A. G., and Morozov, S. Y. (2011) Orthologues of a plant-specific At-4/1 gene in the genus Nicotiana and the structural properties of bacterially expressed 4/1 protein, *Biochimie*, **93**, 1770-1778, doi: 10.1016/j.biochi.2011.06.018.

59. Solovyev, A. G., Minina, E. A., Makarova, S. S., Erokhina, T. N., Makarov, V. V., Kaplan, I. B., Kopertekh, L., Schiemann, J., Richert-Pöggeler, K. R., and Morozov, S. Y. (2013) Subcellular localization and self-interaction of plant-specific Nt-4/1 protein, *Biochimie*, **95**, 1360-1370, doi: 10.1016/j.biochi.2013.02.015.
60. Morozov, S. Y., Makarova, S. S., Erokhina, T. N., Kopertekh, L., Schiemann, J., Owens, R. A., and Solovyev, A. G. (2014) Plant 4/1 protein: potential player in intracellular, cell-to-cell and long-distance signaling, *Front. Plant Sci.*, **5**, 26, doi: 10.3389/fpls.2014.00026.
61. Atabekova, A. K., Lazareva, E. A., Strelkova, O. S., Solovyev, A. G., and Morozov, S. Y. (2018) Mechanical stress-induced subcellular re-localization of N-terminally truncated tobacco Nt-4/1 protein, *Biochimie*, **144**, 98-107, doi: 10.1016/j.biochi.2017.10.020.
62. Atabekova, A. K., Pankratenko, A. V., Makarova, S. S., Lazareva, E. A., Owens, R. A., Solovyev, A. G., and Morozov, S. Y. (2017) Phylogenetic and functional analyses of a plant protein related to human B-cell receptor-associated proteins, *Biochimie*, **132**, 28-37, doi: 10.1016/j.biochi.2016.10.009.
63. Müller, M., Richter, K., Heuck, A., Kremmer, E., Buchner, J., Jansen, R. P., and Niessing, D. (2009) Formation of She2p tetramers is required for mRNA binding, mRNP assembly, and localization, *RNA*, **15**, 2002-2012, doi: 10.1261/rna.1753309.
64. Grison, M. S., Brocard, L., Fouillen, L., Nicolas, W., Wewer, V., Dörmann, P., Nacir, H., Benitez-Alfonso, Y., Claverol, S., Germain, V., Boutté, Y., Mongrand, S., and Bayer, E. M. (2015) Specific membrane lipid composition is important for plasmodesmata function in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, **27**, 1228-1250, doi: 10.1105/tpc.114.135731.
65. Marsh, D. (2010) Liquid-ordered phases induced by cholesterol: a compendium of binary phase diagrams, *Biochim. Biophys. Acta*, **1798**, 688-699, doi: 10.1016/j.bbammem.2009.12.027.
66. Javanainen, M., Martinez-Seara, H., and Vattulainen, I. (2017) Nanoscale membrane domain formation driven by cholesterol, *Sci. Rep.*, **7**, 1143, doi: 10.1038/s41598-017-01247-9.
67. Dufourc, E. J. (2008) Sterols and membrane dynamics, *J. Chem. Biol.*, **1**, 63-77, doi: 10.1007/s12154-008-0010-6.
68. Milovanovic, D., Honigmann, A., Koike, S., Göttfert, F., Pähler, G., Junius, M., Müller, S., Diederichsen, U., Janshoff, A., Grubmüller, H., Risselada, H. J., Eggeling, C., Hell, S. W., van den Bogaart, G., and Jahn, R. (2015) Hydrophobic mismatch sorts SNARE proteins into distinct membrane domains, *Nat. Commun.*, **6**, 5984, doi: 10.1038/ncomms6984.
69. Leijon, F., Melzer, M., Zhou, Q., Srivastava, V., and Bulone, V. (2018) Proteomic analysis of plasmodesmata from populus cell suspension cultures in relation with callose biosynthesis, *Front. Plant Sci.*, **9**, 1681, doi: 10.3389/fpls.2018.01681.
70. De Almeida, R. F., and Joly, E. (2014) Crystallization around solid-like nanosized docks can explain the specificity, diversity, and stability of membrane microdomains, *Front. Plant Sci.*, **5**, 72, doi: 10.3389/fpls.2014.00072.
71. Gronnier, J., Germain, V., Gouguet, P., Cacas, J. L., and Mongrand, S. (2016) GIPC: Glycosyl Inositol Phospho Ceramides, the major sphingolipids on earth, *Plant Signal. Behav.*, **11**, e1152438, doi: 10.1080/15592324.2016.1152438.
72. Grosjean, K., Mongrand, S., Beney, L., Simon-Plas, F., and Gerbeau-Pissot, P. (2015) Differential effect of plant lipids on membrane organization: specificities of phytosphingolipids and phytosterols, *J. Biol. Chem.*, **290**, 5810-5825, doi: 10.1074/jbc.M114.598805.
73. Konrad, S. S., and Ott, T. (2015) Molecular principles of membrane microdomain targeting in plants, *Trends Plant Sci.*, **20**, 351-361, doi: 10.1016/j.tplants.2015.03.016.
74. Cannon, K. S., Woods, B. L., Crutchley, J. M., and Gladfelter, A. S. (2019) An amphipathic helix enables septins to sense micrometer-scale membrane curvature, *J. Cell Biol.*, **218**, 1128-1137, doi: 10.1083/jcb.201807211.
75. Baoukina, S., Ingólfsson, H. I., Marrink, S. J., and Tieleman, D. P. (2018) Curvature-induced sorting of lipids in plasma membrane tethers, *Adv. Theory Simul.*, **1**, 1800034, doi: 10.1002/adts.201800034.
76. Aimon, S., Callan-Jones, A., Berthaud, A., Pinot, M., Toombes, G. E., and Bassereau, P. (2014) Membrane shape modulates transmembrane protein distribution, *Dev. Cell*, **28**, 212-218, doi: 10.1016/j.devcel.2013.12.012.
77. Makowski, S. L., Kuna, R. S., and Field, S. J. (2019) Induction of membrane curvature by proteins involved in Golgi trafficking, *Adv. Biol. Regul.*, **75**, 100661, doi: 10.1016/j.jbior.2019.100661.
78. González-Solis, A., Cano-Ramírez, D. L., Morales-Cedillo, F., Tapia de Aquino, C., and Gavilanes-Ruiz, M. (2014) *Arabidopsis* mutants in sphingolipid synthesis as tools to understand the structure and function of membrane microdomains in plasmodesmata, *Front. Plant Sci.*, **5**, 3, doi: 10.3389/fpls.2014.00003.
79. De Saint-Jean, M., Delfosse, V., Douguet, D., Chicanne, G., Payraastre, B., Bourguet, W., Antonny, B., and Drin, G. (2011) Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers, *J. Cell Biol.*, **195**, 965-978, doi: 10.1083/jcb.201104062.
80. Martens, S., Kozlov, M. M., and McMahon, H. T. (2007) How synaptotagmin promotes membrane fusion, *Science*, **316**, 1205-1208, doi: 10.1126/science.1142614.
81. Eisenberg-Bord, M., Shai, N., Schuldiner, M., and Bohnert, M. (2016) A tether is a tether is a tether: tethering at membrane contact sites, *Dev. Cell*, **39**, 395-409, doi: 10.1016/j.devcel.2016.10.022.
82. Wong, L. H., Gatta, A. T., and Levine, T. P. (2019) Lipid transfer proteins: the lipid commute via shuttles, bridges and tubes, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 85-101, doi: 10.1038/s41580-018-0071-5.
83. Drin, G., Casella, J. F., Gautier, R., Boehmer, T., Schwartz, T. U., and Antonny, B. (2007) A general amphipathic  $\alpha$ -helical motif for sensing membrane curvature, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 138-146, doi: 10.1038/nsmb1194.
84. Simon, M. L., Platre, M. P., Assil, S., van Wijk, R., Chen, W. Y., Chory, J., Dreux, M., Munnik, T., and Jaillais, Y. (2014) A multi-colour/multi-affinity marker set to visualize phosphoinositide dynamics in *Arabidopsis*, *Plant J.*, **77**, 322-37, doi: 10.1111/tpj.12358.
85. Simon, M. L., Platre, M. P., Marquès-Bueno, M. M., Armengot, L., Stanislas, T., Bayle, V., Caillaud, M. C., and Jaillais, Y. (2016) A PtdIns(4)P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signalling in plants, *Nat. Plants*, **2**, 16089, doi: 10.1038/nplants.2016.89.
86. Platre, M. P., Noack, L. C., Doumane, M., Bayle, V., Simon, M. L. A., Maneta-Peyret, L., Fouillen, L., Stanislas, T., Armengot, L., Pejchar, P., Caillaud, M. C., Potocký, M., Copic, A., Moreau, P., and Jaillais, Y. (2018) A combinatorial lipid code shapes the electrostatic landscape of plant endomembranes, *Dev. Cell.*, **45**, 465-480, e11, doi: 10.1016/j.devcel.2018.04.011.
87. Bian, X., Saheki, Y., and De Camilli, P. (2018) Ca<sup>2+</sup> releases E-Syt1 autoinhibition to couple ER-plasma membrane

- tethering with lipid transport, *EMBO J.*, **37**, 219-234, doi: 10.15252/embj.201797359.
88. Himschoot, E., Pleskot, R., Van Damme, D., and Vanneste, S. (2017) The ins and outs of Ca<sup>2+</sup> in plant endomembrane trafficking, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **40**, 131-137, doi: 10.1016/j.pbi.2017.09.003.
  89. Graber, Z. T., Shi, Z., and Baumgart, T. (2017) Cations induce shape remodeling of negatively charged phospholipid membranes, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **19**, 15285-15295, doi: 10.1039/c7cp00718c.
  90. Lahiri, S., Toulmay, A., and Prinz, W. A. (2015) Membrane contact sites, gateways for lipid homeostasis, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **33**, 82-87, doi: 10.1016/j.ceb.2014.12.004.
  91. Olkkonen, V. M. (2015) OSBP-related protein family in lipid transport over membrane contact sites, *Lipid Insights*, **8**, 1-9, doi: 10.4137/LPI.S31726.
  92. Chung, J., Torta, F., Masai, K., Lucast, L., Czapla, H., Tanner, L. B., Narayanaswamy, P., Wenk, M. R., Nakatsu, F., and De Camilli, P. (2015) PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts, *Science*, **349**, 428-432, doi: 10.1126/science.aab1370.
  93. Ghai, R., Du, X., Wang, H., Dong, J., Ferguson, C., Brown, A. J., Parton, R. G., Wu, J. W., and Yang, H. (2017) ORP5 and ORP8 bind phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) and regulate its level at the plasma membrane, *Nat. Commun.*, **8**, 757, doi: 10.1038/s41467-017-00861-5.
  94. Yamaji, T., Kumagai, K., Tomishige, N., and Hanada, K. (2008) Two sphingolipid transfer proteins, CERT and FAPP2: their roles in sphingolipid metabolism, *IUBMB Life*, **60**, 511-518, doi: 10.1002/iub.83.
  95. McMahon, H. T., and Boucrot, E. (2015) Membrane curvature at a glance, *J. Cell Sci.*, **128**, 1065-1070, doi: 10.1242/jcs.114454.
  96. Sager, R., and Lee, J. Y. (2014) Plasmodesmata in integrated cell signalling: insights from development and environmental signals and stresses, *J. Exp. Bot.*, **65**, 6337-6358, doi: 10.1093/jxb/eru365.
  97. Dorokhov, Y. L., Ershova, N. M., Sheshukova, E. V., and Komarova, T. V. (2019) The role of plasmodesmata-associated receptor in plant development and environmental response, *Plants (Basel)*, **8**, E595, doi: 10.3390/plants8120595.
  98. De Storme, N., and Geelen, D. (2014) Callose homeostasis at plasmodesmata: molecular regulators and developmental relevance, *Front Plant Sci.*, **5**, 138, doi: 10.3389/fpls.2014.00138.
  99. Paul, L. K., Rinne, P. L., and van der Schoot, C. (2014) Refurbishing the plasmodesmal chamber: a role for lipid bodies, *Front. Plant Sci.*, **5**, 40, doi: 10.3389/fpls.2014.00040.
  100. Lee, J. Y., Wang, X., Cui, W., Sager, R., Modla, S., Czymbek, K., Zybaliov, B., van Wijk, K., Zhang, C., Lu, H., and Lakshmanan, V. (2011) A plasmodesmata-localized protein mediates crosstalk between cell-to-cell communication and innate immunity in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, **23**, 3353-3373, doi: 10.1105/tpc.111.087742.
  101. Wang, X., Sager, R., Cui, W., Zhang, C., Lu, H., and Lee, J. Y. (2013) Salicylic acid regulates plasmodesmata closure during innate immune responses in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, **25**, 2315-2329, doi: 10.1105/tpc.113.110676.
  102. Gui, J., Liu, C., Shen, J., and Li, L. (2014) Grain setting defect1, encoding a remorin protein, affects the grain setting in rice through regulating plasmodesmatal conductance, *Plant Physiol.*, **166**, 1463-1478, doi: 10.1104/pp.114.246769.
  103. Perraki, A., Binaghi, M., Mecchia, M. A., Gronnier, J., German-Retana, S., Mongrand, S., Bayer, E., Zelada, A. M., and Germain, V. (2014) StRemorin1.3 hampers potato virus X TGBp1 ability to increase plasmodesmata permeability, but does not interfere with its silencing suppressor activity, *FEBS Lett.*, **588**, 1699-1705, doi: 10.1016/j.febslet.2014.03.014.
  104. Zavaliev, R., Dong, X., and Epel, B. L. (2016) Glycosylphosphatidylinositol (GPI) modification serves as a primary plasmodesmal sorting signal, *Plant Physiol.*, **172**, 1061-1073, doi: 10.1104/pp.16.01026.
  105. Faulkner, C., Akman, O. E., Bell, K., Jeffree, C., and Oparika, K. (2008) Peeking into pit fields: a multiple twinning model of secondary plasmodesmata formation in tobacco, *Plant Cell*, **20**, 1504-1518, doi: 10.1105/tpc.107.056903.
  106. Morvan, O., Quentin, M., Jauneau, A., Mareck, A., and Morvan, C. (1998) Immunogold localization of pectin methylesterases in the cortical tissues of flax hypocotyl, *Protoplasma*, **202**, 175-184, doi: 10.1007/BF01282545.
  107. Yu, C. H., Guo, G. Q., Nie, X. W., and Zheng, G. C. (2004) Cytochemical localization of pectinase activity in pollen mother cells of tobacco during meiotic prophase I and its relation to the formation of secondary plasmodesmata and cytoplasmic channels, *Acta Bot. Sin.*, **46**, 1443-1453.
  108. Baluska, F., Samaj, J., Napier, R., and Volkmann, D. (1999) Maize calreticulin localizes preferentially to plasmodesmata in root apex, *Plant J.*, **19**, 481-488, doi: 10.1046/j.1365-313x.1999.00530.x.
  109. Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H. F., Mylona, P., Miedema, H., Torresk, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jonesk, J. D. G., Davies, J. M., and Dolan, L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth, *Nature*, **422**, 442-446, doi: 10.1038/nature01485.
  110. Benitez-Alfonso, Y., and Jackson, D. (2009) Redox homeostasis regulates plasmodesmal communication in *Arabidopsis* meristems, *Plant Signal. Behav.*, **4**, 655-659, doi: 10.4161/psb.4.7.8992.
  111. Xu, K., and Nagy, P. D. (2014) Expanding use of multi-origin subcellular membranes by positive-strand RNA viruses during replication, *Curr. Opin. Virol.*, **9**, 119-126, doi: 10.1016/j.coviro.2014.09.015.
  112. Barajas, D., Xu, K., Fernandez de Castro Martin, I., Sasvari, Z., Brandizzi, F., Risco, C., and Nagy, P. D. (2014) Co-opted oxysterol-binding ORP and VAP proteins channel sterols to RNA virus replication sites via membrane contact sites, *PLoS Pathog.*, **10**, e1004388, doi: 10.1371/journal.ppat.1004388.
  113. Pitzalis, N., and Heinlein, M. (2017) The roles of membranes and associated cytoskeleton in plant virus replication and cell-to-cell movement, *J. Exp. Bot.*, **69**, 117-132, doi: 10.1093/jxb/erx334.
  114. Epel, B. L. (2009) Plant viruses spread by diffusion on ER-associated movement-protein-rafts through plasmodesmata gated by viral induced host beta-1,3-glucanases, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **20**, 1074-1081, doi: 10.1016/j.semdev.2009.05.010.
  115. Zavaliev, R., Levy, A., Gera, A., and Epel, B. L. (2013) Subcellular dynamics and role of arabidopsis beta-1,3-glucanases in cell-to-cell movement of tobamoviruses, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **26**, 1016-1030, doi: 10.1094/MPMI-03-13-0062-R.

## MEMBRANE CONTACTS IN PLASMODESMATA: STRUCTURAL COMPONENTS AND THEIR FUNCTIONS

### Review

A. V. Pankratenko<sup>1</sup>, A. K. Atabekova<sup>1</sup>, S. Y. Morozov<sup>1,2</sup>, and A. G. Solovyev<sup>1,2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Virology, 119991 Moscow, Russia*

<sup>2</sup> *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; E-mail: solovyev@belozersky.msu.ru*

<sup>3</sup> *Sechenov First Moscow State Medical University, Institute of Molecular Medicine, 119991 Moscow, Russia*

<sup>4</sup> *Institute of Agricultural Biotechnology, 127550 Moscow, Russia*

Received February 12, 2020

Revised March 10, 2020

Accepted March 16, 2020

Plasmodesmata (PDs) are channels connecting the cells in plant tissues. In plasmodesmata the cytoplasm, plasma membrane (PM), and endoplasmic reticulum (EPR) of neighboring cells are joined. Through PDs macromolecules, such as proteins and RNA, are transported that ensures the functional unity of plant tissues and transmission of signals necessary for individual development and responses to external signals. Recent studies have shown that PDs include membrane contacts (MCs), which are specialized structures formed with participation of a number of protein components connecting EPR and PMs. In general, as shown mainly for animal cells, membrane contacts between EPR and plasma membranes are involved in the transfer of lipid and protein components between these membrane compartments, as well as in maintaining the structural integrity of EPR and in response to stress. The structure of MCs in plasmodesmata of plants is studied much worse, and at present active studies on the structural elements of PDs responsible for the connection between EPR and plasma membranes within these organelles are just started. In the present review, the structural and functional properties of proteins are considered that are proven or supposed to establish membrane contacts in plasmodesmata. In addition, we discuss the role of cytoskeleton, lipid microdomains within membranes, and cell wall components for the maintenance and remodeling of plasmodesmata MCs during various external biotic and abiotic stresses.

**Keywords:** plasmodesmata, membrane contacts, endoplasmic reticulum, plasma membrane, membrane microdomains, plasmodesmata proteins, membrane contact proteins, plant viruses

УДК 577.322.9

## СБОРКА КОМПЛЕКСА 30S СУБЪЕДИНИЦЫ РИБОСОМЫ И ФАКТОРА RbfA *S. aureus in vitro* ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ\*

© 2020 А.Г. Бикмуллин<sup>1\*\*</sup>, Л.И. Нуруллина<sup>1</sup>, Н.С. Гараева<sup>1</sup>, Э.А. Ключкова<sup>1</sup>,  
Д.С. Блохин<sup>1</sup>, А.А. Голубев<sup>1,2</sup>, Ш.З. Валидов<sup>1</sup>,  
И.Ш. Хусаинов<sup>1,2,3</sup>, К.С. Усачев<sup>1\*\*</sup>, М.М. Юсупов<sup>1,2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008 Казань, Россия;  
электронная почта: aydar.bikmullin@gmail.com; konstantin.usachev@kpfu.ru; marat@igbmc.fr

<sup>2</sup> Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC),  
67400 Илькирш-Граффенштаден, Франция

<sup>3</sup> Институт биофизики им. Макса Планка, 60438 Франкфурт-на-Майне, Германия

Поступила в редакцию 05.12.2019

После доработки 17.02.2020

Принята к публикации 14.03.2020

Связывающий рибосому фактор RbfA из золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) является белком холодовой адаптации и требуется для роста патогенных клеток при пониженных температурах (10–15 °С). RbfA участвует в процессинге 16S рРНК, а также в сборке и стабилизации малой 30S субъединицы рибосомы. Изучение структуры и функции RbfA, структуры комплекса фактора с малой субъединицей, а также механизма их связывания поможет лучше разобраться в деталях такого сложного и фундаментального процесса, как сборка 30S субъединицы рибосомы, определяющего и контролирующего общий уровень биосинтеза белка в целом. В работе описаны протоколы получения фактора RbfA и малых субъединиц рибосом *S. aureus*, а также оптимизированный протокол сборки и очистки комплекса 30S субъединицы и фактора RbfA для дальнейших структурных исследований методом криоэлектронной микроскопии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** *Staphylococcus aureus*, рибосома, криоэлектронная микроскопия, RbfA, фактор трансляции, сборка 30S субъединицы рибосомы.

DOI: 10.31857/S0320972520050036

### ВВЕДЕНИЕ

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) в настоящее время является одним из самых распространенных и опасных патогенных микроорганизмов. Эти грамположительные бактерии вызывают множество больничных и внебольничных заболеваний дыхательных путей и кожных покровов человека. Основным методом борьбы с патогеном является антибиотикотерапия, однако ее эффективность постоянно снижается за счет прогрессирующей резистентности стафилококка к используемым против него антибиотикам. Существуют штаммы *S. aureus*, такие как, например, метициллин-устойчивый золотистый стафилококк (methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), имеющие множественную устойчивость к антибиотикам последних классов [1–5].

Ключевым элементом абсолютно любой живой клетки, контролирующим общий уровень её жизнедеятельности, является рибосома. Количество рибосом и их функциональная активность определяют общий уровень синтеза белка на каждом этапе нормального развития клетки и в стрессовых условиях [6].

Рибосома – это макромолекулярный РНК-белковый комплекс, сборка которого является сложным процессом, включающим в себя сопряженные этапы биосинтеза рРНК и белков большой и малой субъединиц, их модификаций, корректного сворачивания и связывания друг с другом. Процесс этот строго консервативен и жестко регулируется на уровне синтеза молекул рРНК, а также зависит от доступности этих молекул в клетке. Образование рибосомальных субъединиц также зависит от скорости роста клеток. Ошибки на этапах сборки снижают об-

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-314, 27.04.2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

ший уровень метаболизма и могут быть даже фатальными для микроорганизмов [7]. Сборка рибосомы и ее работа на различных этапах жизнедеятельности регулируется специальными белковыми факторами, нарушая работу которых возможно управлять биосинтезом белка, включать или выключать его. Некоторые факторы работают постоянно, ряд факторов активизируется только в условиях стресса [8]. Одним из таких факторов является связывающий рибосому фактор RbfA (ribosome-binding factor A) – белок холодовой адаптации, необходимый для роста клеток при низкой температуре (10–15 °С). RbfA имеет сродство к 30S субъединице рибосомы и необходим для её «созревания» – фактор требуется для эффективного процессинга 16S рРНК (способствует корректной конформации спирали h1). Также предполагается, что фактор участвует в стабилизации малой субъединицы и после созревания 16S рРНК, взаимодействуя с её 5'-концом. В *Arbfa* штаммах *Escherichia coli* наблюдается уменьшение активных 70S рибосом (увеличение количества отдельных субъединиц), а также увеличение количества молекул 17S рРНК – предшественников 16S рРНК. Белки семейства RbfA встречаются у большинства эу- и археобактерий, а также в хлоропластах растений и митохондриях высших организмов, в том числе и человека. RbfA *S. aureus* – это небольшой белок, состоящий из 115 аминокислотных остатков, с молекулярной массой ~14 кДа [9–13].

Биосинтез рибосомы является одним из самых фундаментальных процессов во всем живом. Исследование частных деталей процесса сборки рибосомы и их субъединиц в патогенных для человека золотистых стафилококках позволит получить больше информации об этом сложном процессе в целом, а также позволит узнать больше о том, как функционирует сама рибосома. Изучение структуры комплекса малой субъединицы рибосомы и связывающего рибосому фактора RbfA *S. aureus* позволит определить локализацию фактора на субъединице и описать механизм их связывания, т.е. лучше понять этап созревания малой субъединицы и образование инициаторного комплекса трансляции.

Криоэлектронная микроскопия сегодня, наряду со спектроскопией ядерного магнитного резонанса и рентгеноструктурным анализом, является одним из наиболее информативных методов в молекулярной и структурной биологии. С ее помощью возможно получать разрешение выше 2 Å. Главной особенностью этого типа микроскопии является то, что макромолекулы фиксируются в нативном состоянии за счет мо-

ментального замораживания в жидком этане или смеси этана и пропана [14–17].

С развитием криоэлектронной микроскопии значительно расширился спектр рибосомальных комплексов для структурных исследований, в том числе и рибосом бактерий [18–21]. Эти исследования показали, что, несмотря на структурную гомологию рибосом различных бактерий, их оптимум ионных условий и концентрации ионов  $Mg^{2+}$  для поддержания правильной конформации *in vitro* отличаются. Особенно это касается отдельных изолированных рибосомальных субъединиц, которые в отсутствие стабилизирующих контактов между субъединицами (т.н. межсубъединичных мостиков, intersubunit bridges) наиболее подвержены структурным искажениям, особенно в области интерфейса. При этом малая субъединица наиболее хрупкая и зачастую деформируется в области шейки – элемента, поддерживающего ориентацию головки относительно тела 30S частицы. Подобная подвижность субъединицы вносит не только искажения в конечную структуру, но и значительно увеличивает гетерогенность образца. Таким образом, подбор оптимальных условий очистки и стабилизации 30S субъединиц и комплекса 30S–RbfA является необходимым и важным условием пробоподготовки для дальнейшего структурного анализа.

В данной статье мы представляем оптимизированный метод сборки и очистки комплекса фактора RbfA и малой рибосомальной субъединицы *S. aureus* для дальнейшего анализа методом криоэлектронной микроскопии. Были получены образцы фактора RbfA и 30S субъединиц *S. aureus* высокой степени чистоты, затем проводили их связывание и дополнительную аффинную очистку для увеличения в конечном образце доли 30S субъединиц, связанных с фактором. В дальнейшем данная методика может быть применена к множеству белков, связывающихся с малой субъединицей рибосомы *S. aureus*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** В работе были использованы реактивы: ИПТГ, спермидин, канамицин, хлорамфеникол («Euromidex», Франция); LB, LB agar («Invitrogen», США); коктейль ингибиторов эндогенных протеаз («Roche», Швейцария); NiNTA-сорбент Superflow («QIAGEN», Германия) и БСА («Helicon», Россия). Остальные реактивы были классифицированы как ЧДА, ХЧ и Ос.Ч.

**Получение фактора RbfA *S. aureus*.** Ген фактора RbfA *S. aureus* был амплифицирован из хро-

мосомной ДНК с введением рестрикционных сайтов NdeI и HindIII. Были использованы следующие специфичные прямой (5'-TTTTTTC-ATATGAGCAGTATGAGCAGAGCG-3') и обратный (5'-TTTTTTAAGCTTATCTATCTTG-TTTGTGTAATCTTGAATCA-3') праймеры («Евроген», Россия). Температурный режим полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также состав реакционной смеси подбирали в соответствии с температурой отжига праймеров (59 °C) и по протоколу коммерческого фермента для ПЦР Phusion Green High-Fidelity DNA Polymerase («Thermo Scientific», США).

Обработка ПЦР фрагментов и плазмиды pET28a соответствующими рестриктазами, очистка ДНК-компонентов и их лигирование проводили согласно протоколам коммерческих ферментов NdeI, HindIII и наборов GeneJet Gel Extraction Kit, T4 DNA Ligase Kit. Затем проводили трансформацию лигазной смеси в штамм *E. coli* DH5 $\alpha$  и выделение вектора с помощью коммерческого набора GenJet Plasmid MiniPrep. В результате нами был получен вектор RbfA\_Sa::pET28a, несущий ген фактора RbfA с 6 гистидинами на N-конце (гис-таг) под контролем LacI<sup>q</sup> промотора. На всех этапах клонирования использовали ферменты и коммерческие наборы производства «Thermo Fisher Scientific», США.

Экспрессию фактора проводили в штамме *E. coli* BL21 (DE3, pLysS) на селективной богатой питательной среде LB, содержащей канамицин и хлорамфеникол. Рост клеток осуществляли при температуре 37 °C и скорости качания 180 об./мин на шейкере-инкубаторе «Inforce HT» («Inforce», Германия). При достижении поглощения OD<sub>600</sub> = 0,6 производили индукцию экспрессии фактора RbfA путем добавления ИПТГ (изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид) до конечной концентрации 1 мМ. Экспрессию проводили в течение 6 ч при температуре 30 °C и скорости качания 180 об./мин. Затем клетки осаждали центрифугированием («Beckman», США), замораживали и хранили при температуре -20 °C.

После разморозки разрушение клеток осуществляли за счет эндогенного T7 лизоцима (pLysS) на ультразвуковом гомогенизаторе HD2070 («Bandelin», Германия) в присутствии ингибиторов эндогенных протеаз, в том числе и металлопротеаз, в базовом буфере 1 для NiNTA-хроматографии (состав см. далее). Осаждение нерастворимой фазы клеточного лизата производили последовательно методом центрифугирования при 25 000 g в течение 30 мин и 100 000 g в течение 45 мин на центрифугах «Beckman» (США) – Avanti JXN-26 (ротор JA-25.50) и Optima XPN (ротор 45Ti) соответственно.

**Очистка RbfA.** Очистку RbfA из супернатанта лизата производили последовательно методами металл-хелатной аффинной хроматографии и гель-фильтрации. Аффинную хроматографию на NiNTA-сорбенте проводили в буфере 1 (20 мМ Tris-HCl, pH 7,6; 0,5 М NH<sub>4</sub>Cl; 1 мМ ДТТ) с промежуточной отмывкой буфером 2 (20 мМ Tris-HCl, pH 7,6; 1 М NH<sub>4</sub>Cl; 1 мМ ДТТ), буфером 3 (20 мМ Tris-HCl, pH 7,6; 0,5 М NH<sub>4</sub>Cl; 20 мМ имидазол; 1 мМ ДТТ) и элюцией буфером 4 (20 мМ Tris-HCl, pH 7,6; 0,5 М NH<sub>4</sub>Cl; 0,3 М имидазол; 1 мМ ДТТ). Затем проводили осаждение белка сульфатом аммония (80%, w/v) [22].

Гель-фильтрацию проводили с помощью хроматографической системы NGC Discover («BioRad», США) на колонке Enrich Sec70 («BioRad», США) в буфере следующего состава: 50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 6,8; 0,25 М NH<sub>4</sub>Cl. Чистоту полученного образца оценивали с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в Tris-глициновом буферном растворе, pH 8,3 (25 мМ Tris-буфер; 250 мМ глицин; 0,1% додецилсульфат натрия), при температуре 20 °C и рабочем напряжении 140 V.

**Получение 70S рибосом *S. aureus*.** 70S рибосомы *S. aureus* были получены согласно протоколу, разработанному в Институте генетики, молекулярной и клеточной биологии (Страсбург, Франция) [23]. 30S субъединицы были получены путем диссоциации 70S рибосом в градиенте сахарозы (0–30%) в буфере D (30 мМ NH<sub>4</sub>Cl; 1 мМ MgOAc; 10 мМ Hepes-K, pH 7,5; 1 мМ ДТТ) на ультрацентрифуге Optima XPN-80 («Beckman Coulter», США) на роторе SW28 при скорости 20 550 об./мин в течение 16 ч при температуре 4 °C. Фракции градиента, содержащие малые субъединицы рибосом, были объединены и сконцентрированы на спин-центриконах Amicon Ultra («Merck Millipore», Ирландия) (размер пор 100 кДа) с заменой буфера градиента на буфер G (10 мМ NH<sub>4</sub>Cl; 10 мМ MgOAc; 10 мМ Hepes-K, pH 7,5; 50 мМ KCl; 1 мМ ДТТ; 2,5 мМ спермидина). Чистоту рибосом и субъединиц также оценивали с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ (условия аналогичны анализу проб после гель-фильтрации) и электрофореза в агарозном геле с бромистым этидием (0,8% агарозный гель; буфер TBE, pH 8,0 (89 мМ Tris-буфер; 89 мМ борная кислота; 2 мМ EDTA); 0,5 мкг/мл бромистый этидий; 20 °C; рабочее напряжение 180 V).

**Получение и очистка комплекса 30S—RbfA.** К 90 мкл смеси 30S субъединиц в буфере G были добавлены 10 мкл фактора RbfA разной концентрации в фосфатном буфере так, чтобы соотно-

шение 30S : RbfA было равно 1 : 1, 1 : 5 и 1 : 10. Реакционную смесь для сборки комплекса инкубировали в течение 40 мин при температуре 37 °С.

Очистку комплекса от не связавшихся с белком 30S субъединиц производили при помощи NiNTA-сорбента в буферных условиях сборки. Объем сорбента был равен объему реакционной смеси (100 мкл). После нанесения смеси NiNTA-сорбент был промыт буфером G объемом в десять раз превышающим объем сорбента. Элюцию проводили последовательно элюирующими буферами, содержащими 100, 150 и 200 мМ имидазола в объеме, превышающем объем сорбента в 3 раза. В качестве контроля на сорбент также наносили свободные 30S субъединицы без фактора RbfA, их отмывку и элюцию проводили аналогично опыту с комплексом.

Для дальнейшего анализа были отобраны первые 5, 10-я и 20-я фракции отмывки и первые 6 фракций элюции. Объем фракции составлял 50 мкл. Анализировали оптическое поглощение отобранных фракций при длинах волн 260 нм и 280 нм (максимумы поглощения нуклеиновых кислот и белков соответственно). Также эти фракции были исследованы методами белкового ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях и электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Условия электрофоретических исследований были аналогичны описанным ранее при анализе белковых проб после гель-фильтрации и субъединиц после диссоциации рибосом.

Фракции, содержащие комплекс, сразу замораживали в жидком азоте и хранили при температуре  $-80$  °С. Транспортировку образцов осуществляли при низких температурах в сухом льду. Разморозку образцов проводили непосредственно перед криомикроскопическими исследованиями.

**Вестерн-блот.** Для дополнительной качественной идентификации фактора RbfA в полученном образце комплекса после NiNTA-очистки был проведен вестерн-блот фракции элюции с максимальным значением оптического поглощения с коммерческим набором вторичных хемилюминесцентных антител к гис-тагу «HisProbe™-HRP» («Thermo Scientific», США). В набор антител также входили растворы реагента и субстрата для хемилюминесцентной ферментативной реакции. Вестерн-блот проводили по протоколу коммерческого набора при комнатной температуре. Сначала был проведен ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях фракции элюции, а также свободных 30S субъединиц и очищенного RbfA в качестве

контролей. Условия электрофореза были аналогичны проведенным ранее. Перенос белков с 15%-го ПААГ на мембрану из поливинилиденфторида (ПВДФ, 0,45 мкм, «BioRad», США) производили в трансфер буфере (25 мМ Tris-HCl, pH 8,3; 190 мМ глицина; 20% метанола (v/v)) на блот-системе полусухого переноса Trans-Blot SEMI-DRY («BioRad», США) при напряжении 17 V в течение 40 мин. Блокирование неспецифического связывания проводили в 20% растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ТБСТ буфере (25 мМ Tris-HCl, pH 7,2; 150 мМ NaCl; 0,05% (w/v) Tween 20) при качании в течение 1 ч. После двукратной отмывки буфером ТБСТ следовала инкубация с антителами при качании в течение 1 ч. После промывки буфером ТБСТ следовала активация антител, связавшихся с белком, в смеси коммерческих растворов субстрата и реагента хемилюминесцентной ферментативной реакции (1 : 1). Обнаружение свечения антител, связавшихся с гис-тагом рекомбинантного фактора RbfA, производили при помощи системы гель-документирования ChemiDoc MP («BioRad», США).

**Оценка качества полученного образца комплекса 30S–RbfA.** Оценку качества полученного образца комплекса малой субъединицы рибосомы и фактора RbfA производили на электронном микроскопе Titan Krios («Thermo Fisher», США) в Институте генетики, молекулярной и клеточной биологии (Страсбург, Франция). После разморозки на льду образец наносили на покрытые углеродом подложки с помощью прибора Vitrobot («FEI company/Thermo Fisher», США) при температуре 4 °С и относительной влажности 100%. После «вымачивания» в течение 30 с подложки замораживали в жидком этане. Визуализацию проводили с использованием детектора Falcon 3 («FEI company/Thermo Fisher», США) при увеличении 75 000 раз (соответствующее физическому размеру пикселя 0,85 Å/pix), дефокусе – 3 мкм и общей дозе 60 e/Å<sup>2</sup>.

**Связывание RbfA с большой субъединицей рибосомы.** Также для подтверждения специфичности связывания фактора RbfA с малой субъединицей рибосомы был проведен эксперимент по связыванию RbfA с большой субъединицей. Условия связывания фактора с 50S субъединицей (50S : RbfA = 1 : 10), а также анализ проб после NiNTA-очистки были аналогичны связыванию его с 30S. Элюцию проводили при концентрации имидазола 100 мМ. В качестве контроля параллельно проводили эксперимент по нанесению на NiNTA-сорбент свободных 50S субъединиц без фактора RbfA. Их отмывку и элюцию проводили аналогично опыту с комплексом. Полученные после элюции образцы анализируют

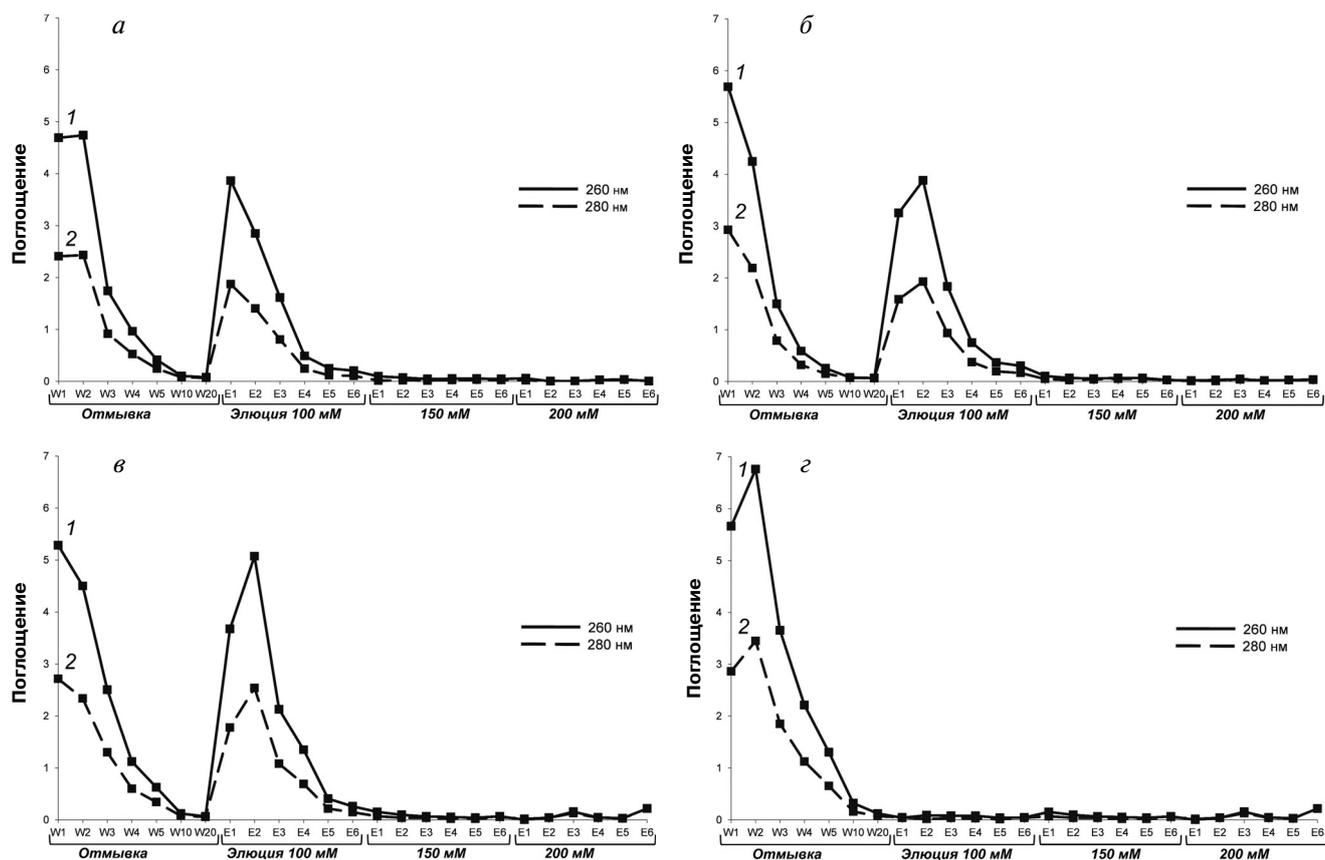


Рис. 1. Оптическое поглощение при 260 нм (1) и 280 нм (2) фракций NiNTA-очистки комплекса 30S–RbfA при соотношении 30S : RbfA = 1 : 1 (а), 1 : 5 (б), 1 : 10 (в) и свободных 30S субъединиц рибосом (г). W1–W20 – фракции отмывки, E1–E6 – фракции элюции при 100 мМ, 150 мМ и 200 мМ имидазола

вали с помощью ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения комплекса малой субъединицы рибосомы и фактора RbfA была выбрана следующая стратегия: *in vitro* инкубировали малые субъединицы рибосомы и молекулы фактора RbfA при физиологически нормальной для *S. aureus* температуре 37 °С в буферном растворе G, имеющем наиболее оптимальный для рибосом состав, при молярном соотношении субъединиц и молекул фактора: 1 : 1, 1 : 5 и 1 : 10.

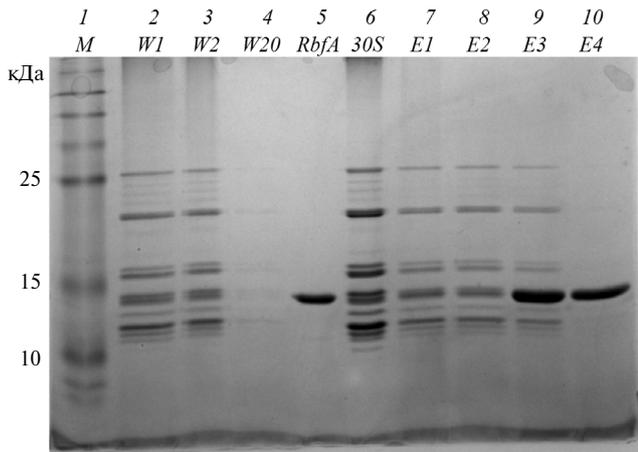
Общий объем реакционной смеси составил 100 мкл. Стабильность малой субъединицы рибосомы сильно зависит от буферных условий, а именно от концентрации ионов  $Mg^{2+}$  в растворе. При добавлении фактора RbfA в фосфатном буфере к 30S субъединицам происходит разведение буфера G, в котором они находятся, соответственно концентрация ионов  $Mg^{2+}$  в объеме уменьшается. Разведение итогового объема ре-

акционной смеси на 10% и менее не критично для стабильности субъединицы рибосомы [24]. Поэтому к 90 мкл 30S субъединиц в буфере G мы добавляли 10 мкл раствора фактора RbfA в фосфатном буфере.

По литературным данным [9], RbfA связывается с 30S субъединицей в области декодирующего центра, при этом C-терминальный конец белковой молекулы связывается с кором субъединицы. Связывающийся с NiNTA-сорбентом гис-таг находится на N-конце фактора. Таким образом, теоретически RbfA должен своим N-концом связаться с NiNTA-сорбентом, удерживая при этом C-концом субъединицу рибосомы. Эти факты делают возможной очистку полученного образца комплекса 30S–RbfA от не связавшихся с фактором субъединиц с помощью NiNTA-сорбента.

В качестве контрольного эксперимента на сорбент наносили свободные 30S субъединицы без фактора RbfA, их отмывку и элюцию проводили аналогично опыту с комплексом.

Первые 5, 10-я и 20-я фракции отмывки, а также первые 6 фракций каждой элюции были



**Рис. 2.** Электрофоретический анализ в ПААГ при денатурирующих условиях фракций после очистки комплекса 30S–RbfA (30S : RbfA = 1 : 5). Дорожки: 1 – белковый маркер, 2–4 – фракции отмывки W1, W2, W20, 5 – контроль RbfA, 6 – контроль 30S, 7–10 – фракции элюции при 100 мМ имидазола E1–E4

отобраны для измерения их поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм (рис. 1). Факт сборки комплекса и наличие его или отдельных компонентов во фракциях определяли качественно: поглощение при 260 нм и 280 нм свидетельствовало о наличии 16S рРНК и белкового фактора; наличие рибосомальных белков и фактора RbfA также подтверждали с помощью денатурирующего ПААГ-электрофореза, наличие малой субъединицы, а именно 16S рРНК – с помощью агарозного электрофореза с бромистым этидием (рис. 2 и 3). В качестве контролей на гели электрофорезов наносили очищенный RbfA и свободные малые субъединицы рибосом.

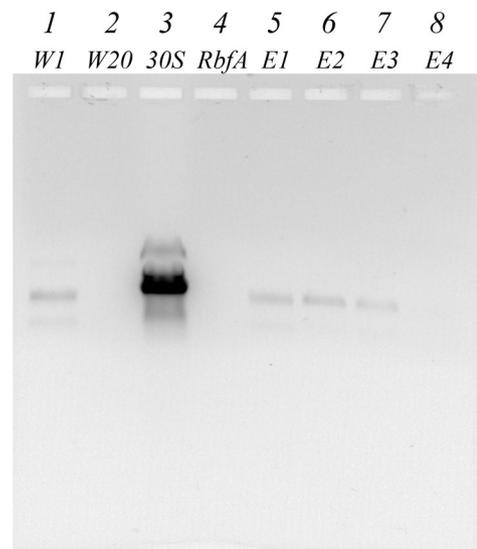
На рисунке 1, а–в видно, что более половины малых субъединиц рибосом не связались с белком и сошли (W1–W20). Возможно, не все нативные субъединицы способны связываться с фактором, или эти субъединицы разрушились и потеряли способность к связыванию. Свободные 30S субъединицы без фактора также не связались с колонкой в контрольном эксперименте (рис. 1, г). Таким образом, очистка комплекса 30S–RbfA методом металл-хелатной хроматографии позволила нам очистить образец от не связавшихся с фактором 30S субъединиц и тем самым значительно повысить гомогенность образца перед анализом методом криоэлектронной микроскопии.

Было установлено, что концентрация имидазола 100 мМ является достаточной для элюции комплекса. Использование минимально достаточной концентрации имидазола позволяет сохранять образец в условиях, приближенных к оптимальным, а также снизить риск появле-

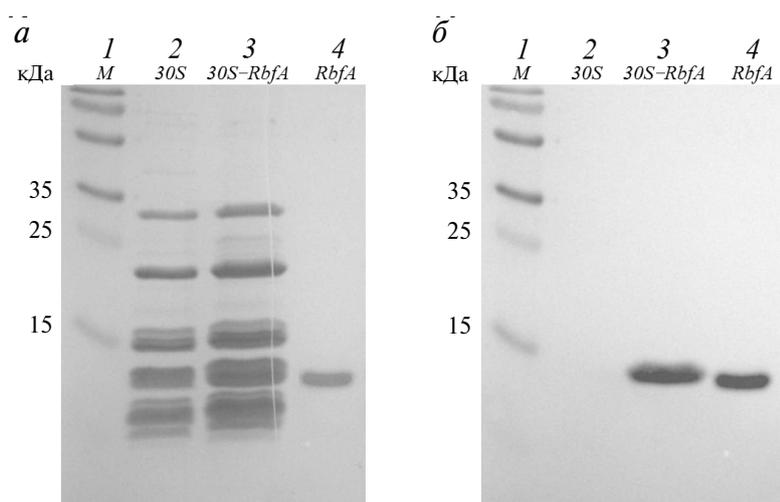
ния дополнительных артефактов и шумов на электронных микрографиях [25]. Наибольшее количество комплекса наблюдается во фракции элюции E2 при десятикратном избытке фактора RbfA по отношению к 30S субъединицам (30S : RbfA = 1 : 10). Именно это соотношение было взято нами для дальнейших структурных исследований. При других проверенных нами соотношениях общий выход комплекса был меньше на ~20%. Больше количество фактора относительно 30S не исследовалось.

Для анализа с помощью методов электрофореза были взяты фракции сборки комплекса при молярном соотношении 30S субъединиц к фактору RbfA, равном 1 : 5. Электрофореграммы представлены на рис. 2 и 3, и данные этих рисунков соотносятся с данными, представленными на рис. 1, и подтверждают факт сборки комплекса. На гели были нанесены некоторые фракции отмывки W, элюции E, а также отдельно 30S субъединицы и очищенный фактор RbfA в качестве контроля.

В первых фракциях отмывки мы видим наличие рибосомальных белков на ПААГ и 16S рРНК на агарозном геле (расположение окрашенных белковых пятен и свечения в ультрафиолетовом свете совпадают с контролями 30S и RbfA). Последняя фракция отмывки не содержит белков и рРНК. В первых фракциях элюции мы снова наблюдаем наличие рибосомальных белков, фактора RbfA на ПААГ и 16S рРНК на агарозном



**Рис. 3.** Электрофоретический анализ в агарозном геле в присутствии бромистого этидия фракций после очистки комплекса 30S–RbfA (30S : RbfA = 1 : 5). Дорожки: 1–2 – фракции отмывки W1, W20; 3 – контроль 30S; 4 – контроль RbfA; 5–8 – фракции элюции при 100 мМ имидазола E1–E4



**Рис. 4.** Вестерн-блот анализ комплекса 30S–RbfA после очистки: *a* – полиакриламидный гель; *б* – ПВДФ-мембрана после связывания с антителами и их активации. Дорожки: 1 – белковый маркер, 2 – контроль 30S, 3 – комплекс 30S–RbfA (фракция элюции E2), 4 – контроль RbfA

геле, что говорит о том, что комплекс фактора и 30S субъединицы был связан с NiNTA-сорбентом. Основное количество комплекса содержится в первых двух фракциях элюции. Во фракции E4 на ПААГ (рис. 2) наблюдается присутствие только белка RbfA, который был в избытке по сравнению с субъединицами рибосом.

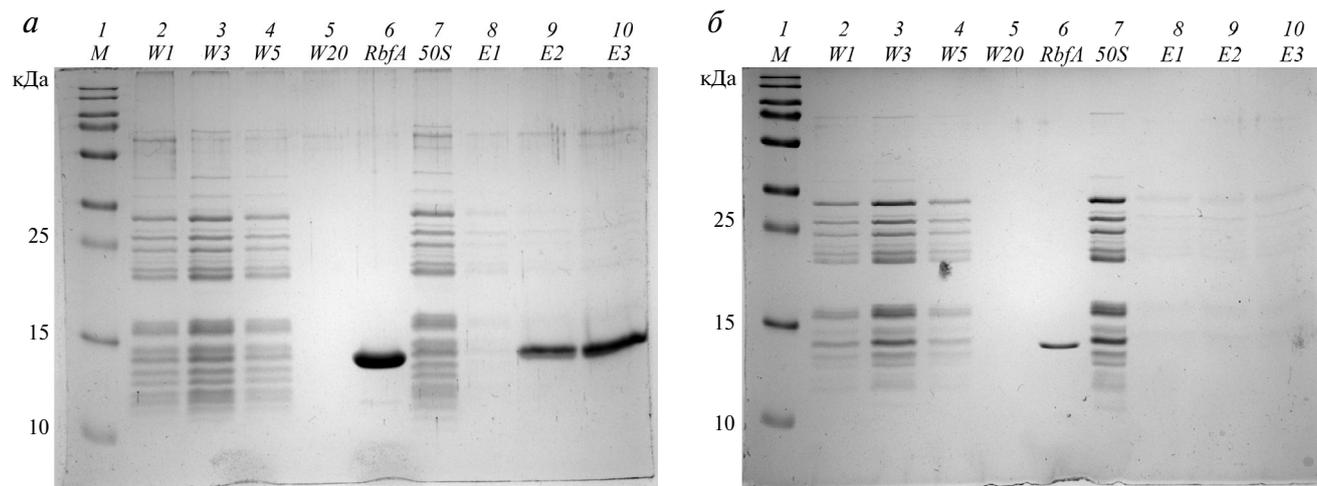
Для дополнительной идентификации фактора RbfA в составе полученного комплекса 30S–RbfA был проведен вестерн-блот фракции элюции E2 с наибольшей концентрацией образца. В работе были использованы коммерческие вторичные хемилюминесцентные антитела специфичные к гистидиновому тагу. Единственным компонентом нашей системы, имеющим гистаг, является рекомбинантный белковый фактор RbfA. На рисунке 4, *a* представлены результаты ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях фракции E2 и контрольных образцов – свободных 30S субъединиц и фактора RbfA (окраску геля производили уже после переноса белка на мембрану при вестерн-блоте с помощью красителя Кумасси по протоколу Лэммли [26]).

Во фракции элюции E2 мы видим наличие рибосомальных белков – профиль идентичен контрольному образцу свободных малых субъединиц. С этого геля был проведен перенос белков на ПВДФ-мембрану. Визуализация мембраны показала наличие свечения, что говорит о связывании антитела с белком RbfA, несущим гис-таг. На рисунке 4, *б* мы видим наличие белка в контрольном образце RbfA и в образце комплекса, тогда как в контроле 30S ничего нет. Молекулярные массы RbfA в контроле и комплексе совпадают. Можно сделать заключение о присутствии белка RbfA в комплексе.

Можно предположить, что связывание RbfA с 30S субъединицей вызвано неспецифическим взаимодействием белка RbfA с рРНК. Для подтверждения специфичности связывания RbfA с малой субъединицей был воспроизведен описанный выше эксперимент по сборке и очистке комплекса, но вместо 30S субъединиц с фактором RbfA инкубировали 50S субъединицы (50S : RbfA = 1 : 10). Элюцию с NiNTA-сорбента проводили при концентрации имидазола 100 мМ. В качестве контроля для этого эксперимента в аналогичных условиях наносили на NiNTA-сорбент и элюировали свободные 50S субъединицы.

Были определены значения поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм фракций отмывки W1–W20 и фракций элюции E1–E6. Фракции отмывки W1, W3, W5 и W20, а также фракции элюции с наибольшей концентрацией образца E1–E3 были исследованы с помощью денатурирующего ПААГ-электрофореза (рис. 5, *a*). После нанесения свободных 50S субъединиц на NiNTA-сорбент с помощью электрофореза анализировали те же фракции отмывки и элюции, что и в смеси с RbfA (рис. 5, *б*).

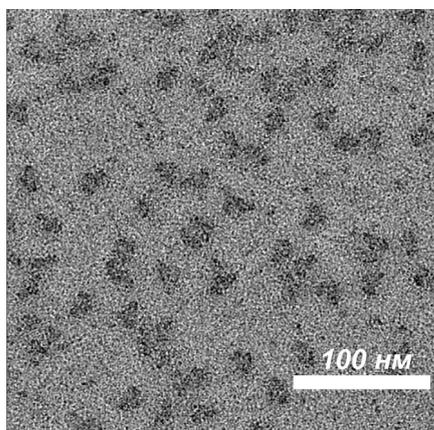
На гелях на рисунках 5, *a* и *б*, мы видим отсутствие белков 50S субъединиц во фракциях элюции E1–E3 и в эксперименте с фактором RbfA, и в эксперименте со свободными субъединицами. В эксперименте с фактором видно, что RbfA связывается с сорбентом и смывается с него при элюции. 50S субъединицы обнаруживаются только во фракциях отмывки W. Можно сделать заключение, что 50S субъединицы не связываются ни с NiNTA-сорбентом, ни с фактором RbfA, т.е. фактор RbfA имеет сродство к 30S



**Рис. 5.** Электрофоретический анализ в ПААГ при денатурирующих условиях фракций после очистки смеси 50S и RbfA (а) и свободных 50S (б). Дорожки: 1 — белковый маркер, 2–5 — фракции отмывки W1, W3, W5, W20, 6 — контроль RbfA, 7 — контроль 50S, 8–10 — фракции элюции при 100 мМ имидазола E1–E3

субъединице. Фактор специфически связывается с компонентами малой субъединицы.

На рисунке 6 изображена микрофотография образца комплекса 30S–RbfA после очистки на NiNTA-сорбенте, полученная с помощью электронного микроскопа. В основном можно заметить отдельные 30S субъединицы продолговатой формы. Также есть некоторое количество агрегатов субъединиц. Гомогенность образца позволяет проводить дальнейший сбор данных. Размер субъединиц совпадает с представленными в литературе данными [27] и составляет около 15 × 20 нм. Наличие фактора RbfA на 30S субъединице, его структуру и локализацию, а также общую долю связавшихся с белком субъединиц будет возможно определить только после обработки и систематизации набора данных.



**Рис. 6.** Микрофотография образца комплекса 30S–RbfA, полученная на электронном микроскопе

Результаты, представленные выше, позволяют сделать вывод о том, что был получен и очищен комплекс фактора RbfA и 30S субъединицы рибосомы для дальнейших структурных исследований методом криоэлектронной микроскопии.

Последовательно были получены очищенные препараты связывающего рибосому фактора RbfA и 30S малых субъединиц рибосом *S. aureus*. Далее была произведена сборка макромолекулярного комплекса 30S–RbfA, оптимизация условий его дополнительной очистки, непосредственно очистка, характеристика и корректная для дальнейших исследований заморозка образца. Также была проведена предварительная визуальная микроскопическая оценка качества полученного образца. В результате был получен образец комплекса RbfA и 30S субъединицы *S. aureus* для структурных исследований с помощью метода криоэлектронной микроскопии.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-34-00375).

**Благодарности.** Выражается благодарность Германской службе академических обменов (DAAD).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lowy, F. D. (1998) Medical progress – *Staphylococcus aureus* infections, *N. Engl. J. Med.*, **339**, 520-532, doi: 10.1056/NEJM199808203390806.
- Kluytmans, J., and Verbrugh, H. (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks, *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**, 505-520, doi: 10.1128/CMR.10.3.505.
- Le Loir, Y., Baron, F., and Gautier, M. (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning, *Genet. Mol. Res.*, **2**, 63-76.
- Cimolai, N. (2008) MRSA and the environment: Implications for comprehensive control measures, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **27**, 481-493, doi: 10.1007/s10096-008-0471-0.
- Wilson, D. N. (2014) Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance, *Nat. Rev. Microbiol.*, **12**, 35-48, doi: 10.1038/nrmicro3155.
- Kaczanowska, M., and Rydén-Aulin, M. (2007) Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **71**, 477-94.
- Shajani, Z., Sykes, M. T., and Williamson, J. R. (2011) Assembly of bacterial ribosomes, *Annu. Rev. Biochem.*, **800**, 521-526, doi: 10.1146/annurev-biochem-062608-160432.
- Starosta, A. L., Lassak, J., Jung, K., and Wilson, D. N. (2014) The bacterial translation stress response, *FEMS*, **38**, 1172-1201, doi: 10.1111/1574-6976.12083.
- Datta, P. P., Wilson, D. N., Kawazoe, M., Swami, N. K., Kaminishi, T., Sharma, M. R., Booth, T. M., Takemoto, C., Fucini, P., Yokoyama, S., and Agrawal, R. K. (2007) Structural aspects of RbfA action during small ribosomal subunit assembly, *Mol. Cell*, **9**, 434-445, doi: 10.1016/j.molcel.2007.08.026.
- Xia, B., Ke, H., Shinde, U., and Inouye, M. (2003) The role of RbfA in 16S rRNA processing and cell growth at low temperature in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **19**, 332, 575-584, doi: 10.1016/S0022-2836(03)00953-7.
- Huang, Y. J., Swapna, G. V., Rajan, P. K., Ke, H., Xia, B., Shukla, K., Inouye, M., and Montelione, G. T. (2003) Solution NMR structure of ribosome-binding factor A (RbfA), a cold-shock adaptation protein from *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **21**, 327, 521-536, doi: 10.1016/S0022-2836(03)00061-5.
- Rubin, S. M., Pelton, J. G., Yokota, H., Kim, R., and Wemmer, D. E. (2003) Solution structure of a putative ribosome binding protein from *Mycoplasma pneumoniae* and comparison to a distant homolog, *J. Struct. Funct. Genomics*, **4**, 235-243, doi: 10.1023/b:jsfg.0000016127.57320.82.
- Blokhin, D. S., Bikmullin, A. G., Nurullina, L. I., Garaeva, N. S., Validov, Sh. Z., Klochkov, V. V., Aganov, A. V., Khusainov, I. Sh., Yusupov, M. M., and Usachev, K. S. (2018) Backbone and side chain NMR assignments for the ribosome binding factor A (RbfA) from *Staphylococcus aureus*, *Biomol. NMR Assign.*, **13**, 27-30, doi: 10.1007/s12104-018-9845-0.
- Merino, F., and Raunser, S. (2016) Cryo-EM as a tool for structure-based drug development, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, doi: 10.1002/anie.201608432.
- Cheng, Y., Grigorieff, N., Penczek, P. A., and Walz, T. (2015) A primer to single-particle cryo-electron microscopy, *Cell*, **161**, 438-449, doi: 10.1016/j.cell.2015.03.050.
- Binshtein, E., and Ohi, M. D. (2015) Cryo-electron microscopy and the amazing race to atomic resolution, *Biochemistry*, **54**, 3133-3141, doi: 10.1021/acs.biochem.5b00114.
- Vonk, J., and Mills, D. J. (2017) Advances in high-resolution cryo-EM of oligomeric enzymes, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **46**, 48-54, doi: 10.1016/j.sbi.2017.05.016.
- Shimokava-Chiba, N., Muller, C., Fujiwara, K., Beckert, B., Koreaki, I., Wilson, D. N., and Chiba, S. (2019) Release factor-dependent ribosome rescue by BrfA in the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, *Nat. Commun.*, **10**, 5397, doi: 10.1038/s41467-019-13408-7.
- Khusainov, I., Vicens, Q., Ayupov, R., Usachev, K., Myasnikov, A., Simonetti, A., Validov, Sh., Kieffer, B., Yusupova, G., Yusupov, M., and Hashem, Y. (2017) Structures and dynamics of hibernating ribosomes from *Staphylococcus aureus* mediated by intermolecular interactions of HPF, *EMBO J.*, **36**, 2073-2087, doi: 10.15252/embj.201696105.
- Li, X., Sun, Q., Jiang, C., Yang, K., Hung, L., Zhang, J., and Sacchettini, J. C. (2015) Structure of ribosomal silencing factor bound to *Mycobacterium tuberculosis* ribosome, *Structure*, **23**, 1858-1865, doi: 10.1016/j.str.2015.07.014.
- Mishra, S., Ahmed, T., Tyagi, A., Shi, J., and Bhushan, S. (2018) Structures of *Mycobacterium smegmatis* 70S ribosomes in complex with HPF, tmRNA, and P-tRNA, *Sci. Rep.*, **8**, 13587, doi: 10.1038/s41598-018-31850-3.
- Ayupov, R. Kh., Khusainov, I. Sh., Validov, S. Z., Yusupova, G. Z., and Yusupov, M. M. (2016) Isolation and purification of *Staphylococcus aureus* hibernation-promoting factor inactivating of the ribosome, *Int. J. Pharm. Technol.*, **8**, 14392-14398.
- Khusainov, I., Vicens, Q., Bochler, A., Grosse, F., Myasnikov, A., Ménétret, J. F., Chicher, J., Marzi, S., Romby, P., Yusupova, G., Yusupov, M., and Hashem, Y. (2016) Structure of the 70S ribosome from human pathogen *Staphylococcus aureus*, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 10491-10504, doi: 10.1093/nar/gkw933.
- Weiss, R. L., Kimes, B. W., and Morris, D. R. (1973) Cations and ribosome structure. III. Effects on the 30S and 50S subunits of replacing bound Mg<sup>2+</sup> by inorganic cations, *Biochemistry*, **12**, 450-456.
- Guo, F., and Jiang, W. (2014) Single particle cryo-electron microscopy and 3-D reconstruction of viruses, *Methods Mol. Biol.*, **1117**, 401-443, doi: 10.1007/978-1-62703-776-1\_19.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- Vasiliev, V. D. (1974) Morphology of the ribosomal 30S subparticle according to electron microscopic data, *Acta Biol. Med. Ger.*, **33**, 779-793.

***In vitro* RECONSTITUTION OF THE *S. aureus* 30S RIBOSOMAL SUBUNIT  
AND RbfA FACTOR COMPLEX FOR STRUCTURAL STUDIES\***

**A. G. Bikmullin<sup>1\*\*</sup>, L. I. Nurullina<sup>1</sup>, N. S. Garaeva<sup>1</sup>, E. A. Klochkova<sup>1</sup>, D. S. Blokhin<sup>1</sup>,  
A. A. Golubev<sup>1,2</sup>, Sh. Z. Validov<sup>1</sup>, I. Sh. Khusainov<sup>1,2,3</sup>, K. S. Usachev<sup>1\*\*</sup>, and M. M. Yusupov<sup>1,2\*\*</sup>**

<sup>1</sup> Kazan Federal University, 420008 Kazan, Russia; E-mail: aydar.bikmullin@gmail.com,  
konstantin.usachev@kpfu.ru, marat@igbmc.fr

<sup>2</sup> Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

<sup>3</sup> Max Planck Institute for Biophysics, 60438 Frankfurt-am-Main, Germany

Received December 5, 2019

Revised February 17, 2020

Accepted March 14, 2020

Ribosome-binding factor A (RbfA) from *Staphylococcus aureus* is a cold adaptation protein that is required for the growth of pathogenic cells at low temperatures (10–15°C). RbfA is involved in the processing of 16S rRNA, as well as in the assembly and stabilization of the small 30S ribosomal subunit. Structural studies of the 30S–RbfA complex will help to better understand their interaction, the mechanism of such complexes, and the fundamental process such as 30S subunit assembly that determines and controls the overall level of protein biosynthesis. This article describes protocols for preparation of RbfA and the small 30S ribosome subunits and reconstitution and optimization of the 30S–RbfA complex to obtain samples suitable for cryo-electron microscopy studies.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, ribosome, cryo-electron microscopy, RbfA, translation factor, 30S subunit assembly

УДК 578.7; 571.21

## ИММУНОГЕННОСТЬ И ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ИНАКТИВИРОВАННЫХ И ЖИВЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ГОМОЛОГИЧНОГО И ГЕТЕРОСУБТИПИЧЕСКОГО ЗАРАЖЕНИЯ ВИРУСАМИ ГРИППА\*

© 2020 Е.Ю. Боравлева<sup>1</sup>, А.В. Луницин<sup>2</sup>, А.П. Каплун<sup>3</sup>, Н.В. Быкова<sup>3</sup>,  
И.В. Красильников<sup>4</sup>, А.С. Гамбарян<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов  
им. М.П. Чумакова РАН, 108819 Москва, Россия; электронная почта: al.gambaryan@gmail.com

<sup>2</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»,  
601125 пос. Вольгинский, Владимирская обл., Россия

<sup>3</sup> Московский университет тонкой химической технологии  
им. М.В. Ломоносова, 119571 Москва, Россия

<sup>4</sup> Санкт-Петербургский институт вакцин и сывороток,  
ФМБА, 198320 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 19.02.2020

После доработки 19.03.2020

Принята к публикации 20.03.2020

Было проведено параллельное тестирование инактивированных (цельновирионных, сплит, субъединичных и адьювантных вакцин) и живых вакцин для сравнения иммуногенности и защитной эффективности. Исследовали гомологическую и гетеросубтипическую защиту от заражения вирусами гриппа H5N1 и H1N1 на мышинной модели. Однократная иммунизация живой или цельновирионной вакциной H5N1 вызвала высокий уровень сывороточных антител и обеспечила полную защиту от заражения летальной дозой вируса A/Chicken/Kurgan/3/05 (H5N1). Сплит-вакцины, применяемые в однократной дозе, были гораздо менее эффективными. Адьюванты повышали уровень антител. В то же время добавление одного из них (Iso-SANP) к сплит-вакцине приводило к парадоксальному результату: уровень антител повышался, но защитный эффект вакцины снижался. Все протестированные адьюванты изменяли соотношение антител IgG1 и IgG2a. Иммунизация любым из протестированных гетеросубтипических живых вирусов обеспечивала частичную защиту от заражения H5N1 и снижала смертность мышей до низкого уровня, тогда как инактивированная вакцина против H1N1 вообще не обеспечивала защиты от вируса гриппа H5N1. После иммунизации субъединичными вакцинами с адьювантом и заражения гетеросубтипическим вирусом мы наблюдали более тяжелое течение болезни и более быструю смерть по сравнению с непривитыми животными.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** вирус гриппа А, живая инактивированная вакцина, адьювант.

DOI: 10.31857/S0320972520050048

### ВВЕДЕНИЕ

Вакцинация является главным инструментом профилактики гриппа. По оценкам, в сезон 2018–2019 гг., вакцинация предотвратила 4,4 миллиона заболеваний, 2,3 миллиона посещений врачей, 58 000 госпитализаций и 3500 смертей от гриппа в США [1].

Вакцинация снижает риск заболевания гриппом на ~50% в зависимости от сезона, обстановки, возрастной группы, типа вируса и степени антигенного соответствия между вакцинами и циркулирующими вирусами [2]. Производятся различные типы противогриппозных вакцин: инактивированные вакцины из целого вируса (цельновирионные) (цИГВ), расщеплен-

Принятые сокращения: КЭ – куриные яйца с развивающимся эмбрионом; ВАЖ – вирусосодержащая аллантоисная жидкость; НА – гемагглютинин; NA – нейраминидаза; цИГВ, цельновирионная инактивированная вакцина против гриппа; ИГВ – трехвалентная инактивированная вакцина против гриппа; ЖГВ – живая аттенуированная вакцина против гриппа; EID<sub>50</sub> – 50% инфекционная доза в КЭ; TCID<sub>50</sub> – 50% инфекционная доза в культуре клеток; LD<sub>50</sub> – 50% летальная доза; SANP – тритерпеноиды коры березы; Ха – холодоадаптированный.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-045, 12.05.2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

ные (сплит), субъединичные вакцины, содержащие только поверхностные антигены, и вакцины с добавлением адъювантов (адъювантные). Кроме того, производятся живые аттенуированные вакцины (ЖГВ) [3].

**Цельновирионные инактивированные вакцины (цИГВ).** Цельновирионные вакцины вызывают более сильный иммунный ответ, чем сплит и субъединичные вакцины, обеспечивая специфическую индукцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток и защищая мышью от летального гомологического и гетеросубтипического заражения [4]. ЦИГВ индуцируют две волны иммунного ответа: ранний (независимый от Т-клеток) В-клеточный прирост высокоаффинных антител и поздний Т-клеточный ответ, в то время как сплит-вакцины вызывают только поздние Т-клеточные ответы. В то же время именно высокоаффинные антитела обладают хорошей вируснейтрализующей активностью [5].

В отличие от сплит-вакцин, цИГВ обеспечивают значительное снижение лейкоцитов периферической крови у мышью. При этом наблюдается быстрое индуцирование и массовое продуцирование альфа-интерферона (IFN $\alpha$ ). Сплит и субъединичные вакцины, изготовленные из того же штамма вируса гриппа, не вызывают этих эффектов [6].

Воспалительные реакции в месте введения являются ограничивающим фактором для широкого применения цИГВ. Тем не менее моновалентные цельновирионные вакцины могут быть оптимальными в условиях пандемии, когда ключевым фактором является время производства [7].

**Сплит и субъединичные вакцины.** Сплит и субъединичные вакцины менее реактогенны, но их недостатком является низкая эффективность [8].

**Адъювантные вакцины.** Одним из способов повышения эффективности вакцин является добавление адъювантов, которые могут играть важную роль в доставке антигена к антигенпрезентирующим клеткам [9]. MF59, AS03 и гидроксид алюминия, наиболее часто используемые в качестве адъювантов, усиливают иммунный ответ и способствуют выработке более высокого уровня антител [8].

Данные наблюдений и клинических испытаний свидетельствуют о безопасности MF59 и его способности повышать эффективность вакцин против гриппа у детей и пожилых людей [10]. Адъюванты MF59 и AS03 стимулировали выработку более эффективных антител, даже если они использовались с меньшей дозой антигена H5N1, чем вакцина без адъюванта [11]. В рандомизированном исследовании у здоровых пожи-

лых добровольцев вакцина с адъювантом MF59 продемонстрировала более высокую иммуногенность, чем обычная субъединичная вакцина. Однако связанная с вакцинацией генерализованная миалгия наблюдалась у 8,1% и 0,9% для адъювантной и обычной вакцин соответственно [12]. В исследовании, проводимом на общей популяции детей, относительная эффективность, иммуногенность и безопасность адъювантной субъединичной противогриппозной вакцины с MF59 (aP1V4) и лицензированной в США неадъювантной вакцины была одинаковой, в то время как в подгруппе 6–23 месяцев эффективность aP1V4 была значительно выше, чем у вакцины-компаратора. Профили безопасности были схожими, но побочные эффекты регистрировались чаще для aP1V4, чем при использовании компаратора [13, 14].

Трехкратная вакцинация хорьков рекомбинантным гемагглютинином (НА) с добавлением аддавакса, MF59-подобного адъюванта, вызвала более высокие приросты антител с более широким перекрестно-реактивным потенциалом, чем индуцированные инфекцией вируса гриппа, и этот перекрестно-реактивный ответ, вероятно, коррелировал с повышенным уровнем антител против стеблевой части гемагглютина [15].

В слепом рандомизированном исследовании на пожилых людях сравнивали сезонную трехвалентную противогриппозную вакцину с адъювантной вакциной. Частота CD4<sup>+</sup> Т-клеток, специфичных к вакцинным штаммам, была выше у реципиентов адъювантной вакцины [16].

Была проведена оценка иммуногенности и безопасности цельновирионной вакцины препандемического гриппа А/Н5N1 с гидроокисью алюминия (MG1109). Введение двух доз MG1109 не вызывало побочных эффектов у взрослых и вызывало сильный гуморальный иммунный ответ [17]. Недостатком алюминиевого адъюванта, особенно когда он используется с субъединичными вакцинами, является слабый клеточный иммунный ответ, поскольку алюминий стимулирует только Th2 клетки [18].

Новый адъювант на основе сапонина G3, содержащий дитерпеноид стевииол-гликозидов, индуцировал анамнестические вирус-специфические ответы CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые обеспечивают более широкую защиту от антигенно отличных вирусов гриппа [19]. Провели сравнение адъювантов G3 и гидроокиси алюминия по степени индукции Th1 и Th2 ответов у мышью, иммунизированных антигриппозной сплит-вакциной. G3 повышал уровни как IgG1, так и IgG2a, тогда как Al(OH)<sub>3</sub> подавлял продукцию IgG2a. Результаты указывают на сильную способность

G3 индуцировать как клеточные, так и гуморальные иммунные ответы [20].

Испытывали на хорьках адъювант САF01 с доказанной способностью индуцировать CD4<sup>+</sup> Т-клеточные и гуморальные ответы. САF01-адъювантная сплит-вакцина индуцировала защиту после гетерологичного заражения, несмотря на отсутствие специфических антител. Иммунитет, индуцированный этой вакциной, уменьшал симптомы системного заболевания и выделение вируса, но не уменьшал локальное воспаление в полости носа [21].

Адъювант глюкопиранозил-липид (агонист TLR4), в виде стабильной водно-масляной эмульсии (GLA-SE) в сочетании со сплит-вакциной, повышал титры антител в сыворотке, повышал соотношение IgG2c/IgG1 и усиливал защиту у старых мышей [22].

Адъювант CpG подавлял индукцию и размножение антиген-специфических клеток Treg, которые ослабляют противовирусный иммунитет против инфекции вирусом гриппа. CpG-адъювантные пептидные вакцины обеспечивали гетеросубтипическую защиту от гриппа, вероятно, путем ингибирования развития Treg и усилению Т-клеточного иммунитета [23].

Легочный сурфактант человека с карбоксивиниловым полимером, повышающим вязкость (SF-10), при добавлении к субъединичной антигриппозной вакцине индуцировал гемагглютинин-специфические цитотоксические Т-лимфоциты и повышал экспрессию гранзимы В в селезеночных CD8<sup>+</sup> Т-клетках. Такие Т-клетки обладали высокой цитотоксичностью по отношению к клеткам-мишеням, экспрессирующим гемагглютинин. SF-10 индуцировал более высокую, опосредованную Т-лимфоцитами, цитотоксичность в легких на ранней стадии инфекции вирусом гриппа по сравнению с безадъювантной вакциной [24].

Гемозоин, синтетическая версия гемозоина, вызывающего малярию, был протестирован в качестве адъюванта для цельновирионной антигриппозной вакцины на мышинной модели. Гемозоин повышал иммуногенность вирионов и оказался перспективным адъювантом для цИГВ [25].

Адъюванты полиоксидоний и совидон широко используются в вакцинах «Гриппол» и «Совигрипп» в России. На долю «Гриппола» приходится ~60% российского рынка противогриппозных вакцин, но серьезных испытаний «Гриппола» и «Совигриппа» не проводили [26].

**Живые вакцины.** Живые аттенуированные вакцины создают путем реассортации или с помощью обратной генетики, конструируя вирус с генами NA и NA от эпидемических штаммов и

шестью генами от аттенуированных, холодоадаптированных (Ха) донорских штаммов. Ха доноры A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) и A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) используются в США и в России соответственно.

В Соединенных Штатах в 2003 году была одобрена для использования живая аттенуированная вакцина против гриппа FluMist. Эта вакцина, вводимая интраназально, стимулировала местный иммунитет в верхних дыхательных путях и, имитируя естественную инфекцию, вызвала многоплановый иммунный ответ [27].

Многие исследования показали безопасность и эффективность ЖГВ, особенно для маленьких детей [28–40].

ЖГВ реже, чем трехвалентная инактивированная вакцина против гриппа (ИГВ), вызывает тяжелые побочные эффекты (синдром Гийена–Барре и паралич) [41]. У детей в возрасте от 6 месяцев до 7 лет ЖГВ превосходит ИГВ по показателям иммунного ответа и защиты [34, 36, 42].

Безопасность ЖГВ показана не только для когорты, вакцинация которых рекомендуется в первую очередь (дети 2–7 лет), но также для детей 6–24 месяцев, а также для детей с легкими формами астмы и рецидивирующего обструктивного бронхита [43]. ЖГВ характеризуется низким риском системных аллергических реакций у молодых людей с аллергией на яйца. Вакцина хорошо переносится пациентами с контролируемой астмой или обструктивным бронхитом [44]. Применение ЖГВ при астме не повышало риск побочных респираторных эффектов [45, 46].

Иммунизация ИГВ индуцирует более высокие средние геометрические титры антител, а ЖГВ продуцирует более высокие Т-клеточные ответы, особенно к гипервариабельным участкам HA [47]. Преимущество живых вакцин в первую очередь связано с продукцией CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, специфических к разнообразным вирусам гриппа, что обеспечивает более широкий иммунный ответ. Поэтому ЖГВ менее, чем ИГВ чувствительны к антигенному несоответствию между вакциной и циркулирующими вирусами [48]. ЖГВ значительно увеличивала количество наивных, запоминающих и переходных В-клеток на 30-й день после вакцинации, тогда как ИГВ повышала количество плазмобластов на 7-й день. Эти результаты свидетельствуют о том, что, ЖГВ и ИГВ индуцировали существенно отличающиеся В-клеточные ответы у вакцинированных детей [49].

У детей в возрасте 6–36 месяцев ЖГВ обеспечивала хорошую защиту от штаммов гриппа, отличных от вакцинного [50]. Индукция гетеросубтипической перекрестной защиты делает

возможным использование ЖГВ в качестве универсальной вакцины против гриппа в режиме первичной вакцинации в случае новой пандемии [51].

Несмотря на высокую эффективность ЖГВ среди маленьких детей, у взрослых ИГВ обычно более эффективен. Общенациональное когортное исследование в Финляндии в сезоне 2015/16 гг. показало, что ИГВ обеспечивает более эффективную защиту, чем ЖГВ [52]. В сезоне 2004–2005 гг., когда циркулирующие вирусы отличались от тех, которые были включены в вакцину, инактивированная вакцина эффективно предотвращала лабораторно подтвержденные заболевания гриппом у здоровых взрослых. Живая вакцина также предотвращала заболевания гриппом, но была менее эффективной [53, 54].

Все виды вакцин демонстрируют безопасность и эффективность в специальных исследованиях, тем не менее результаты рандомизированных контролируемых слепых исследований иногда не столь благополучны.

Анализ систематических обзоров из Кокрановской базы данных показал, что инактивированные противогриппозные вакцины снижают вероятность заболевания гриппом у здоровых взрослых с 2,3% без вакцинации до 0,9%. Частота гриппоподобных заболеваний (ГПЗ) также уменьшается после вакцинации, но степень защиты не постоянная. Доказательства сокращения госпитализаций и потери рабочего времени мало достоверны. Защита от гриппа и ГПЗ у матерей и новорожденных была еще ниже, чем в других популяциях. С другой стороны, вакцинация сопряжена с риском нежелательных побочных эффектов [2].

Иммунизация инактивированной вакциной у детей с ранее существовавшими заболеваниями не уменьшала число случаев респираторных заболеваний в течение сезона гриппа [55].

После вакцинации ИГВ иногда наблюдали парадоксальные эффекты. Эффективность вакцины против А (H3N2) в сезон гриппа 2014–2015 гг. составляла –3% [56]. Вакцинация в предыдущем сезоне обычно обеспечивала остаточную защиту, но иногда при этом снижала эффективность текущей сезонной вакцинации [57]. В течение сезона 2015–2016 гг. эффективность вакцины в профилактике А (H1N1) pdm09 была низкой, особенно для лиц, вакцинированных в предыдущем сезоне [58]. Gherasim et al. [59] и Rondy et al. [60] тоже отмечали отрицательное влияние предыдущей вакцинации на эффективность текущей вакцинации против вируса А (H3N2).

Наилучший пример вакцинации наблюдали во время пандемии 1968 года. Моновалентная

цельновирионная вакцина, соответствующая циркулирующему вирусу, имела эффективность 66–93% [7].

Пандемии наиболее опасны для жизни и здоровья человека, поэтому эффективная защита от новых пандемий, возможно, важнее, чем защита в межпандемические сезоны.

Для определения оптимальной стратегии смягчения последствий пандемии использовали возрастную модель. Расчеты показали, что при ограниченном запасе вакцин в начале пандемии гриппа следует начать кампанию вакцинации на ранней стадии, чтобы задержать появление большой волны заболеваний и замедлить ее рост. Наиболее эффективной стратегией является использование сезонной ЖГВ и целевой возрастной группы 5–19 лет [61].

В этом исследовании мы описываем параллельное тестирование различных типов вакцин при гомологичном и гетеросубтипическом заражении. В экспериментах на мышах мы сравнивали цельновирионные, сплит-вакцины с адьювантами различной природы и без них, и живые вакцины. Изучали способность вакцин разных типов защищать от специфического и гетеросубтипического контрольного заражения вирусами гриппа H1N1 и H5N1.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вирусы.** Список использованных в работе вирусов приводится в табл. 1.

Апатогенные вирусы диких птиц A/duck/Moscow/4203/2010, A/duck/Moscow/4238/2010, A/duck/Moscow/4182/2010 и A/duck/Moscow/4031/2010 выделены из фекалий кряквы, как описано ранее [62, 63]. Вирус VNH5N1-PR8/CDC-RG является реассортантом, сконструированным в США в отделе гриппа Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC, USA), содержит модифицированный ген гемагглютинаина и ген нейраминидазы (NA) от вируса A/Vietnam/1203/2004, а остальные гены – от вакцинного штамма A/Puerto Rico/8/34. Данный вирус любезно предоставлен доктором R. Donis (CDC, USA). Ха штамм A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) и реассортант A/New Caledonia-Leningrad/134/17/57 были любезно предоставлены доктором Л.Г. Руденко (Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург). Ха реассортант A/Vietnam-Leningrad/134/17/57 был получен путем реассортации с донором A/Leningrad/134/17/57, как описано в работе Gambaryan et al. [64]. Не адаптированный к куриным яйцам с развивающимся эмбрионом (КЭ) вирус человека A/Nib/26/90M (H3N2) был

Таблица 1. Вирусы гриппа А, использованные в работе

Штамм	Субтип	Краткое обозначение	Примечание
A/Vietnam/1203/2004-PR8/CDC-RG	H5N1	rVN-PR	вакцинный штамм (CDC, Atlanta, USA)
A/Puerto Rico/8/34	H1N1	PR8	вакцинный штамм
A/Leningrad/134/17/57	H2N2	Len	Ха донор аттенуации
A/New Caledonia-Leningrad/134/17/57	H1N1	NC-Len	Ха вакцинный штамм
Vietnam/1203/04-Leningrad/134/17/57	H5N2	VN-Len	Ха реассортант 1/7*
A/Nib/26/90-M	H3N2	H3N2 Hu	вирус гриппа человека
A/duck/Moscow/4203/2010	H3N8	H3 Avi	апатогенный вирус
A/duck/Moscow/4238/2010	H4N6	H4 Avi	апатогенный вирус
A/duck/Moscow/4182/2010	H5N2	H5 Avi	апатогенный вирус
A/duck/Moscow/4031/2010	H6N2	H6 Avi	апатогенный вирус
A/Chicken/Kurgan/3/05	H5N1	Ku/05	высоковирулентный вирус кур
A/Hamburg/5/2009-MA	H1N1	H1N1 pdm09	пандемический штамм, адаптированный к мышам

\* Ген гемагглютинина H5 и 7 остальных генов от донорского штамма.

любезно предоставлен доктором Джеймсом Робертсоном (Национальный институт биологических стандартов и контроля, Соединенное Королевство). Пандемический вирус А/Hamburg/5/2009 (H1N1) любезно предоставлен доктором М.Н. Матросовичем (Institute of Virology, Philipps University, Marburg, Germany). Адаптированный к мышам вариант А/Hamburg/5/2009-МА получен путем семи пассажей через легкие мышей. Он отличается от исходного вируса заменами HA-Asp225Gly и HA-Lys123Asn [65].

Высоковирулентный вирус А/кураца/Курган/3/2005 H5N1 любезно предоставлен доктором С.С. Ямниковой (Институт вирусологии им. Ивановского, Москва). Все работы с этим вирусом выполняли в условиях третьего уровня биологической безопасности в Федеральном научном центре вирусологии и микробиологии, пос. Вольгинский, Владимирская область, Россия.

**Культивирование вирусов.** 10<sup>2</sup> инфекционных единиц (EID<sub>50</sub>, 50% инфекционная доза в КЭ) вирусов инокулировали в десятидневные эмбрионированные куриные яйца и инкубировали 48 ч при 36 °С или 96 ч при 32 °С (для адаптированных к холоду штаммов). Собирали вирусосодержащие аллантоисные жидкости (ВАЖ) и оценивали содержание вируса методом гемагглютинации [26]. Инфекционность ВАЖ определяли титрованием на КЭ и выражали в EID<sub>50</sub>.

**Образцы для иммунизации.** В работе использовали инактивированные цельновирионные вакцины, сплит-вакцины с адьювантами или без них, субъединичные вакцины с адьювантом полиоксидонием, а также живые вакцины

(табл. 2). Вакцина «Гриппол<sup>®</sup> плюс» («Petrovax», Россия), содержащая поверхностные антигены вирусов: H1N1 – А/Калифорния 7/2009/, H3N2 – А/Виктория 210/208 NYMC X-187, В/Брисбен/60/2008 (по 5 мкг HA каждого из вирусов) и 0,5 мг полиоксидония в одной человеческой дозе, до употребления хранили с соблюдением температурного режима строго по инструкции.

Адьюванты: гидроксид алюминия («Serva», Германия); сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксо)-1,4-этиленпиперазинбромид (полиоксидоний) и сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина (совидон) («Петровакс Фарм», Россия). Положительно заряженные составные наночастицы гликофинголипида, мирамистина и дигидрохвертицина (GMD), отрицательно заряженные сферические аморфные наночастицы тритерпеноидов коры березы (SANP) и SANP с добавлением изопропилпальмитата (Iso-SANP) были получены, как описано в работе Каплун с соавт. [66].

**Иммунизация мышей инактивированными препаратами.** Использовали 6-ти недельных мышей породы BALB/c («Столбовая» НЦБМТ ФМБА России). Вводили мышам по 100 мкл свежеприготовленных растворов антигенов и плацебо в каждую из задних лапок. Ежедневно взвешивали мышей; на 11-й, 18-й и 30-й после иммунизации отбирали по 100 мкл крови из хвоста.

**Иммунизация мышей живыми штаммами вирусов гриппа.** Вводили мышам интраназально по 50 мкл вирусосодержащих растворов под легким

Таблица 2. Характеристика инактивированных вакцинных препаратов, использованных в работе

Вакцинные композиции	Субтип	Краткое обозначение	Доза НА мкг/мышь	Адъювант мкг/мышь
Очищенный вирус VN-PR	H5N1	ц.вирионная	2	–
Очищенный вирус PR8	H1N1	H1N1 ц.вирионная	2	–
Расщепленный вирус VN-PR	H5N1	сплит	2	–
H5 сплит + Al(OH) <sub>3</sub>	H5N1	сплит + Al(OH) <sub>3</sub>	2	50
H5 сплит + полиоксидоний	H5N1	сплит + полиоксидоний	2	50
H5 сплит + совидон	H5N1	сплит + совидон	2	50
H5 сплит + GDM	H5N1	сплит + GDM	2	50
H5 сплит + SANP	H5N1	сплит + SANP	2	50
H5 сплит + Iso-SANP	H5N1	сплит + Iso-SANP	2	50
«Гриппол <sup>®</sup> плюс» с полиоксидонием	H1N1	Гриппол 2011	1	100
	H3N2		1	
	B		1	
НА и NA вируса A/NIB/26/90 с полиоксидонием	H3N2		2	100
Контроль			–	–

эфирным наркозом. Инфекционная доза составляла  $\sim 10^7$  EID<sub>50</sub>/мышь.

**Взятие образцов крови мышей для определения антител.** Отрезали мышам кончик хвоста и собирали кровь в забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) с 0,01 М цитратом натрия и 25 М.Е./мл гепарина. Центрифугировали, добавляли к супернатанту 1/10 объема 10%-ной суспензии каолина, выдерживали 5 ч, периодически встряхивая. Центрифугировали и хранили в замороженном виде. Концентрация сывороток, полученных таким образом, составляет 1/5 от цельной сыворотки.

**Определение антител к вирусам гриппа в сыворотках мышей.** Уровни сывороточных антител определяли методом ИФА. Плашки Nunc, MaxiSorp (Sigma-Aldrich, США) сенсibilизировали фетуином, добавляли вирусосодержащую аллантоисную жидкость, содержащую 64 гемагглютинирующие единицы вируса соответствующего субтипа, выдерживали в течение ночи при 4 °С, затем отмывали и блокировали 0,2% раствором БСА на PBS, 1 ч. Блокирующий раствор удаляли, в лунки вносили по 100 мкл буфера (0,2% БСА/Tween 20 = 1/1000 (v/v) на PBS) и титровали на нем сыворотки, начиная с разведения 1 : 20. Лунки без вируса служили отрицательным контролем. Инкубировали 4 ч при 4 °С. Отмывали и добавляли меченные пероксидазой

антитела против IgG1 и IgG2a иммуноглобулинов мыши («Serotec», Germany). Инкубировали 2 ч, промывали и проводили цветную реакцию с ортофенилендиамином [64].

**Аэрозольное контрольное заражение мышей.** Контрольное заражение проводили на 30-й день после иммунизации. Мышей метили и помещали в 50-литровую прозрачную пластиковую камеру с подводящей и отводящей трубками. По первой трубке поступал аэрозоль инфекционного вируса, полученный на ультразвуковом ингаляторе «Муссон» («Алтайский приборостроительный завод» Россия), а отводящая трубка через НЕРА-фильтр была подключена к перистальтическому насосу, работающему со скоростью 0,5 литра в минуту. Расчет содержания инфекционных вирусных частиц в единице объема аэрозоля и объема вдыхаемого воздуха производили, как описано ранее [67, 68].

Мышей подвергали воздействию аэрозоля, содержащего  $10^5$ – $10^6$  EID<sub>50</sub> вируса на литр, в течение 10 мин. Дозировка вируса A/Chicken/Kurgan/3/05 на мышь составила  $\sim 10^3$  EID<sub>50</sub>/мышь, что составляет  $\sim 100$  LD<sub>50</sub> (LD<sub>50</sub> – 50% летальная доза). Дозировка адаптированного для мыши вируса A/Hamburg/5/2009-MA на мышь составляла  $\sim 10^4$  EID<sub>50</sub>/мышь, что ниже, чем LD<sub>50</sub>. На четвертый день после заражения отбирали легкие у 3-х мышей из каждой группы и

определяли титры вируса (TCID<sub>50</sub>, 50% инфекционная доза в культуре клеток) в культуре MDCK, как описано ниже. Мышей ежедневно взвешивали и контролировали падеж.

**Определение содержания вируса в легких мышей.** Легкие мышей растирали с мелкодисперсным стеклом в стерильных условиях. Добавляли по 1 мл PBS с гентамицином (0,1 мг/мл), суспендировали и центрифугировали. Собирали супернатанты. Культуру MDCK, выращенную на 96-луночных планшетах промывали и добавляли в каждую лунку по 200 мкл среды Игла MEM с добавлением L-глутамина (0,1%, гентамицина (1 мг/мл) и БСА (5 мг/мл)). В крайние лунки добавляли по 50 мкл легочных элюатов и титровали в 7 лунках, перенося по 50 мкл раствора. Через 16 ч добавляли в лунки по 20 мкл раствора глутарового альдегида, до конечной концентрации 0,02%, выдерживали 30 мин, сливали среду и промывали лунки. Добавляли по 50 мкл раствора фетуина, меченного пероксидазой хрена в буфере (0,2% БСА/Tween 20 = 1/1000 (v/v) и 1 мкМ ингибитора нейраминидазы oseltamivir phosphate на PBS. Через 60 мин инкубации при 4 °С планшеты отмывали, добавляли раствор аминоэтилкорбазола с перекисью водорода и выдерживали 30 мин. Клетки, инфицированные вирусом, окрашивались в красный цвет. Подсчет окрашенных клеток проводили с помощью инвертированного микроскопа БИОЛАМ П-1 («ЛОМО», Россия).

**Статистическая обработка результатов.** Для статистического анализа использовали критерий Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Сравнение живой, цельновирионной и сплит-вакцин с адьювантами и без них.** Эффективность экспериментальных вакцин исследовали на мышах. Группы мышей инокулировали интраназально живыми вакцинами или внутримышечно инактивированными вакцинами и плацебо. Для изучения влияния адьювантов на эффективность вакцинации сравнивали сплит-вакцины с добавками адьювантов со сплит-вакциной, цельновирионной и живой вакциной. В качестве адьювантов были протестированы широко используемые гидроксид алюминия, полиоксидоний и совидон, а также экспериментальные препараты GMD, SANP и Iso-SANP.

Потеря веса и выживаемость в группах мышей, иммунизированных инактивированными экспериментальными вакцинами, а также холодадаптированными реассортантами VN-Len и

NC-Len не отличались от группы плацебо (данные не представлены).

Цельновирионная и живая вакцины обеспечивали максимальный прирост антител и почти 100%-ную защиту от последующего контрольного заражения (челленджа) высокопатогенным вирусом H5N1. Сплит-вакцина обеспечивала меньший прирост антител и примерно 50%-ную защиту.

Добавление различных адьювантов к сплит-вакцине приводит к очень разным результатам. Три из них (гидроксид алюминия, полиоксидоний и SANP) повышали уровень антител и протективный эффект вакцинации. Совидон незначительно влиял на уровень антител и немного увеличивал выживаемость мышей. GMD незначительно влиял на уровень антител и снижал выживаемость мышей. Iso-SANP повышал уровень антител, но резко снижал защитный эффект сплит-вакцины ( $p < 0,05$ ). Даже лучшие адьюванты: гидроксид алюминия, полиоксидоний и SANP не повысили качество сплит-вакцины до уровня цельновирионной и, тем более, живой вакцины (табл. 3).

Некоторые адьюванты, не причиняя мышам видимого вреда и повышая уровень суммарных анти-H5N1 IgG антител, приводят к ухудшению выживаемости мышей после челленджа. Для лучшего понимания этого явления мы изучили динамику накопления антител IgG1 и IgG2a отражающих уровень гуморального и клеточного иммунного ответа соответственно.

Соотношение IgG1/IgG2 у индивидуальных мышей при вакцинации цельновирионной, сплит-вакцинами с адьювантами и живой вакциной представлено на рис. 1.

Вакцины отличаются друг от друга не только по способности повышать уровень антител. Они отличались и по соотношению IgG1 к IgG2a, а также по разбросу уровней антител между отдельными животными. Наивысший уровень антител вызывается живой вакциной. Инактивированная цельная вакцина также индуцировала высокие и стабильные уровни антител, хорошо сбалансированные в соотношении IgG1/IgG2a. Сплит-вакцина индуцировала невысокие, но примерно равные уровни IgG1 и IgG2a у всех мышей. Гидроксид алюминия резко увеличивал уровень антител IgG1, что отражает повышенный гуморальный иммунитет, но у отдельных мышей уровень IgG2a был очень низок. Разброс уровней IgG2a между мышами в этой группе был более, чем в 50 раз. Иными словами, гидроксид алюминия у части мышей блокирует клеточный иммунитет. Полиоксидоний увеличивал уровень IgG2a, но у некоторых мышей резко снижался уровень IgG1, что указывало на ослабление гу-

Таблица 3. Влияние разных адъювантов на иммуногенность и протективность H5N1 вакцин

Инактивированные вакцины	Титр антител*	Защита**	% Защиты	Вирус в легких***
Сплит	352	26/59	44	4,0 ± 0,5
Сплит +Al(OH) <sub>3</sub>	1215	29/38	76	3,0 ± 0,7
Сплит + полиоксидоний	473	30/40	75	3,0 ± 0,5
Сплит + совидон	387	25/40	63	3,0 ± 0,8
Сплит +GDM	342	10/40	25	6 ± 1
Сплит + SANP	1031	31/39	79	3,0 ± 0,7
Сплит + Iso-SANP	619	0/40	0	6 ± 1
Цельновирионная	1966	59/60	98	2
Живая вакцина VN-Len	6514	79/80	99	2
Плацебо	<20	0/200	0	6 ± 1

Примечание. Приводятся суммарные данные нескольких опытов.

\* Средняя геометрического титра анти-H5N1 антител в группах.

\*\* Число выживших/числу зараженных на 14-й день после челленджа 100 LD<sub>50</sub> вируса A/chicken/Kurgan/3/2005.

\*\*\* Содержание вируса A/chicken/Kurgan/3/2005 в легких мышей на третий день после челленджа (lg TCID<sub>50</sub>).

морального иммунитета. Низкие уровни IgG1 были обнаружены также у части мышей, иммунизированных композицией «сплит + совидон».

Сплит и живые вакцины повышали уровни IgG1 и IgG2a вплоть до 30 дней после иммунизации (табл. 4). Al(OH)<sub>3</sub>, полиоксидоний и SANP, которые повышали качество сплит-вакцины, повышали уровни IgG1 и IgG2a по сравнению с сплит-вакциной без адъювантов; и высокий уровень антител сохранялся до 30-го дня. В то же время адъювант Iso-SANP повышал уровень IgG2a до 11 дня, но дальнейшего роста не происходило, и к 30-му дню уровни антител были ниже, чем после вакцинации сплит-вакциной.

Понятно, почему выживаемость мышей в группе «сплит + Iso-SANP» ниже, чем в группе «сплит». Более интересно, что мыши в группе «сплит + Iso-SANP» умирали даже раньше, чем невакцинированные мыши с нулевым уровнем антител против H5N1. Это указывает на глубокую дезорганизацию защитных сил организма.

**Эффективность различных типов вакцин при гетеросубтипической иммунизации.** Чтобы изучить возможные последствия неспецифической иммунизации, мы провели серию экспериментов, в которых мышам вакцинировали вирусом гриппа одного субтипа, а затем заражали вирусами гриппа другого субтипа. В первую очередь

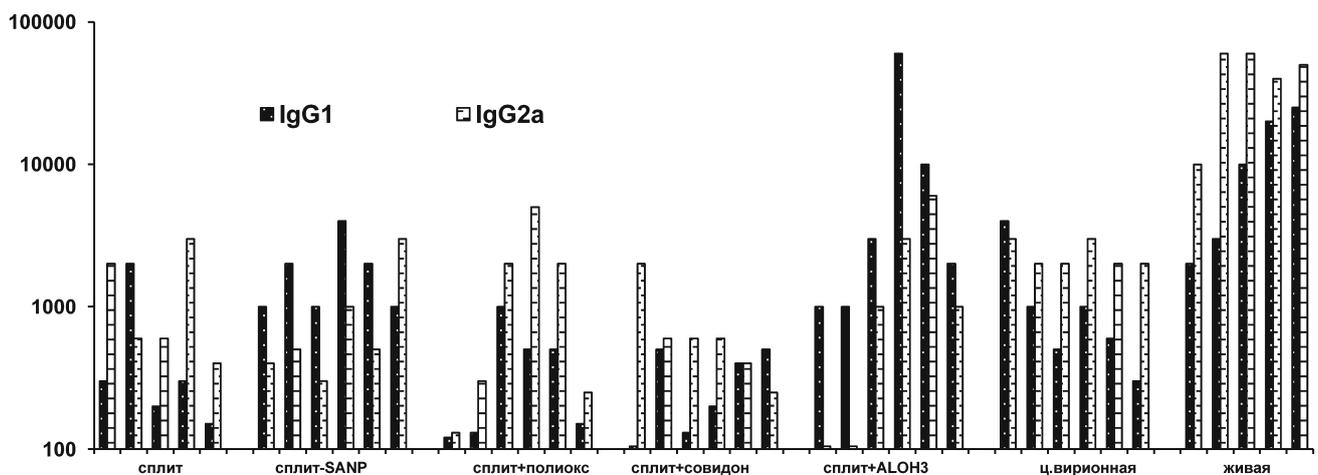


Рис. 1. Уровни анти-H5N1 IgG1 и IgG2a в сыворотках индивидуальных мышей при вакцинации сплит, сплит с добавками адъювантов, цельновирионной и живой вакцинами. Каждая пара столбцов на диаграмме показывает уровни антител у одной мыши

**Таблица 4.** IgG1 и IgG2a антитела к H5N1 в сыворотках мышей после вакцинации и динамика гибели мышей после челленджа

Вакцины	Тип антител	Титры антител (дни)*			Выживание (дни)**		
		11	18	30	7	8	9
Сплит	IgG1	37	192	203	80	50	40
	IgG2a	126	640	672			
Сплит + Al(OH) <sub>3</sub>	IgG1	197	2543	4121	100	80	70
	IgG2a	146	524	637			
Сплит + полиокс	IgG1	51	142	221	95	75	60
	IgG2a	138	670	715			
Сплит + совидон	IgG1	52	193	197	80	55	50
	IgG2a	156	450	430			
Сплит + SANP	IgG1	139	640	664	95	85	80
	IgG2a	304	658	672			
Сплит + Iso-SANP	IgG1	26	42	47	5	0	0
	IgG2a	238	182	154			
Цельновирионная	IgG1	322	354	490	100	95	95
	IgG2a	4321	4538	4216			
Живая VN-Len	IgG1	721	1583	2534	100	100	100
	IgG2a	1532	3241	10 675			
Плацебо	IgG1	<20	<20	<20	40	10	0
	IgG2a	<20	<20	<20			

\* Антитела к H5N1 на 11, 18 и 30 день после вакцинации, средние геометрические значения титров в ИФА.  
 \*\*% Выживания на 7, 8 и 9 день после контрольного заражения вирусом H5N1.  
 Каждая группа содержала 20 мышей. Различия между группой плацебо и группой «сплит + Iso-SANP» статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

нас интересовал вопрос, как влияет субклиническое заболевание вирусом гриппа на выживаемость от последующего заражения высоковирулентным вирусом другого субтипа.

Мышей инфицировали Ха вирусами H1N1 и H2N2, вирусом человека A/Nib/26/90M (H3N2) и непатогенными вирусами гриппа диких уток с гемагглютиниными H3, H4, H5 и H6. У мышей, зараженных этими вирусами, признаков заболевания не наблюдали. Через 20 дней провели контрольное заражение высокопатогенным вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1).

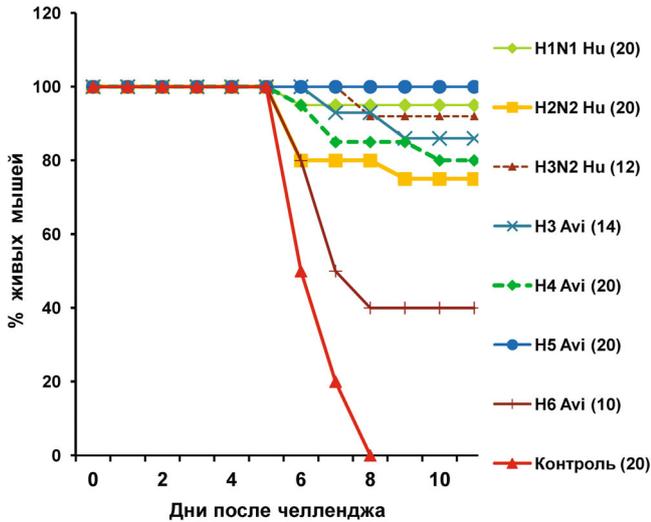
На рисунке 2 показана выживаемость предварительно инфицированных и контрольных мышей. Все контрольные мыши умерли к 8 дню, тогда как во всех ранее зараженных группах выжило 40–95% мышей. Таким образом, бессимптомная инфекция гетеросубтипическими вирусами гриппа в какой-то степени защищает от последующего заражения летальной дозой высоковирулентного вируса.

Для изучения сравнительной способности живых и инактивированных вакцин к перекрес-

стной защите от вирусов гриппа других субтипов мы иммунизировали мышей H5N1- и H1N1-вакцинами, после чего проводили челлендж высокопатогенным вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1) (рис. 3).

Мыши, вакцинированные живым Ха реассортантом H5N2, после контрольного заражения продолжали прибавлять в весе и не проявили признаков заболевания. Среди вакцинированных цельновирионной H5N1 вакциной часть мышей были угнетены, теряли аппетит, вследствие чего кривая среднего веса имеет небольшой провал на 4–7 дни. Падежа после челленджа в первых двух группах не наблюдали. В группе, вакцинированной H5N1 сплит-вакциной, кривая веса после челленджа резко идет вниз и до 50% мышей гибнет. Выжившие мыши начинали набирать вес после 10 дня.

Все мыши из группы, вакцинированной инактивированным H1N1 вирусом PR8, погибли так же, как и мыши из контрольной (не вакцинированной) группы. Мыши, иммунизированные живой Ха H1N1 вакциной A/New



**Рис. 2.** Выживаемость интактных и предварительно инфицированных гетеросубтипическими вирусами гриппа мышей после контрольного заражения вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1). Вирусы: холодадаптированный (Ха) вакцинный штамм A/New Caledonia-Leningrad/134/17/57 (H1N1 Hu), Ха вирус A/Leningrad/134/17/57 (H2N2 Hu) и вирусы человека и диких уток (обозначения в табл. 1). В скобках указано число мышей в группах. Приведен результат типичного опыта. (С цветным вариантом рис. 2 и 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

Caledonia-Leningrad/134/17/57, в первые дни после контрольного заражения заболевали и теряли в весе так же, как и контрольные мыши. Но начиная с 8-го дня, мыши начали набирать вес, и 90–100% из них выживало. Эти данные демонстрируют принципиальное различие между живыми и инактивированными вакцинами после гетеросубтипической иммунизации. Гетеросубтипическая вакцинация инактивированной вакциной бесполезна, а живая вакцина резко снижает летальность.

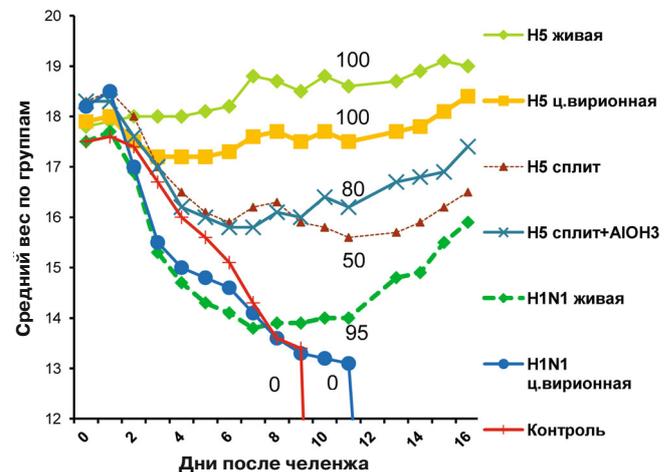
Для изучения вопроса, как влияет стандартная вакцинация от текущих штаммов на исход заболевания в случае появления нового пандемического вируса, мы вакцинировали мышей сезонной вакциной «Гриппол<sup>®</sup> плюс», содержащей поверхностные антигены вирусов: H1N1 — A/Калифорния 7/2009/, H3N2 — A/Виктория 210/208 NYMC X-187, B/Брисбен/60/2008 и 0,5 мг полиоксидония в одной человеческой дозе, а через 29 дней проводили челлендж высокопатогенным H5N1 вирусом. Группами сравнения служили мыши, вакцинированные специфической H5N1 сплит-вакциной, и интактные мыши. Кривые выживаемости после челленджа приведены на рис. 4.

В согласии с нашими предыдущими данными однократная вакцинация специфической сплит-вакциной обеспечила 40% выживаемость

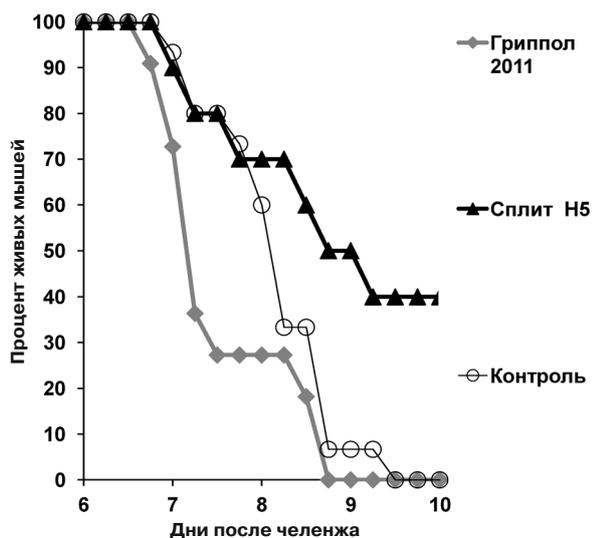
при том, что все контрольные мыши погибли к 9-му дню. Мыши, иммунизированные неспецифической вакциной «Гриппол», не только погибли поголовно, но и начали гибнуть на день раньше контрольных мышей.

Схожий результат был получен при вакцинации мышей поверхностными антигенами H3N2 вируса A/NIB/26/90 с полиоксидонием (2 мкг HA + 100 мкг полиоксидония на мышью) и последующим челленджем пандемическим H1N1 вирусом. Вирулентность H1N1 вируса A/Hamburg/5/2009 была повышена путем 7 пассажей через мышинные легкие, что привело к заменам HA-Asp225Gly и HA-Lys123Asn. У контрольных мышей этот вирус вызывал хорошо регистрируемое заболевание с максимальной потерей веса к 5–7 дню после заражения, после чего мыши начинали набирать вес и, как правило, выздоравливали к 10-му дню.

На рисунке 5 представлены индивидуальные кривые веса вакцинированных и контрольных мышей после челленджа. Видно, что большинство вакцинированных мышей теряет в весе сильнее и начинают выздоравливать в среднем на два дня позже, чем контрольные мыши. Вероятно, предварительная гетеросубтипическая вакцинация истощает иммунную систему и замедляет образование защитных антител, что и обуславливает наблюдаемые эффекты повышения летальности и замедления выздоровления.



**Рис. 3.** Динамика веса мышей, иммунизированных специфическими и гетеросубтипическими вакцинами, после челленджа H5N1 вирусом. Цельновирионная, сплит, сплит+Al(OH)<sub>3</sub> — H5N1 вакцины; живая H5 — Ха реассортант VN-Len (H5N2), цельновирионная инактивированная H1N1 — A/Puerto Rico/8/34, живая H1N1 — Ха вакцина A/New Caledonia-Leningrad/134/17/57. В каждой группе было по 20 мышей. Под кривыми среднего веса указан процент выживания в данной группе. Приведен результат типичного опыта



**Рис 4.** Выживаемость мышей, вакцинированных специфической и гетеросубтипической сплит-вакцинами, после челленджа вирусом H5N1. Состав субъединичной вакцины «Гриппол<sup>®</sup> плюс» и сплит-Н5 вакцины описан в разделе «Материалы и методы» и в табл. 2. Различия между группами статистически значимы ( $p = 0,09$ ; логарифмический критерий). Приведен результат типичного опыта

**Выводы:**

- 1) Гетеросубтипическая вакцинация живой вакциной не предотвращает заболевания при последующем заражении H5N1 вирусом, но способствует выздоровлению и практически полностью предотвращает гибель мышей.
- 2) Гетеросубтипическая вакцинация инактивированной цельновирионной вакциной не обеспечивает никакой защиты от последующего заражения H5N1 вирусом.
- 3) Гетеросубтипическая субъединичная вакцина с полиоксидонием делает мышей более уязвимыми к последующему заражению H5N1 и H1N1 вирусами.

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Стратегия вакцинации против гриппа продолжает оставаться предметом дискуссий. В прошлом веке считалось, что вакцинироваться должны только люди из групп риска.

В 2003 году Всемирная ассамблея здравоохранения рекомендовала увеличить охват вакцинацией против гриппа с целью достижения к 2006 году охвата пожилого населения не менее, чем на 50% ([http://www.who.int/immunization/sage/1\\_WHA56\\_19\\_](http://www.who.int/immunization/sage/1_WHA56_19_)).

В 2005 году, из-за опасений по поводу пандемии H5N1, вторая совместная комиссия Всемирной/Европейской Организаций Здравоохранения рекомендовала пересмотреть политику

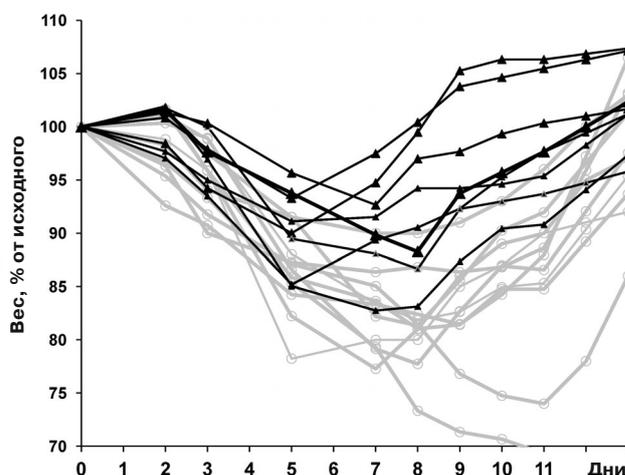
вакцинации против сезонного гриппа. Цель состояла в том, чтобы увеличить сезонное потребление и тем самым способствовать увеличению глобального потенциала производства противогриппозных вакцин [69].

В 2012 году Стратегическая консультативная группа экспертов ВОЗ рекомендовала причислить беременных женщин к группам риска, которым показана вакцинация против сезонного гриппа. Другими группами риска были: работники здравоохранения, дети в возрасте 6–59 месяцев, пожилые люди и лица с высоким уровнем риска ([www.who.int/wer/2012/wer8721.pdf](http://www.who.int/wer/2012/wer8721.pdf)).

В 2017 году Рекомендация Центра по контролю и профилактике заболеваний гласила: «Каждый человек в возрасте 6 месяцев и старше, включая беременных женщин и людей с определенными заболеваниями, должен проходить вакцинацию против гриппа каждый сезон, за редким исключением» (<https://www.cdc.gov/features/fluhighrisk/index.html>).

Такие рекомендации могут вызывать скептицизм, учитывая умеренную эффективность вакцинации в межпандемический период и риск побочных эффектов [2]. Ежегодная вакцинация может привести к негативному взаимодействию предыдущей и текущей вакцинаций [60, 59].

В некоторых странах практикуется ежегодная вакцинация школьников от гриппа [70]. Од-



**Рис 5.** Динамика веса мышей, вакцинированных субъединицами H3N2 вируса с полиоксидонием, после челленджа пандемическим вирусом A/Hamburg/5/2009-MA (H1N1). Представлены индивидуальные кривые веса для каждой мыши. Черные кривые – неиммунизированные мыши, серые кривые – мыши, вакцинированные гетеросубтипической вакциной с полиоксидонием. Состав вакцины приведен в табл. 2. Различия в продолжительности заболевания между группами статистически значимы ( $p = 0,03$ ; логарифмический критерий). Показан результат типичного эксперимента

нако такая практика может вызывать беспокойство. Ежегодные вакцины против гриппа эффективны против сезонного гриппа, но могут сделать людей более уязвимыми к новым пандемиям [71]. «У невакцинированных здоровых детей наблюдали возраст-зависимое повышение специфической реакции CD8<sup>+</sup> Т-клеток на вирус гриппа, которое отсутствовало у привитых детей. Вакцинация против гриппа эффективна против сезонного гриппа, но препятствует развитию вирус-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеточных ответов» [72].

Было показано, что «цитотоксические Т-лимфоциты, распознающие эпитопы вируса гриппа А, расположенные в относительно консервативных белках, таких как нуклеопротеин, перекрестно реагируют с различными субтипами. Это подразумевает, что эти CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты могут способствовать защитному гетеросубтипическому иммунитету, вызванному случайной инфекцией вирусом гриппа А» [73].

Повторные прививки инактивированными субъединичными вакцинами предотвращают естественную иммунизацию циркулирующими вирусами гриппа. Антитела вырабатываются только к поверхностным белкам и не обеспечивают перекрестную защиту от новых штаммов. В случае пандемии такие неоднократно привитые дети особенно уязвимы.

Инактивированные вакцины не эффективны против гетеросубтипической инфекции [73, 74]. Сезонная инактивированная вакцина 2009–2010 гг. не обеспечивала защиту от пандемического вируса [75]. В то же время перекрестную защиту при использовании живых вакцин отмечали многие авторы [73, 76–80].

В полном соответствии с вышеуказанными работами наше исследование показывает, что иммунитет, индуцируемый живым вирусом, не только предотвращает заражение близкородственными вирусами, но также обеспечивает частичную защиту от антигенно удаленных вирусов гриппа. Сравнение способности различных типов вакцин к перекрестной защите показало, что предшествующее заражение любым непатогенным вирусом гриппа (адаптированная к холоду вакцина, малопатогенный вирус человека или вирус диких птиц) обеспечивает защиту от заражения гетеросубтипическим вирусом, в то время как иммунизация инактивированной вакциной совершенно бесполезна в таком случае.

В ходе изучения экспериментальных адъювантных композиций мы обнаружили, что мыши, вакцинированные сплит-вакциной с адъювантом Iso-SANP, после контрольного зараже-

ния гибнут даже раньше, чем те, которые не были вакцинированы. Некоторые из адъювантов, будучи безопасными для мышей и повышающими уровень антител после вакцинации, влияли на выживаемость мышей после заражения в противоположном направлении.

Тем не менее иногда эффективность адъювантов определяется только путем измерения иммунного ответа, без проверки защитного эффекта [81].

Даже широко используемые в медицине полиоксидоний и гидроокись алюминия, повышая среднестатистические показатели иммунного ответа и выживаемости, изменяют баланс IgG1/IgG2 и увеличивают разброс уровня антител между животными – в результате чего у отдельных животных блокируется либо клеточный, либо гуморальный иммунитет. Большой разброс в уровнях антител у разных животных и резкий сдвиг в уровнях IgG1/IgG2 вызывают беспокойство, поскольку при увеличении средней эффективности такие адъюванты в отдельных случаях приносят вред.

Редкие нарушения иммунной системы могут остаться незамеченными в человеческих испытаниях. Это требует особой осторожности при использовании адъювантных вакцин. Вакцина может быть признана пригодной для практического использования, но при широком применении, у отдельных привитых могут возникать недопустимые осложнения.

Стратегия вакцинации против гриппа должна учитывать не только защиту от эпидемических штаммов, но и возможный риск новой пандемии. В последнем случае лица, вакцинированные живыми вакцинами, будут частично защищены, а привитые субъединичными адъювантными вакцинами могут оказаться в более опасном положении, чем непривитые.

**Финансирование.** Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 11-04-00517-а и № 17-04-00148-а).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность доктору R. Donis (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) за предоставление вакцинного штамма VN5N1-PR8/CDC-RG; доктору Л.Г. Руденко (Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург) за предоставление штаммов A/Leningrad/134/17/57 и A/New Caledonia-Leningrad/134/17/57; доктору С.С. Ямниковой (Институт вирусологии им. Ивановского, Москва) за предоставление штамма A/Chicken/Kurgan/3/2005; доктору J. Robertson (National Institute for Biological

Standards and Control, United Kingdom) за предоставление штамма A/Nib/26/90-M и доктору М.Н. Матросовичу (Institute of Virology, Philipps University, Marburg, Germany) за предоставление штамма A/Hamburg/5/2009 (H1N1).

**Вклад авторов.** Каплун А.П., Красильников И.В. и Гамбарян А.С. — проектирование экспериментов; Боровлева Е.Ю. и Луничин А.В. — экспериментальная часть; Боровлева Е.Ю. и Гамбарян А.С. — написание статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все процедуры, выполненные с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждений, в которых проводились исследования и согласно документу: «Международные рекомендации (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (<http://www.msu.ru/bioetika/doc/recom.doc>).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chung, J. R., Rolfes, M. A., Flannery, B., Prasad, P., O'Halloran, A., Garg, S., Fry, A. M., Singleton, J. A., Patel, M., and Reed, C. (2020) Effects of influenza vaccination in the United States during the 2018-2019 influenza season, *Clin. Infect. Dis.*, doi: 10.1093/cid/ciz1244.
- Demicheli, V., Jefferson, T., Ferroni, E., Rivetti, A., and Di Pietrantonj, C. (2018) Vaccines for preventing influenza in healthy adults, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2**, CD001269, doi: 10.1002/14651858.CD001269.pub6.
- Grohskopf, L. A., Sokolow, L. Z., Broder, K. R., Walter, E. B., Bresee, J. S., Fry, A. M., and Jernigan, D. B. (2017) Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the advisory committee on immunization practices – United States, 2017–18 influenza season, *MMWR Recomm. Rep.*, **66**, 1-20, doi: 10.15585/mmwr.r6602a1.
- Budimir, N., de Haan, A., Meijerhof, T., Gostick, E., Price, D. A., Huckriede, A., and Wilschut, J. (2013) Heterosubtypic cross-protection induced by whole inactivated influenza virus vaccine in mice: influence of the route of vaccine administration, *Influenza Other Respir. Viruses*, **7**, 1202-1209, doi: 10.1111/irv.12142.
- Onodera, T., Hosono, A., Odagiri, T., Tashiro, M., Kaminogawa, S., Okuno, Y., Kurosaki, T., Ato, M., Kobayashi, K., and Takahashi, Y. (2016) Whole-virion influenza vaccine recalls an early burst of high-affinity memory B cell response through TLR signaling, *J. Immunol.*, **196**, 4172-4184.
- Ato, M., Takahashi, Y., Fujii, H., Hashimoto, S., Kaji, T., Itamura, S., Horiuchi, Y., Arakawa, Y., Tashiro, M., and Takemori, T. (2013) Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- $\alpha$ -dependent apoptosis, *Vaccine*, **31**, 2184-2190, doi: 10.1016/j.vaccine.2013.02.016.
- Jefferson, T. O., Rivetti, D., Di Pietrantonj, C., Rivetti, A., and Demicheli, V. (2010) Vaccines for preventing influenza in healthy adults, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **7**, CD001269, doi: 10.1002/14651858.CD001269.pub4.
- Allwinn, R., and Doerr, H. W. (2011) Comparison of seasonal influenza vaccines: composition and properties, *Dtsch. Med. Wochenschr.*, **136**, 2315-2318, doi: 10.1055/s-0031-1292046.
- Even-Or, O., Samira, S., Ellis, R., Kedar, E., and Barenholz, Y. (2013) Adjuvanted influenza vaccines, *Expert Rev. Vaccines*, **9**, 1095-1108, doi: 10.1586/14760584.2013.825445.
- Black, S. (2015) Safety and effectiveness of MF-59 adjuvanted influenza vaccines in children and adults, *Vaccine*, **33**, Suppl. 2:B3-5, doi: 10.1016/j.vaccine.2014.11.062.
- Guo, Q., Liu, Z., Gao, J., Zhou, J., Hu, W., Cun, Y., Li, W., and Liao, G. (2016) Immunogenicity and safety of pandemic influenza H5N1 vaccines in healthy adults through meta-analysis, *Cell. Physiol. Biochem.*, **40**, 921-932.
- Seo, Y. B., Choi, W. S., Lee, J., Song, J. Y., Cheong, H. J., and Kim, W. J. (2014) Comparison of the immunogenicity and safety of the conventional subunit, MF59-adjuvanted, and intradermal influenza vaccines in the elderly, *Clin. Vaccine Immunol.*, **21**, 989-996, doi: 10.1128/CI.00615-13.
- Vesikari, T., Forstén, A., Arora, A., Tsai, T., and Clemens, R. (2015) Influenza vaccination in children primed with MF59-adjuvanted or non-adjuvanted seasonal influenza vaccine, *Hum. Vaccin. Immunother.*, **11**, 2102-2112, doi: 10.1080/21645515.2015.1044167.
- Vesikari, T., Kirstein, J., Devota Go, G., Leav, B., Ruzicky, M. E., Isakov, L., de Bruijn, M., Oberye, J., and Heijnen, E. (2018) Efficacy, immunogenicity, and safety evaluation of an MF59-adjuvanted quadrivalent influenza virus vaccine compared with non-adjuvanted influenza vaccine in children: a multicentre, randomised controlled, observer-blinded, phase 3 trial, *Lancet Respir. Med.*, **6**, 345-356.
- Wang, J., Hilchey, S. P., DeDiego, M., Perry, S., Hyrien, O., Nogales, A., Garigen, J., Amanat, F., Huertas, N., Krammer, F., Martinez-Sobrido, L., Topham, D. J., Treanor, J. J., Sangster, M. Y., and Zand, M. S. (2018) Broad cross-reactive IgG responses elicited by adjuvanted vaccination with recombinant influenza hemagglutinin (rHA) in ferrets and mice, *PLoS One*, **13**, e0193680, doi: 10.1371/journal.pone.0193680.
- Couch, R. B., Bayas, J. M., Caso, C., Mbawuik, I. N., López, C. N., Claeys, C., El Idrissi, M., Hervé, C., Laupèze, B., Oostvogels, L., and Moris, P. (2014) Superior antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response with AS03-adjuvanted of a trivalent influenza vaccine in a randomised trial of adults aged 65 and older, *BMC Infect. Dis.*, **14**, 425, doi: 10.1186/1471-2334-14-425.
- Song, J. Y., Choi, M. J., Noh, J. Y., Choi, W. S., Cheong, H. J., Wie, S. H., Lee, J. S., Woo, G. J., Lee, S. H., and Kim, W. J. (2017) Randomized, double-blind, multicenter, phase III clinical trial to evaluate the immunogenicity and safety of MG1109 (egg-based pre-pandemic influenza A/H5N1 vaccine) in healthy adults, *Hum. Vaccin. Immunother.*, **13**, 1190-1197, doi: 10.1080/21645515.2016.1263410.
- Li, P., and Wang, F. (2015) Polysaccharides: candidates of promising vaccine adjuvants, *Drug Discov. Ther.*, **9**, 88-93, doi: 10.5582/ddt.2015.01025.
- Van de Sandt, C. E., Kreijtz, J. H., Geelhoed-Mieras, M. M., Vogelzang-van Trierum, S. E., Nieuwkoop, N. J., van de Vijver, D. A., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D., Morein, B., and Rimmelzwaan, G. F. (2014) Novel G3/DT adjuvant promotes the induction of protective T cells responses after vaccination with a seasonal trivalent inactivated split-virion influenza vaccine, *Vaccine*, **32**, 5614-5623, doi: 10.1016/j.vaccine.2014.08.003.
- Hjertner, B., Bengtsson, T., Morein, B., Paulie, S., and Fossum, C. (2018) A novel adjuvant G3 induces both Th1

- and Th2 related immune responses in mice after immunization with a trivalent inactivated split-virion influenza vaccine, *Vaccine*, **36**, 3340-3344, doi: 10.1016/j.vaccine.2018.04.054.
21. Christensen, D., Christensen, J. P., Korsholm, K. S., Isling, L. K., Erneholm, K., Thomsen, A. R., and Andersen, P. (2018) Seasonal influenza split vaccines confer partial cross-protection against heterologous influenza virus in ferrets when combined with the CAF01 adjuvant, *Front. Immunol.*, **8**, 1928, doi: 10.3389/fimmu.2017.01928.
  22. Baldwin, S. L., Hsu, F.-C., Van Hoesen, N., Gage, E., Granger, B., Guderian, J. A., Larsen, S. E., Lorenzo, E. C., Haynes, L., Reed, S. G., and Coler, R. N. (2018) Improved immune responses in young and aged mice with adjuvanted vaccines against H1N1 influenza infection, *Front. Immunol.*, **9**, 295, doi: 10.3389/fimmu.2018.00295.
  23. Lin, P. H., Wong, W. I., Wang, Y. L., Hsieh, M. P., Lu, C. W., Liang, C. Y., Jui, S. H., Wu, F. Y., Chen, P. J., and Yang, H. C. (2018) Vaccine-induced antigen-specific regulatory T cells attenuate the antiviral immunity against acute influenza virus infection, *Mucosal Immunol.*, doi: 10.1038/s41385-018-0004-9.
  24. Hyejin, K., Kimoto, T., Sakai, S., Takahashi, E., and Kido, H. (2018) Adjuvanting influenza hemagglutinin vaccine with a human pulmonary surfactant-mimicking synthetic compound SF-10 induces local and systemic cell-mediated immunity in mice, *PLoS One*, **13**, e0191133, doi: 10.1371/journal.pone.0191133.
  25. Uraki, R., Das, S. C., Hatta, M., Kiso, M., Iwatsuki-Horimoto, K., Ozawa, M., Coban, C., Ishii, K. J., and Kawaoka, Y. (2014) Hemozoin as a novel adjuvant for inactivated whole virion influenza vaccine, *Vaccine*, **32**, 5295-5300, doi: 10.1016/j.vaccine.2014.07.079.
  26. Ельчина Г. А., Горбунов М. А., Шерварли В. И., Лонская Н. И., Павлова Л. И., Хайтов Р. М., Некрасов А. В., Иванова А. С., Магросович М. Н., Пучкова Н. Г., Белашев В. П., Малиновский А. А. (1998) Оценка эффективности противогриппозной трехвалентной полимерной субъединичной вакцины «Гриппол», *Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.*, **3**, 40-43.
  27. Shannon, I., White, C. L., and Nayak, J. L. (2019) Understanding immunity in children vaccinated with live attenuated influenza vaccine, *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.*, **9**, (Supplement 1), S10-S14, doi: 10.1093/jpids/piz083.
  28. Subbarao, K. (1999) Influenza vaccines: present and future, *Adv. Virus Res.*, **54**, 349-373.
  29. Piedra, P. A., Gaglani, M. J., Kozinetz, C. A., Herschler, G. B., Fewlass, C., Harvey, D., Zimmerman, N., and Glezen, W. P. (2007) Trivalent live attenuated intranasal influenza vaccine administered during the 2003-2004 influenza type A (H3N2) outbreak provided immediate, direct, and indirect protection in children, *Pediatrics*, **120**, e553-e564.
  30. Carter, N. J., and Curran, M. P. (2011) Live attenuated influenza vaccine (FluMist®; Fluenz™): a review of its use in the prevention of seasonal influenza in children and adults, *Drugs*, **71**, 1591-1622.
  31. Hoft, D. F., Babusis, E., Worku, S., Spencer, C. T., Lottenbach, K., Truscott, S. M., Abate, G., Sakala, I. G., Edwards, K. M., Creech, C. B., Gerber, M. A., Bernstein, D. I., Newman, F., Graham, I., Anderson, E. L., and Belshe, R. B. (2011) Live and inactivated influenza vaccines induce similar humoral responses, but only live vaccines induce diverse T-cell responses in young children, *J. Infect. Dis.*, **204**, 845-853, doi: 10.1093/infdis/jir436.
  32. Chen, G. L., Lau, Y. F., Lamirande, E. W., McCall, A. W., and Subbarao, K. (2011) Seasonal influenza infection and live vaccine prime for a response to the 2009 pandemic H1N1 vaccine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 1140-1145.
  33. Loving, C. L., Vincent, A. L., Pena, L., and Perez, D. R. (2012) Heightened adaptive immune responses following vaccination with a temperature-sensitive, live-attenuated influenza virus compared to adjuvanted, whole-inactivated virus in pigs, *Vaccine*, **30**, 5830-5838, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.07.033.
  34. Osterholm, M. T., Kelley, N. S., Sommer, A., and Belongia, E. A. (2012) Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Infect. Dis.*, **12**, 36-44, doi: 10.1016/S1473-3099(11)70295-X.
  35. Moore, D. L., Canadian Paediatric Society, and Infectious Diseases and Immunization Committee (2014) Vaccine recommendations for children and youth for the 2014/2015 influenza season, *Paediatr. Child. Health*, **19**, 440-444.
  36. Andersohn, F., Bornemann, R., Damm, O., Frank, M., Mittendorf, T., and Theidel, U. (2014) Vaccination of children with a live-attenuated, intranasal influenza vaccine – analysis and evaluation through a Health Technology Assessment, *GMS Health Technol Assess*, **10**, Doc03, doi: 10.3205/hta000119.
  37. Helmeke, C., Gräfe, L., Irmscher, H.-M., Gottschalk, C., Karagiannis, I., Oppermann, H. (2015) Effectiveness of the 2012/13 trivalent live and inactivated influenza vaccines in children and adolescents in Saxony-Anhalt, Germany: a test-negative case-control study, *PLoS One*, **10**, e0122910, doi: 10.1371/journal.pone.0122910.
  38. Schotsaert, M., and García-Sastre, A. (2017) Inactivated influenza virus vaccines: the future of TIV and QIV, *Curr. Opin. Virol.*, **23**, 102-106, doi: 10.1016/j.coviro.2017.04.005.
  39. Brooks, W. A., Zaman, K., Lewis, K. D., Ortiz, J. R., Goswami, D., Feser, J., Sharmeen, A. T., Nahar, K., Rahman, M., Rahman, M. Z., Barin, B., Yunus, M., Fry, A. M., Bresee, J., Azim, T., and Neuzil, K. M. (2016) Efficacy of a Russian-backbone live attenuated influenza vaccine among young children in Bangladesh: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet Glob. Health*, **4**, e946-e954, doi: 10.1016/S2214-109X(16)30200-5.
  40. Raburn, M. M., Yu, J., Kameo, S., Tanaka, M., Rito, K., Itoh, Y., and Dubovsky, F. (2018) The safety and efficacy of quadrivalent live attenuated influenza vaccine in Japanese children aged 2-18 years: results of two phase 3 studies, *Influenza Other Respir. Viruses*, **12**, 438-445, doi: 10.1111/irv.12555.
  41. Sarntivijai, S., Xiang, Z., Shedden, K. A., Markel, H., Omenn, G. S., Athey, B. D., and He, Y. (2012) Ontology-based combinatorial comparative analysis of adverse events associated with killed and live influenza vaccines, *PLoS One*, **7**, e49941, doi: 10.1371/journal.pone.0049941.
  42. Ambrose, C. S., Levin, M. J., and Belshe, R. B. (2011) The relative efficacy of trivalent live attenuated and inactivated influenza vaccines in children and adults, *Influenza Other Respir. Viruses*, **5**, 67-75.
  43. Ambrose, C. S., Dubovsky, F., Yi, T., Belshe, R. B., and Ashkenazi, S. (2012) The safety and efficacy of live attenuated influenza vaccine in young children with asthma or prior wheezing, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **31**, 2549-2557.
  44. Turner, P. J., Southern, J., Andrews, N. J., Miller, E., Erlewyn-Lajeunesse, M., and SNIFFLE study investigators (2015) Collaborators (12) safety of live attenuated influenza vaccine in atopic children with egg allergy, *J. Allergy. Clin. Immunol.*, **136**, 376-381, doi: 10.1016/j.jaci.2014.12.1925.
  45. Duffy, J., Lewis, M., Harrington, T., Baxter, R., Belongia, E. A., Jackson, L. A., Jacobsen, S. J., Lee, G. M., Naleway, A. L., Nordin, J., Daley, M. F., and Vaccine Safety Datalink (2017) Live attenuated influenza vaccine use and safety in children and adults with asthma, *Ann. Allergy*

- Asthma Immunol.*, **118**, 439-444, doi: 10.1016/j.anai.2017.01.030.
46. Turner, P. J., Fleming, L., Saglani, S., Southern, J., Andrews, N. J., Miller, E., and SNIFFLE-4 study investigators (2019) Safety of live attenuated influenza vaccine (LAIV) in children with moderate to severe asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.*, doi: 10.1016/j.jaci.2019.12.010.
  47. Basha, S., Hazenfeld, S., Brady, R. C., and Subbramanian, R. A. (2011) Comparison of antibody and T-cell responses elicited by licensed inactivated- and live-attenuated influenza vaccines against H3N2 hemagglutinin, *Hum. Immunol.*, **72**, 463-469, doi: 10.1016/j.humimm.2011.03.001.
  48. Cheng, X., Zengel, J. R., Suguitan, A. L. Jr., Xu, Q., Wang, W., Lin, J., and Jin, H. (2013) Evaluation of the humoral and cellular immune responses elicited by the live attenuated and inactivated influenza vaccines and their roles in heterologous protection in ferrets, *J. Infect. Dis.*, **208**, 594-602, doi: 10.1093/infdis/jit207.
  49. Cao, R. G., Suarez, N. M., Obermoser, G., Lopez, S. M., Flano, E., Mertz, S. E., Albrecht, R. A., Garcia-Sastre, A., Mejias, A., Xu, H., Qin, H., Blankenship, D., Palucka, K., Pascual, V., and Ramilo, O. (2014) Differences in antibody responses between trivalent inactivated influenza vaccine and live attenuated influenza vaccine correlate with the kinetics and magnitude of interferon signaling in children, *J. Infect. Dis.*, **210**, 224-233, doi: 10.1093/infdis/jiu079.
  50. Tricco, A. C., Chit, A., Soobiah, C., Hallett, D., Meier, G., Chen, M. H., Tashkandi, M., Bauch, C. T., and Loeb, M. (2013) Comparing influenza vaccine efficacy against mismatched and matched strains: a systematic review and meta-analysis, *BMC Med.*, **11**, 153, doi: 10.1186/1741-7015-11-153.
  51. Junwei, L., Arévalo, M. T., Chen, Y., Chen, S., and Zeng, M. (2014) T-cell-mediated cross-strain protective immunity elicited by prime-boost vaccination with a live attenuated influenza vaccine, *Int. J. Infect. Dis.*, **27**, 37-43, doi: 10.1016/j.ijid.2014.05.016.
  52. Nohynek, H., Baum, U., Syrjänen, R., Ikonen, N., Sundman, J., and Jokinen, J. (2016) Effectiveness of the live attenuated and the inactivated influenza vaccine in two-year-olds – a nationwide cohort study Finland, influenza season 2015/16, *Euro Surveill.*, **21**, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.38.30346.
  53. Ohmit, S. E., Victor, J. C., Rotthoff, J. R., Teich, E. R., Truscon, R. K., Baum, L. L., Rangarajan, B., Newton, D. W., Boulton, M. L., and Monto, A. S. (2006) Prevention of antigenically drifted influenza by inactivated and live attenuated vaccines, *N. Engl. J. Med.*, **355**, 2513-2522.
  54. Monto, A. S., Ohmit, S. E., Petrie, J. G., Johnson, E., Truscon, R., Teich, E., Rotthoff, J., Boulton, M., and Victor, J. C. (2009) Comparative efficacy of inactivated and live attenuated influenza vaccines, *N. Engl. J. Med.*, **361**, 1260-1267.
  55. De Hoog, M. L. A., Venekamp, R. P., Meijer, A., Sanders, E. A. M., and Brujning-Verhagen, P. C. J. L. (2019) Inactivated influenza vaccine does not reduce all cause respiratory illness in children with pre-existing medical conditions, *Vaccine*, doi: 10.1016/j.vaccine.2019.11.086.
  56. Petrie, J. G., Malosh, R. E., Cheng, C. K., Ohmit, S. E., Martin, E. T., Johnson, E., Truscon, R., Eichelberger, M. C., Gubareva, L. V., Fry, A. M., and Monto, A. S. (2017) The household influenza vaccine effectiveness study: lack of antibody response and protection following receipt of 2014-2015 influenza vaccine, *Clin. Infect. Dis.*, **65**, 1644-1651, doi: 10.1093/cid/cix608.
  57. Castilla, J., Navascués, A., Fernández-Alonso, M., Reina, G., Pozo, F., Casado, I., Guevara, M., Martínez-Baz, I., Barricarte, A., Ezpeleta, C., Primary Health Care Sentinel Network, and Network for Influenza Surveillance in Hospitals of Navarra (2016) Effectiveness of subunit influenza vaccination in the 2014-2015 season and residual effect of split vaccination in previous seasons, *Vaccine*, **34**, 1350-1357, doi: 10.1016/j.vaccine.2016.01.054.
  58. Puig-Barberà, J., Guglieri-López, B., Tortajada-Girbés, M., López-Labrador, F. X., Carballido-Fernández, M., Mollar-Maseres, J., Schwarz-Chavarri, G., Baselga-Moreno, V., Mira-Iglesias, A., Díez-Domingo, J., and Valencia Hospital Network for the Study of Influenza, and Respiratory Viruses Disease (2017) Low influenza vaccine effectiveness and the effect of previous vaccination in preventing admission with A(H1N1)pdm09 or B/Victoria-Lineage in patients 60 years old or older during the 2015/2016 influenza season, *Vaccine*, **35**, 7331-7338, doi: 10.1016/j.vaccine.2017.10.100.
  59. Gherasim, A., Martínez-Baz, I., Castilla, J., Pozo, F., Larrauri, A., and the cycEVA working group (2017) Effect of previous and current vaccination against influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2), and B during the post-pandemic period 2010-2016 in Spain, *PLoS One*, **12**, e0179160, doi: 10.1371/journal.pone.0179160.
  60. Rondy, M., Launay, O., Castilla, J., Costanzo, S., Puig-Barberà, J., Gefenaite, G., Larrauri, A., Rizzo, C., Pitigoi, D., Syrjänen, R. K., Machado, A., Kurečić Filipović, S., Krisztina Horváth, J., Paradowska-Stankiewicz, I., Marbus, S., InNHOVE/I-MOVE+working group, and Moren, A. (2017) Repeated seasonal influenza vaccination among elderly in Europe: effects on laboratory confirmed hospitalised influenza, *Vaccine*, **35**, 4298-4306, doi: 10.1016/j.vaccine.2017.06.088.
  61. He, D. H., Chiu, A. P. Y., Wu, J. T. K., and Cowling, B. J. (2019) Pre-pandemic live-attenuated influenza vaccine, *Hong Kong Med. J.*, **25**, (Suppl. 9), S24-S27.
  62. Ломакина Н. Ф., Гамбарян А. С., Боравлева Е. Ю., Кропоткина Е. А., Кириллов И. М., Лаврентьев М. М., Ямникова С. С. (2009) Характеристика апатогенного вируса гриппа А/Чайка/Москва/3100/2006 (H6N2), выделенного в Москве, *Мол. Генет. Микробиол. Вирусол.*, **1**, 32-35.
  63. Heydarov, R. N., Lomakina, N. F., Boravleva, E. Yu., Kholodilov, I. S., Gambaryan, A. S., Mikhailovich, V. M., and Fesenko, E. E. (2017) The use of microarrays for the identification of the origin of genes of avian influenza viruses in wild birds, *Microbiol. Independ. Res. J.*, **4**, 21-30, doi: 10.18527/2500-2236-2017-4-1-21-30.
  64. Gambaryan, A. S., Lomakina, N. F., Boravleva, E. Y., Kroptkina, E. A., Mashin, V. V., Krasilnikov, I. V., Klimov, A. I., and Rudenko, L. G. (2012) Comparative safety, immunogenicity and efficacy of several anti-H5N1 influenza experimental vaccines in a mouse and chicken models, *Influenza Other Respir. Viruses*, **6**, 188-195.
  65. Гамбарян А. С., Ломакина Н. Ф., Боравлева Е. Ю., Мочалова Л. В., Садыкова Г. К., Прилипов А. Г., Матросович Т. Ю., Матросович М. Н. (2018) Изменение вирулентности пандемического вируса гриппа А(H1N1), обусловленное мутациями гемогглиотинина и полимеразы, *Мол. Биол.*, **52**, 644-658, doi: 10.1134/S0026898418040055.
  66. Каплун А. П., Безруков Д. А., Попенко В. И., Швец В. И. (2011) Сферические аморфные наночастицы из трипереноидов коры березы – новый тип субмикронного носителя для доставки лекарств, *Росс. Журн. Биофарм.*, **3**, 28-40.
  67. Ovcharenko, A. V., and Zhirnov, O. P. (1994) Aprotinin aerosol treatment of influenza and para-myxovirus bronchopneumonia of mice, *Antiviral Res.*, **23**, 107-118.
  68. Gambaryan, A. S., Boravleva, E. Y., Matrosovich, T. Y., Matrosovich, M. N., Klenk, H. D., Moiseeva, E. V., Tuzikov, A. B., Chinarev, A. A., Pazygina, G. V., and

- Bovin, N. V. (2005) Polymer-bound 6' sialyl-N-acetylactosamine protects mice infected by influenza virus, *Antiviral Res.*, **68**, 116–123.
69. Pandemic influenza preparedness planning, *Report on the second joint WHO/European Commission workshop, Copenhagen, 24–26 October 2005*, [http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO\\_CDS\\_CSR\\_GIP\\_2005\\_5.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_5.pdf)
  70. Fiore, A. E., Epperson, S., Perrotta, D., Bernstein, H., and Neuzil, K. (2012) Expanding the recommendations for annual influenza vaccination to school-age children in the United States, *Pediatrics*, **129**, Suppl. 2, S54–S62, doi: 10.1542/peds.2011-0737C.
  71. Bodewes, R., Fraaij, P. L., Kreijtz, J. H., Geelhoed-Mieras, M. M., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D., and Rimmelzwaan, G. F. (2012) Annual influenza vaccination affects the development of heterosubtypic immunity, *Vaccine*, **30**, 7407–7410.
  72. Bodewes, R., Fraaij, P. L., Osterhaus, A. D., and Rimmelzwaan, G. F. (2012b) Pediatric influenza vaccination: understanding the T-cell response, *Expert Rev. Vaccines*, **11**, 963–971.
  73. Hillaire, M. L., Osterhaus, A. D., and Rimmelzwaan, G. F. (2011) Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes as a basis for the development of broadly protective influenza vaccines, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011**, 939860.
  74. Красильников И. В., Гамбарян А. С., Машин В. В., Лобастова А. К. (2010) Иммуногенные и протективные свойства инактивированных и живых кандидатных вакцин против высокопатогенных вирусов H5N1, *Вопр. Вирусол.*, **4**, 16–20.
  75. Pelat, C., Falchi, A., Carrat, F., Mosnier, A., Bonmarin, I., Turbelin, C., Vaux, S., Werf, S., Cohen, J. M., Lina, B., Blanchon, T., and Hanslik, T. (2011) Field effectiveness of pandemic and 2009–2010 seasonal vaccines against 2009–2010 A(H1N1) influenza: estimations from surveillance data in France, *PLoS One*, **6**, e19621, doi: 10.1371/journal.pone.0019621.
  76. Lu, X., Edwards, L. E., Desheva, J. A., Nguyen, D. C., Rekstin, A., Stephenson, I., Szretter, K., Cox, N. J., Rudenko, L. G., Klimov, A., Katz, J. M. (2006) Cross-protective immunity in mice induced by live-attenuated or inactivated vaccines against highly pathogenic influenza A (H5N1) viruses, *Vaccine*, **24**, 6588–6593.
  77. Kreijtz, J. H., Bodewes, R., van Amerongen, G., Kuiken, T., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D., and Rimmelzwaan, G. F. (2007) Primary influenza A virus infection induces cross-protective immunity against a lethal infection with a heterosubtypic virus strain in mice, *Vaccine*, **25**, 612–620.
  78. Jang, Y. H., and Seong, B. L. (2013) Cross-protective immune responses elicited by live attenuated influenza vaccines, *Yonsei Med. J.*, **54**, 271–282.
  79. Sun, K., Ye, J., Perez, D. R., and Metzger, D. W. (2011) Seasonal FluMist vaccination induces cross-reactive T cell immunity against H1N1 (2009) influenza and secondary bacterial infections, *J. Immunol.*, **186**, 987–993.
  80. Chen, G. L., Min, J. Y., Lamirande, E. W., Santos, C., Jin, H., Kemble, G., and Subbarao, K. (2011) Comparison of a live attenuated 2009 H1N1 vaccine with seasonal influenza vaccines against 2009 pandemic H1N1 virus infection in mice and ferrets, *J. Infect. Dis.*, **203**, 930–936, doi: 10.1093/infdis/jiq144.
  81. Beyer, W. E. P., Palache, A. M., Reperant, L. A., Boulfich, M., and Osterhaus, A. D. M. E. (2020) Association between vaccine adjuvant effect and pre-seasonal immunity. Systematic review and meta-analysis of randomised immunogenicity trials comparing squalene-adjuvanted and aqueous inactivated influenza vaccines, *Vaccine*, **38**, 1614–1622, doi: 10.1016/j.vaccine.2019.12.037.

## THE IMMUNE RESPONSE AND PROTECTIVE EFFICACY OF INACTIVATED AND LIVE INFLUENZA VACCINE AGAINST HOMOLOGOUS AND HETEROSUBTYPIC CHALLENGE\*

E. Y. Boravleva<sup>1</sup>, A. V. Lunitsin<sup>2</sup>, A. P. Kaplun<sup>3</sup>,  
N. V. Bykova<sup>3</sup>, I. V. Krasilnikov<sup>4</sup>, and A. S. Gambaryan<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences, 108819 Moscow, Russia; E-mail: al.gambaryan@gmail.com

<sup>2</sup> FSBSI Federal Research Center for Virology and Microbiology, 601125 Volginsky, Vladimir Region, Russia

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow University of Fine Chemical Technology, 119571 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Saint-Peterburg Institute of Vaccines and Sera, FMBA, 198320 St. Petersburg, Russia

Received February 19, 2020

Revised March 19, 2020

Accepted March 20, 2020

Parallel testing of inactivated (whole-virion, split, subunit, and adjuvanted vaccines) and live attenuated vaccine was conducted to compare the immunogenicity and protective efficacy. Homologous and heterosubtypic protection against challenge with H5N1 and H1N1 influenza viruses in mouse model were studied. A single immunization with live or inactivated whole virion H5N1 vaccine elicited a high level of serum antibodies and provided complete protection against challenge with the lethal virus A/Chicken/Kurgan/3/05 (H5N1). Split vaccines applied in a single dose was much less effective. Adjuvants increased antibody levels. In the same time, addition of one of them (Iso-SANP) to split vaccine led to paradoxical outcome: it increased the level of antibody but reduced the protective effect of vaccine. All adjuvants tested shifted the ratio of IgG1 and IgG2a antibodies. Immunization with any of tested heterosubtypic live viruses provided partly protection against H5N1 challenge and reduced the mortality of mice to low level, while inactivated H1N1 vaccine offered no protection at all. After immunization with adjuvanted subunit vaccines and challenge with the heterosubtypic virus, we observed more severe course of illness and more rapid death compared to unvaccinated animals.

**Keywords:** influenza virus A, live and inactivated vaccine, adjuvants

УДК 577.114.5;577.21;579.841

## РАСЩЕПЛЕНИЕ ПО РАЗЛИЧНЫМ МЕХАНИЗМАМ КАПСУЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ *Acinetobacter baumannii* ФАГОВЫМИ ДЕПОЛИМЕРАЗАМИ\*

© 2020 Ю.А. Книрель<sup>1\*\*</sup>, М.М. Шнейдер<sup>2,3</sup>, А.В. Попова<sup>3,4,5</sup>,  
А.А. Касимова<sup>1,6</sup>, С.Н. Сенченкова<sup>1</sup>, А.С. Шашков<sup>1</sup>, А.О. Чижов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: uknirel@gmail.com

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт антимикробной химиотерапии, Смоленский государственный  
медицинский университет, 214019 Смоленск, Россия

<sup>4</sup> Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),  
141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

<sup>5</sup> Государственный научный центр прикладной микробиологии  
и биотехнологии, 142279 Оболensk, Московская обл., Россия

<sup>6</sup> Высший химический колледж РАН, Российский химико-технологический  
университет им. Д.И. Менделеева, 125047 Москва, Россия

Поступила в редакцию 11.03.2020

После доработки 30.03.2020

Принята к публикации 31.03.2020

Аэробные грамотрицательные бактерии *Acinetobacter baumannii* являются одним из наиболее важных клинических патогенов – возбудителей внутрибольничных инфекций во всем мире. Бактериальную клетку *A. baumannii* окружает капсула, которая состоит из толстого вязкого слоя структурно варибельного капсульного полисахарида (КПС). Капсула защищает бактерии от неблагоприятных условий окружающей среды и биологических систем, включая механизмы иммунной защиты хозяина и бактериофага. Многие фаги *A. baumannii* имеют структурные деполимеразы (хвостовые шипы), которые специфически распознают и ферментативно расщепляют бактериальные КПС. В данной работе мы изучили специфическое взаимодействие белков хвостовых шипов четырех литических бактериофагов с КПС *A. baumannii*. Деполимеразы трех бактериофагов Fri1, AS12 и BS46 идентифицированы как специфические гликозидазы, которые расщепляют КПС *A. baumannii* 28, 1432 и B05 соответственно, по гидролитическому механизму. Деполимераза gp54 бактериофага AP22 охарактеризована как полисахарид-лиаза, расщепляющая КПС *A. baumannii* 1053 по механизму  $\beta$ -элиминирования в остатках гексуроновой кислоты (ManNAcA).

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** *Acinetobacter baumannii*, бактериофаг, хвостовой шип, капсульный полисахарид, гексуроновая кислота, деполимераза, гликозидаза, полисахарид-лиаза, рецептор-связывающий белок, ЯМР-спектроскопия.

DOI: 10.31857/S032097252005005X

### ВВЕДЕНИЕ

Инфицирование бактерий специфическими бактериофагами инициируется распознаванием и прикреплением фаговых частиц к поверхнос-

ти клеток-хозяев. Эта функция выполняется рецептор-связывающими белками. Обычно фаги несут множество вариантов таких белков, которые образуют хвостовые фибриллы или хвостовые шипы. Оба типа представляют собой боль-

Принятые сокращения: КПС – капсульный полисахарид; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; FucNAc – 2-ацетамидо-2-дезоксифукоза; GalNAcA – 2-ацетамидо-2-дезоксигалактуронозная кислота; HR ESI MS – масс-спектрометрия высокого разрешения с ионизацией электрораспылением; Hb – 3-гидроксибутаноил; HMBC – гетероядерная многосвязевая корреляция; KL – K локус; Leg – 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксид-глицеро-D-галакто-нон-2-улонозная (легиоаминовая) кислота; ManNAcA – 2-ацетамидо-2-дезоксиманнуронозная кислота; QuiNAc4NAc – 2,4-диацетамидо-2,4,6-тридезоксиглюкоза (2,4-диацетамидо-2,4-дидезоксигинозоза); ROESY – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; TOCSY – полная корреляционная спектроскопия.

\* 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. 5, 2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

шие трехмерные белки, которые присоединены к базальной пластине фага своими *N*-концами, тогда как удаленные *C*-концы взаимодействуют с окружающей средой и отвечают за распознавание и связывание с рецептором. Они специфически распознают рецепторы, экспонированные на бактериальной оболочке, которые необходимы для инфицирования клетки бактериофагом. Это экзополисахариды, в том числе капсульные полисахариды (КПС), и белки наружной мембраны. В отличие от хвостовых фибрилл, хвостовые шипы обладают ферментативной активностью и способны не только связывать, но и деполимеризовать защитный полисахаридный слой на поверхности бактерий. Это обеспечивает доступ к вторичным фаговым рецепторам на внешней мембране, так что они могут быть распознаны другими фаговыми белками.

Одним из факторов вирулентности *Acinetobacter baumannii* является защитный слой КПС, который способствует патогенезу и исключительной способности выживания бактерии [1, 2]. Значительное структурное разнообразие КПС обусловлено вариабильностью генетического локуса, ответственного за биосинтез капсулы (*K*-локус, *KL*) [3–5]. К настоящему времени у штаммов *A. baumannii* выявлено более 128 типов капсульных локусов (*KL*-типов), и их число постоянно увеличивается [5]. Установлены структуры КПС более 30 *KL*-типов *A. baumannii* (см. Базу данных структур бактериальных углеводов на сайте <http://csdb.glycoscience.ru/bacterial>). КПС является первичным рецептором для большого числа бактериофагов *A. baumannii*, имеющих хвостовые шипы [6].

Для определения специфичности взаимодействия белков хвостовых шипов с КПС мы изучили расщепление КПС *A. baumannii* деполимеразами бактериофагов. Были выбраны деполимеразы четырех литических бактериофагов AP22 [7], Fri1 и AS12 [6] и BS46 [8], которые специфичны к штаммам *A. baumannii* 1053 (K91) [9], 28 (K19) [10], 1432 (K27) [11] и AC54 (K9) [12, 13] соответственно, структуры КПС которых установлены ранее. Эти штаммы распространены среди клинических изолятов в России, а штаммы, имеющие КПС типа K9, остаются среди наиболее широко распространенных и опасных в клинической практике. Продукты расщепления бактериальных КПС выделяли с помощью гель-проникающей хроматографии и анализировали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (HR ESI MS) и ЯМР-спектроскопии, которые позволили идентифицировать место расщепления в КПС и определить меха-

низм деполимеризации (гидролиз или  $\beta$ -элиминирование).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Бактериальные штаммы.** В качестве источников КПС использованы штаммы *A. baumannii* 1053, 28, 1432, AC54 и B05. Штаммы 1053, B05 и 1432 получены из «ГКПМ-Оболенск» (инвентарные номера В-7129, В-7705 и В-7134 соответственно). Штамм 28 был выделен в 2002 году в Санкт-Петербурге, Россия [8]. Штамм AC54 был предоставлен Ryland F. Young (Texas University A AND M, College Station, Texas, США).

**Белки.** Клонирование, экспрессию деполимеразы BS46 и очистку рекомбинантного белка проводили следующим образом. Фрагмент генома фага BS46, содержащий делеционный мутант гена 47, кодирующего деполимеразу, в которой отсутствует *N*-концевой домен белка, амплифицировали с помощью ПЦР, используя праймеры BS46\_gp47-for: 5'-ataGGATCCagtgcatcaggtgctcacc-3' и BS46\_gp47-rev: 5'-ataCTCGAG-tttgatgatgatg-3', а затем клонировали в экспрессионный вектор pTSL (GenBank KU314761) [14]. Вектор трансформировали в химически компетентные клетки *Escherichia coli* B834 (DE3). Белок экспрессировали в среде LB с добавлением 200 мкг/мл ампициллина. Трансформированные клетки выращивали на среде LB при 37 °С до поглощения 0,6 при 600 нм. Среду охлаждали до 18 °С и индуцировали экспрессию белка добавлением изопропил-1-тио- $\beta$ -D-галактопиранозид до конечной концентрации 0,5–1,0 мМ. После дальнейшей инкубации 16 ч при 18 °С клетки осаждали центрифугированием («Beckman», США) при 10 000 g в течение 15 мин при 4 °С. Клеточные осадки ресуспендировали в 1/50 от первоначального объема клеток в буфере А (20 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 300 мМ NaCl), замораживали, оттаивали и затем лизировали ультразвуком («Branson Ultrasonic» США). Клеточные остатки осаждали центрифугированием при 15 000 g в течение 20 мин при 4 °С. Белок извлекали металло-хелатной хроматографией на заряженной  $Ni^{2+}$  колонке (5 мл) GE HisTrap («GE Healthcare Life Sciences», США), предварительно уравновешенной буфером А. Белок элюировали линейным градиентом 50–200 мМ имидазола в буфере А. Фракции, содержащие целевой белок, собирали и объединяли. Белок-лидер SlyD отщепляли TEV-протеазой при соотношении протеаза/продукт гена 47 = 1/100 (*w/w*) 16 ч при 20 °С. Реакционную смесь одновременно диализовали против буфера, содержащего 10 мМ Tris-HCl pH 8,0 и 1,0 мМ 2-меркаптоэтанола.

Расщепленный белок отделяли фильтрованием и очищали ионообменной хроматографией, используя колонку MonoQ 10/100 GL («GE Healthcare», США) и градиент NaCl 0–650 мМ в 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0. Фракции, содержащие белок, объединяли и концентрировали до объема ~5 мл с использованием ультрафильтрационных устройств Sartorius с порогом отсека по молекулярной массе 50 000 Да («Sartorius AG», Германия).

Препараты деполимераз AP22, Fri1 и AS12 (концентрация 1 мг/мл) получены в лаборатории Леймана (Sealy Center for Structural Biology and Molecular Biophysics, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, США).

**Спектроскопия ЯМР.** Образцы лиофилизовали из 99,9% D<sub>2</sub>O для замещения протонов дейтерием. ЯМР-спектры снимали для растворов в 99,95% D<sub>2</sub>O на спектрометре Bruker Avance II («Bruker», Германия) 600 МГц при 20 °С. В качестве внутреннего стандарта для калибровки использовали натрий-3-триметилсилилпропаноат-2,2,3,3-d<sub>4</sub> ( $\delta_H$  0,  $\delta_C$  -1,6). Одномерную спектроскопию <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР и двумерную <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-корреляционную спектроскопию (COSY), полную <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-корреляционную спектроскопию (TOCSY), <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-спектроскопию ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат (ROESY), гетероядерную одноквантовую <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C корреляционную спектроскопию (HSQC) и гетероядерную многосвязную <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C корреляционную спектроскопию (HMBC) проводили с использованием стандартного программного обеспечения («Bruker», Германия). Отнесение химических сдвигов <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР проводили с помощью двумерных спектров ЯМР. Для сбора и обработки данных ЯМР использовали программу Bruker TopSpin 2.1 («Bruker», Германия). Время спиновой стабилизации MLEV-17 и время смешивания в экспериментах TOCSY и ROESY составляло 60 и 200 мс соответственно. Для оптимизации экспериментов <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C HMBC использовали задержку 60 мс, соответствующую константе спин-спиновой взаимодействия J<sub>HC</sub> 8 Гц.

**Масс-спектрометрия.** Масс-спектрометрию высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (HR ESI MS) с регистрацией отрицательных ионов [15] проводили на приборе micrOTOF II («Bruker», Германия). Образцы олигосахаридов (~50 нг/литр) растворяли в смеси вода-ацетонитрил 1 : 1 (v/v) и вводили шприцем со скоростью потока 3 мкл/мин. Напряжение на входе 3200 В, температура интерфейса – 180 °С, газ-осушитель – азот, диапазон регистрируемых масс *m/z* 50–3500. Для внутренней калибровки использовали калибровочный раствор ESI («Agilent Technologies», США).

**Гель-проникающая хроматография.** Гель-проникающую хроматографию образцов КПС проводили на колонке ХК 26/70 (700 × 26 мм, слой геля 560 мм) («GE Healthcare», Германия) с гелем Sephadex G-50 Superfine («Amersham PLC, GE Healthcare», Германия) в 0,05 М пиридиний-ацетатном буфере pH 4,5. Продукты расщепления КПС фракционировали, используя колонку ХК 16/100 (1000 × 16 мм, слой геля 800 мм) («GE Healthcare», Германия), заполненную гелем Fractogel TSK HW-40 (S) («Tosoh Corporation», Япония) в 1% уксусной кислоте. В обоих случаях скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Элюирование контролировали с помощью дифференциального рефрактометра («Knauer», Германия). Соответствующие фракции объединяли и лиофилизовали.

**Выделение и очистка КПС.** Капсульные полисахариды *A. baumannii* 1053, 28, 4190, AC54, и B05 выделяли экстракцией бактериальных клеток 90%-ным водным раствором фенола в течение 30 мин при 65–68 °С [16]. Экстракт охлаждали и диализовали против водопроводной воды без разделения слоев. Нерастворимые компоненты удаляли центрифугированием (12 000 г, 20 мин). Для дополнительной очистки [9] образцы КПС обрабатывали 50%-ным водным раствором ТХУ при 4 °С, осадок отделяли центрифугированием («Eppendorf», Австрия), супернатант диализовали против дистиллированной воды и лиофилизовали. Для расщепления сопутствующего липополисахарида с короткой цепью препараты КПС нагревали с 2%-ной уксусной кислотой (100 °С, 3 ч) и КПС выделяли из супернатанта с помощью гель-проникающей хроматографии на геле Sephadex G-50 Superfine («Amersham PLC, GE Healthcare», Германия).

**Расщепление КПС.** Очищенный образец КПС растворяли в 20 мМ буфере Tris-HCl pH 7,5 и добавляли к раствору соответствующий белок при соотношении белок/КПС = 1/100 (w/w). Реакционную смесь выдерживали 16 ч при 37 °С, продукты выделяли гель-проникающей хроматографией на геле Fractogel TSK HW-40 (S). Наряду с олигосахаридными продуктами в каждом случае было получено небольшое количество нерасщепленного КПС. Для облегчения идентификации олигосахаридных продуктов КПС из штамма 28 перед расщеплением О-деацетилировали, как описано ранее [10].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структуры КПС исследованных штаммов *A. baumannii* показаны на рис. 1–4. Структуры КПС штаммов 1053 [7], 28 [8] и 1432 [9] установ-



мидо-2-дезоксид-Д-фукозы (D-FucNAc), 2-ацетамидо-2-дезоксид-Д-маннуриновой кислоты (D-ManNAcA) на восстанавливаемом конце и 4,5-ненасыщенной 2-ацетамидо-2-дезоксид-Д-гексурононовой кислоты (ΔHexNAcA) на невозстанавливаемом конце (рис. 1). Последний моносахарид был идентифицирован по: 1) слабому положению сигналов C4 и C5 в спектре ЯМР <sup>13</sup>C при δ<sub>C</sub> 108,9 и 145,6 соответственно (рис. 1, б; табл. S3 в Приложении), 2) отсутствию протона H5 и 3) корреляциям H1/C5, H4/C5 и H4/C6 в спектре <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C НМВС при δ<sub>H</sub>/δ<sub>C</sub> 5,39/145,6, 6,05/145,6 и 6,05/170,4 соответственно.

Структура олигосахарида **1** была подтверждена масс-спектром HR ESI в котором присутствовал пик иона [M-H]<sup>-</sup> при m/z 620.1951 (расчетное значение m/z 620.1945). Аналогичные ЯМР-спектроскопическое (табл. S3 в Приложении) и масс-спектрометрическое (данные не приведены) исследования показали, что олигосахарид **2** представлял собой гексасахарид, состоящий из трисахарида, соответствующего интактному повторяющемуся звену КПС и расположенного между остатками ManNAcA и FucNAc трисахарида **1**, как показано на рис. 1, а.

Таким образом, олигосахариды **1** и **2** образовались из КПС путем специфического расщепления β1→4-гликозидной связи между двумя остатками ManNAcA в повторяющемся звене КПС.

Расщепление КПС *A. baumannii* 28 деполимеразой gp49 фага Fri1 привело к двум олигосахаридным фракциям I и II, представляющим собой олигомеры повторяющегося звена КПС, содержащего по одному остатку 2-ацетамидо-2-дезоксид-Д-галактозы (D-GalNAc), 2-ацетамидо-2-дезоксид-Д-галактурононовой кислоты (D-GalNAcA)

и 2,4-диацетамидо-2,4,6-тридезоксид-Д-глюкозы (D-QuiNAc4NAc). Данные масс-спектра HR ESI (табл. S1 в Приложении) показали, что фракция II представляет собой смесь гексасахарида **3**, нонасахарида **4** и додекасахарида **5** в примерном соотношении 1 : 3 : 1 (рис. 2), соответствующих димеру, тримеру (главный продукт) и тетрамеру, повторяющегося звена КПС соответственно. Фракция I включала олигомеры **4–7** от тримера до гексамера повторяющегося звена в примерном соотношении 1,2 : 5,0 : 1,4 : 1 (рис. 2), из которых тетрамер **5** являлся основным продуктом. На восстанавливаемом конце всех олигосахаридов находился остаток QuiNAc4NAc (табл. S4 в Приложении).

Следовательно, деполимераза gp49 фага Fri1 расщепляет КПС *A. baumannii* 28 по β1→4-гликозидной связи между остатками QuiNAc4NAc и GalNAcA соседних повторяющихся звеньев.

При расщеплении КПС *A. baumannii* 1432 деполимеразой gp42 фага AS12 образовались смеси пентасахаридов **8a,b** и декасахаридов **9a-c** (рис. 3), которые соответствовали мономерам и димерам повторяющихся звеньев КПС соответственно. Олигосахариды **8a,b** включали два остатка D-Gal и по одному остатку D-GlcNAc, D-GalNAc и производного 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксид-Д-глицеро-Д-галакто-нон-2-улозоновой (легионаминовой) кислоты. В соответствии с вариацией заместителя при N-7 легионаминовой кислоте в КПС [10] основной продукт расщепления **8a** и второй продукт **8b** содержали 5-N-ацетил-7-N-[(R)-3-гидроксипутироил]легионаминовую кислоту (Leg5Ac7Hb) или 5,7-ди-N-ацетиллегионаминовую кислоту (Leg5Ac7Ac), соответственно (табл. S5 в Приложении). Продукты **9a-c** включали два остатка Leg5Ac7Hb, по одному остатку Leg5Ac7Hb и Leg5Ac7Ac или два остатка Leg5Ac7Ac соответственно. На восста-

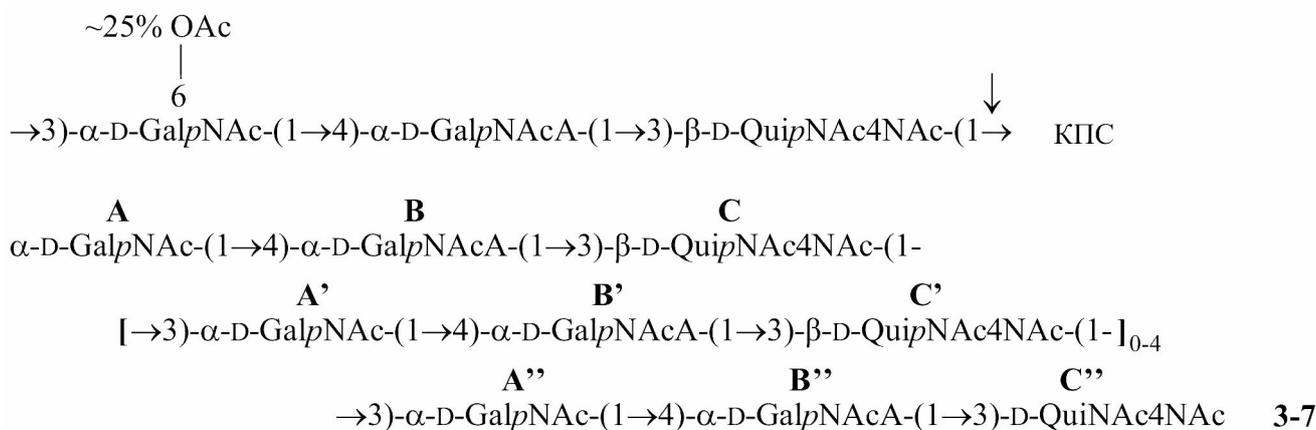


Рис. 2. Структуры КПС *A. baumannii* 28 [10] и олигосахаридов **3–7**, полученных в результате расщепления O-деацетилизованного КПС деполимеразой gp49 фага Fri1. Место расщепления КПС указано стрелкой

навливающим конце как **8**, так и **9** находился остаток GalNAc.

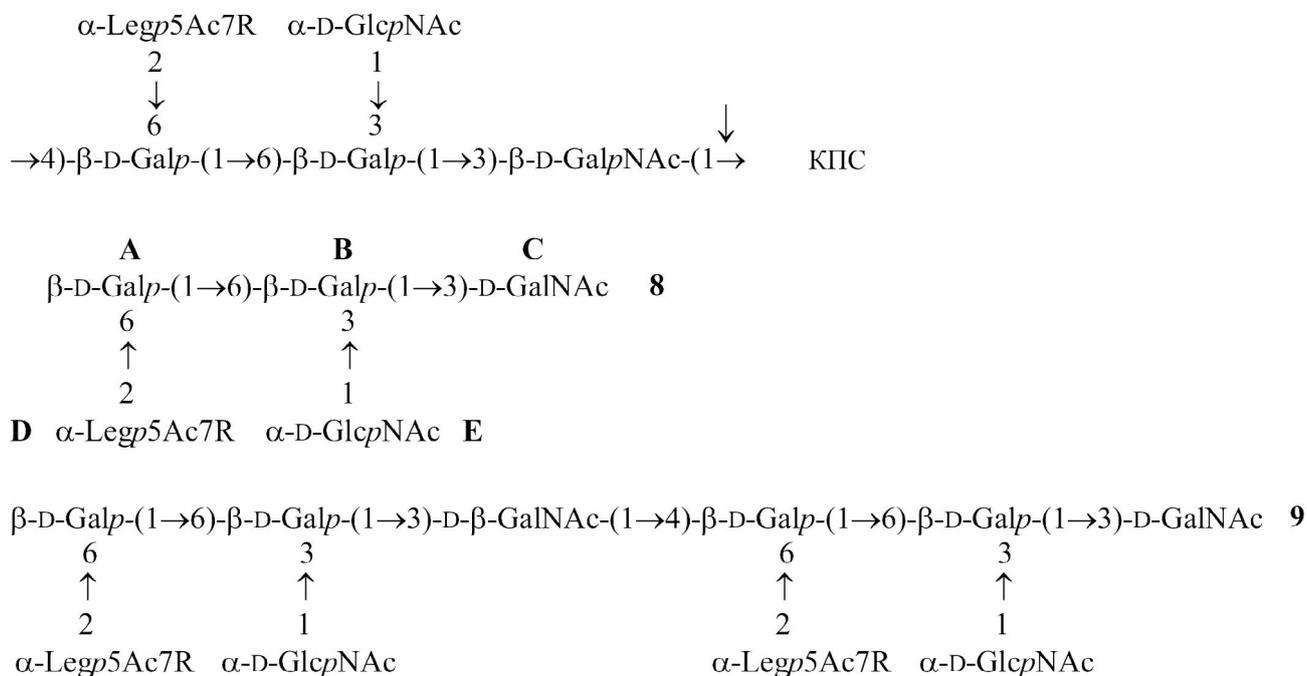
Следовательно, деполимераза gp42 фага AS12 расщепляет КПС *A. baumannii* 1432 по  $\beta 1 \rightarrow 4$ -гликозидной связи между остатками GalNAc и Gal соседних повторяющихся звеньев.

Расщепление КПС *A. baumannii* AC54 деполимеразой gp47 фага BS54 привело не к олигосахаридам, а к полисахариду, поэтому для расщепления был использован КПС штамма *A. baumannii* B05 (хозяин фага AM24 [17]), который относится к тому же типу K9, что и штамм AC54. В результате были получены два олигосахарида **10** и **11** (рис. 4). Основным продуктом – октасахарид **10** – соответствовал димеру повторяющегося звена КПС. Он состоял из четырех остатков L-FucNAc, двух остатков D-GalNAcA и двух остатков D-GlcNAc, один из которых находился на восстанавливаемом конце (табл. S6 в Приложении). Структура **10** подтверждалась масс-спектром HR ESI, в котором присутствовал пик иона  $[M-H]^{2-}$  при  $m/z$  802.3092 (рассчитанное значение  $m/z$  802.3049). Второй олигосахарид **11** был идентифицирован как додекасахарид, соответствующий тримеру повторяющегося звена КПС.

Следовательно, деполимераза gp47 фага BS54 расщепляет КПС *A. baumannii* B05 по  $\beta 1 \rightarrow 3$ -гликозидной связи между остатками GlcNAc и GalNAcA соседних повторяющихся звеньев.

Понимание химизма специфического взаимодействия фаговых деполимераз с КПС бактерий важно с точки зрения как биологии и генетики бактериофагов, так и возможного применения этих ферментов в биотехнологии. Показано, что препараты рекомбинантных деполимераз могут использоваться как терапевтические агенты [18, 19]. Поскольку число типов КПС, определяющих высокую варибельность инфекционных штаммов *A. baumannii*, велико, желательно иметь наготове большой набор деполимераз с известной специфичностью. Однако, хотя специфичность ряда фаговых ферментов охарактеризована генетически [20], химический механизм действия установлен только для одной КПС-деполимеразы [21].

В настоящей работе мы впервые выяснили механизм и охарактеризовали продукты расщепления четырех разнообразных по структуре КПС *A. baumannii* фаговыми деполимеразами. Одна из них, деполимераза gp54 фага AP22, является полисахарид-лиазой, расщепляющей КПС *A. baumannii* 1053 по механизму  $\beta$ -элиминирования в одном из остатков ManNAcA. Три другие деполимеразы, gp49 фага Fri1, gp42 фага AS12 и gp47 фага BS46 – специфические гликозидазы, которые расщепляют КПС *A. baumannii* 28, 1432 и B05 соответственно, по гидролитическому механизму. Образующиеся при рас-



**Рис. 3.** Структуры КПС *A. baumannii* 1432 [11] и олигосахаридов **8** и **9**, полученных в результате расщепления КПС деполимеразой gp42 фага AS12. R и R' обозначают ацетил или (R)-3-гидроксипутаноил. Место расщепления КПС указано стрелкой



**Рис. 4.** Структуры КПС *A. baumannii* B05 [12, 13] и олигосахаридов **10** и **11**, полученных в результате расщепления КПС деполимеразой gp47 фага BS46. Место расщепления КПС указано стрелкой

щеплении олигосахаридные фрагменты КПС могут быть использованы в качестве компонентов кандидатных конъюгатных вакцин против инфекций, вызванных *A. baumannii*. Полученные данные являются биохимической основой применения литических бактериофагов и КПС-деполимераз хвостовых шипов, кодируемых в фаговых геномах, для контроля распространения антибиотикоустойчивых штаммов *A. baumannii*.

**Финансирование.** Выделение, анализ моносахаридного состава и определение структуры продуктов расщепления КПС поддержаны Рос-

сийским научным фондом (грант № 19-14-00273). Клонирование, экспрессия и очистка рекомбинантной деполимеразы BS46 поддержаны Российским научным фондом (грант № 18-15-00403). Выращивание бактериальных клеток *A. baumannii* 1053, 1432 и B05 поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1671 от 31 октября 2019 года).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Doi, Y., Murray, G. L., and Peleg, A. Y. (2015) *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options, *Semin. Resp. Crit. Care Med.*, **36**, 85-98.
- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., Cha, C. J., Jeong, B. C., and Lee, S. H. (2015) Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **7**, 55, doi: 10.3389/fcimb.2017.00055.
- Kenyon, J. J., and Hall, R. M. (2013) Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes, *PLoS One*, **8**, e62160, doi: 10.1371/journal.pone.0062160.
- Hu, D., Liu, B., Dijkshoorn, L., Wang, L., and Reeves, P. R. (2013) Diversity in the major polysaccharide antigen of *Acinetobacter baumannii* assessed by DNA sequencing, and development of a molecular serotyping scheme, *PLoS One*, **8**, e70329, doi: 10.1371/journal.pone.0070329.
- Wyres, L., Cahill, S. M., Holt, K. E., Hall, R. M., and Kenyon, J. J. (2020) Identification of *Acinetobacter baumannii* loci for capsular polysaccharide (KL) and lipooligosaccharide outer core (OCL) synthesis in genome assemblies using curated reference databases compatible with Kaptive, *Microb. Genom.*, doi: 10.1099/mgen.0.000339.
- Popova, A. V., Lavysh, D. G., Klimuk, E. I., Edelstein, M. V., Bogun, A. G., Shneider, M. M., Goncharov, A. E., Leonov, S. V., and Severinov, K. V. (2017) Novel friI-like viruses infecting *Acinetobacter baumannii*-vB\_AbaP\_AS11 and vB\_AbaP\_AS12-characterization, comparative genomic analysis, and host-recognition strategy, *Viruses*, **9**, E188, doi: 10.3390/v9070188.
- Popova, A. V., Zhilenkov, E. L., Myakinina, V. P., Krasnikova, V. M., and Volozhantsev, N. V. (2012) Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **332**, 40-46, doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02573.x.
- Popova, A. V., Shneider, M. M., Mikhailova, Y. V., Shelonov, A. A., Shagin, D. A., Edelstein, M. V., and Kozlov, R. S. (2020) Complete genome sequence of *Acinetobacter baumannii* phage BS46, *Microbiol. Res. Announc.*, (in press).
- Shashkov, A. S., Shneider, M. M., Senchenkova, S. N., Popova, A. V., Nikitina, A. S., Babenko, V. V., Kostyukova, E. S., Miroshnikov, K. A., Volozhantsev, N. V., and Knirel, Y. A. (2015) Structure of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* 1053 having the KL91 capsule biosynthesis gene locus, *Carbohydr. Res.*, **404**, 79-82, doi: 10.1016/j.carres.2014.11.013.
- Kenyon, J. J., Shneider, M. M., Senchenkova, S. N., Shashkov, A. S., Siniagina, M. N., Malanin, S. Y., Popova, A. V., Miroshnikov, K. A., Hall, R. M., and Knirel, Y. A. (2016) K19 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* is produced via a Wzy polymerase encoded in a small genomic island rather than the KL19 capsule gene cluster, *Microbiology*, **162**, 1479-1489, doi: 10.1099/mic.0.000313.
- Shashkov, A. S., Kenyon, J. J., Senchenkova, S. N., Shneider, M. M., Popova, A. V., Arbatsky, N. P., Miroshnikov, K. A., Volozhantsev, N. V., Hall, R. M., and Knirel, Y. A. (2016) *Acinetobacter baumannii* K27 and K44 capsular polysaccharides have the same K unit but different structures due to the presence of distinct wzy genes in otherwise closely related K gene clusters, *Glycobiology*, **26**, 501-508, doi: 10.1093/glycob/cwv168.
- Haseley, S. R., and Wilkinson, S. G. (1996) Structure of the O-specific polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* O5 containing 2-acetamido-2-deoxy-D-galacturonic acid, *Eur. J. Biochem.*, **237**, 229-233.
- Vinogradov, E. V., Pantophlet, R., Dijkshoorn, L., Brade, L., Holst, O., and Brade, H. (1996) Structural and serological characterisation of two O-specific polysaccharides of *Acinetobacter*, *Eur. J. Biochem.*, **239**, 602-610.
- Taylor, N. M., Prokhorov, N. S., Guerrero-Ferreira, R. C., Shneider, M. M., Browning, C., Goldie, K. N., Stahlberg, H., and Leiman, P. G. (2016) Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction, *Nature*, **533**, 346-352, doi: 10.1038/nature17971.
- Tsedilin, A. M., Fakhrutdinov, A. N., Eremin, D. B., Zalesskiy, S. S., Chizhov, A. O., Kolotyrykina, N. G., and Ananikov, V. P. (2015) How sensitive and accurate are routine NMR and MS measurements, *Mendeleev Commun.*, **25**, 454-456.
- Westphal, O., and Jann, K. (1965) Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure, in *Methods in carbohydrate chemistry*, (Whistler, R. L., Ed.), **5**, Academic Press, New York, pp. 83-91.
- Popova, A. V., Shneider, M. M., Myakinina, V. P., Bannov, V. A., Edelstein, M. V., Rubalskii, E. O., Aleshkin, A. V., Fursova, N. K., and Volozhantsev, N. V. (2019) Characterization of myophage AM24 infecting *Acinetobacter baumannii* of the K9 capsular type, *Arch. Virol.*, **164**, 1493-1497, doi: 10.1007/s00705-019-04208-x.
- Oliveira, H., Mendes, A., Fraga, A. G., Ferreira, A., Pimenta, A. I., Mil-Homens, D., Fialho, A. M., Pedrosa, J., and Azeredo, J. (2019) K2 capsule depolymerase is highly stable, is refractory to resistance, and protects larvae and mice from *Acinetobacter baumannii* sepsis, *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, doi: 10.1128/AEM.00934-19.
- Liu, Y., Leung, S. S. Y., Guo, Y., Zhao, L., Jiang, N., Mi, L., Li, P., Wang, C., Qin, Y., Mi, Z., Bai, C., and Gao, Z. (2019) The capsule depolymerase Dpo48 rescues *Galleria mellonella* and mice from *Acinetobacter baumannii* systemic infections, *Front. Microbiol.*, **10**, 545, doi: 10.3389/fmicb.2019.00545.
- Oliveira, H., Costa, A. R., Konstantinides, N., Ferreira, A., Akturk, E., Sillankorva, S., Nemeč, A., Shneider, M., Dötsch, A., and Azeredo, J. (2017) Ability of phages to infect *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species through acquisition of different pectate lyase depolymerase domains, *Environ Microbiol.*, **19**, 5060-5077, doi: 10.1111/1462-2920.13970.
- Lee, I. M., Yang, F. L., Chen, T. L., Liao, K. S., Ren, C. T., Lin, N. T., Chang, Y. P., Wu, C. Y., and Wu, S. H. (2018) Pseudaminic acid on exopolysaccharide of *Acinetobacter baumannii* plays a critical role in phage-assisted preparation of glycoconjugate vaccine with high antigenicity, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 8639-8643, doi: 10.1021/jacs.8b04078.

**CLEAVAGE BY VARIOUS MECHANISMS OF *Acinetobacter baumannii*  
CAPSULAR POLYSACCHARIDES  
BY PHAGE-ENCODED DEPOLYMERASES\***

**Y. A. Knirel<sup>1\*\*</sup>, M. M. Shneider<sup>2,3</sup>, A. V. Popova<sup>3,4,5</sup>, A. A. Kasimova<sup>1,6</sup>,  
S. N. Senchenkova<sup>1</sup>, A. S. Shashkov<sup>1</sup>, and A. O. Chizhov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
119991 Moscow, Russia; E-mail: yknirel@gmail.com

<sup>2</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, 214019 Smolensk, Russia

<sup>4</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),  
141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

<sup>5</sup> State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279 Obolensk, Moscow Region, Russia

<sup>6</sup> Higher Chemical College of the Russian Academy of Sciences, D. I. Mendeleev University  
of Chemical Technology of Russia, 125047 Moscow, Russia

Received March 11, 2020

Revised March 30, 2020

Accepted March 31, 2020

Aerobic gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* has recently become one of the most relevant pathogens associated with hospital-acquired infections worldwide. *A. baumannii* produces a capsule around the cell, which represents a thick viscous layer of structurally variable capsular polysaccharide (CPS). The capsule protects the bacteria against unfavorable environmental factors and biological systems, including bacteriophages and host immune system. Many *A. baumannii* phages have structural depolymerases (tailspikes) that specifically recognize and digest bacterial CPS. In this work, we studied the interaction of tailspike proteins of four lytic depolymerase-carrying phages with *A. baumannii* CPS. Depolymerases of three bacteriophages (Fri1, AS12, and BS46) were identified as specific glycosidases that cleave the CPS of *A. baumannii* strains 28, 1432, and B05, respectively, by the hydrolytic mechanism. The gp54 depolymerase from bacteriophage AP22 was characterized as a polysaccharide lyase that cleaves the CPS of *A. baumannii* strain 1053 by  $\beta$ -elimination at hexuronic acid (ManNAcA) residues.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, bacteriophage, tailspike, capsular polysaccharide, hexuronic acid, depolymerase, glycosidase, polysaccharide lyase, receptor binding protein, NMR spectroscopy

УДК 577.151.03

## ВЛИЯНИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ HIS<sub>6</sub> НА ЭКСПРЕССИЮ И СВОЙСТВА ФЕНИЛАЦЕТОНМОНООКСИГЕНАЗЫ ИЗ *Thermobifida fusca*\*

© 2020 П.Д. Паршин<sup>1,2</sup>, А.А. Пометун<sup>1,2,3\*\*</sup>, У.А. Мартысюк<sup>4</sup>, С.Ю. Клейменов<sup>3,5</sup>,  
Д.Л. Агрошенко<sup>1,2,3</sup>, Е.В. Пометун<sup>6</sup>, С.С. Савин<sup>1,2,3</sup>, В.И. Тишков<sup>1,2,3\*\*</sup>

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

<sup>2</sup> ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109551 Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия

<sup>4</sup> Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, 125047 Москва, Россия

<sup>5</sup> Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, Россия

<sup>6</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет),  
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 23.03.2020

После доработки 27.03.2020

Принята к публикации 27.03.2020

Фенилацетонмонооксигеназа (КФ 1.14.13.92, РАМО) – фермент, катализирующий реакцию окисления кетонов до сложных эфиров с использованием молекулярного кислорода и NADPH. РАМО является перспективным ферментом для использования в биотехнологических процессах. Нами получены генетические конструкции с геном РАМО из *Thermobifida fusca*, в который были дополнительно введены нуклеотиды, кодирующие последовательность His<sub>6</sub> (His-tag) как на N-, так и на C-конце фермента (РАМО N и РАМО C соответственно). Также была получена описанная ранее РАМО L с His-tag, отделенным от C-конца дополнительным линкером KLGPEQKLISEEDLNSAVD. Все варианты РАМО экспрессировались в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3) в активной форме, однако в случае РАМО N уровень экспрессии по сравнению с таковым для двух остальных форм был в 3–5 раз выше. Каталитические константы  $k_{cat}$  РАМО C и РАМО L совпадают с литературными данными для РАМО L, полученной в другой системе экспрессии. В случае РАМО N наблюдается небольшое (на 15%) уменьшение  $k_{cat}$ . Константы Михаэлиса по NADPH для всех форм РАМО в пределах погрешности совпадают с литературными данными для РАМО L, а  $K_M$  по бензил-ацетону была выше в несколько раз. Кинетика термоинактивации и дифференциальная сканирующая калориметрия показали большую (в 3–4 раза) температурную стабильность РАМО N по сравнению с вариантами фермента с His-tag на C-конце.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** фенилацетонмонооксигеназа, His-tag, экспрессия, каталитические свойства, термостабильность, дифференциальная сканирующая калориметрия

DOI: 10.31857/S0320972520050061

### ВВЕДЕНИЕ

Моноксигеназы Байера–Виллигера (ВМО) являются семейством ферментов, катализирующих большое количество окислительных реакций, которые затруднительно или невозможно провести с помощью классического органического синтеза. Кроме того, проведение реакции

Байера–Виллигера методами традиционной химии требует использования сильных окислителей – пероксидов, таких как 3-хлорпероксобензойная кислота или пероксотрифторуксусная кислота, что идет вразрез с принципами зеленой химии. Несмотря на то, что катализируемая реакция является окислительной, для проведения процесса ВМО требуется дополнительный ис-

Принятые сокращения: ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия, ИПТГ – изопропил-β-D-1-тио-галактопиранозид, РАМО – фенилацетонмонооксигеназа, ВМО – моноксигеназа Байера–Виллигера, FDH – формилдегидрогеназа.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ20-069, 12.05.2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

точник энергии в виде NADPH. Высокие регио- и энантиоселективность ВМОs делают их крайне привлекательными ферментами для использования в биотехнологических процессах [1].

Одним из главных недостатков монооксигеназ Байера–Виллигера является низкая стабильность, которая затрудняет их использование на практике. Клонированная в 2004 году ВМО из термофильной бактерии *Thermobifida fusca* лишена такого недостатка [2]. Данный фермент демонстрирует наибольшую каталитическую эффективность в реакции превращения фенилацетона в бензилацетат, из-за чего и был назван фенилацетонмонооксигеназой (РАМО, КФ 1.14.13.92). Для РАМО также характерна высокая каталитическая константа в процессах окисления бензилацетона и других схожих по структуре ароматических кетонов. Этот фермент может найти применение в процессах синтеза ароматизаторов, так как получающийся в результате реакции окисления бензилацетона эфир обладает ярко выраженным фруктовым запахом [2].

РАМО, как и большинство монооксигеназ Байера–Виллигера, содержит FAD и использует NADPH в качестве дополнительного источника энергии. РАМО является односубъединичным ферментом с молекулярной массой 62 kDa. Для него определена трехмерная кристаллическая структура [3]. Ранее для РАМО были описаны каталитические свойства [2], определен кинетический механизм [4] и исследовано влияние органических растворителей [5]. Также были предприняты попытки методом направленного мутагенеза изменить коферментную специфичность РАМО от NADPH к NADH из-за значительно меньшей стоимости последнего [6].

В большинстве работ для экспрессии РАМО используются генетические конструкции на основе векторов семейства pBAD, в которых целевые гены находятся под контролем арабинозного промотора [7]. Для получения высокоочищенных препаратов фермента на C-конец аминокислотной последовательности белка была введена аффинная метка из шести остатков гис-

тидина (His-tag). Для снижения влияния этой последовательности на свойства РАМО в векторе pBAD/мус-HisA, His-Tag отделен от C-конца фермента специальной последовательностью (эпитопом) из 19 аминокислотных остатков (вариант РАМО L) [2].

В данной работе для получения рекомбинантной РАМО нами была использована более простая система экспрессии, основанная на векторе pET28a и штамме *Escherichia coli* BL21(DE3). В этой системе индукция экспрессии происходит в присутствии лактозы или ее аналога – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ). Для ускорения и упрощения очистки целевого фермента были созданы конструкции, в которых ген *ramo* содержал дополнительные нуклеотиды, кодирующие His-tag непосредственно на N- и C-концах аминокислотной последовательности фермента (варианты РАМО N и РАМО С соответственно). Кроме того, для корректного сравнения свойств новых ферментов с литературными данными нами на основе вектора pET28a была также получена конструкция, кодирующая вариант РАМО L.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение генетических конструкций.** Создание генетических конструкций проводили методом полимеразной цепной реакции. В качестве матрицы использовался ген *ramo*, синтезированный по нуклеотидной последовательности GenBank AAZ55526.1. Для получения конструкций с различным расположением His-tag использовали праймеры («Евроген», Россия), приведенные в табл. 1.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе T 100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США). К раствору смеси праймеров (20 пмоль каждого) добавляли 2,5 мкл 10× буфера для ПЦР, поставляемого фирмой производителем вместе с ферментом, 1 мкл раствора MgCl<sub>2</sub> (25 мМ), 2 мкл раствора dNTP (2,5 мМ каждого), 1 мкл раствора геномной ДНК (50 нг/мкл),

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	5'–3' последовательность праймеров
РАМО_His For	5'-GCATATAGCCATGGGTCACCACCACCACCACCATTTCGGGTGCCGGGCAGACGACTG-3'
РАМО_For	5'-GCATATAGCCATGGCCGGGCAGACGACTGTCG-3'
РАМО_rev	5'-GGCCCAAGCTTTTACTAGGTGAGGACGAAACCTTCGTAGCC-3'
РАМО_Myc_Rev	5'-CCGCCTCGAGTTATCAATGATGATGATGATGGTTCGACGGCGCTATTTCAGATCCTC-3'
РАМО_His_Rev	5'-CCGCAAGCTTTTATCAATGATGATGATGATGATGCGAACCGGTGAGGACGAAACCTTC-3'

0,5 мкл (5 ед/мкл) Phusion ДНК-полимеразы («Thermo Fisher Scientific», США) и 17 мкл деионизованной воды до общего объема 25 мкл. ПЦР проводили по следующей схеме: 30 циклов (10 с при 98 °С, 10 с при 72 °С, 1,5 мин при 72 °С), далее элонгация 10 мин при 72 °С.

Продукты ПЦР очищали электрофорезом в 1%-ом агарозном геле и обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NcoI и HindIII («Thermo Fisher Scientific», США) (для РАМО N и РАМО С) или NcoI и XhoI («Thermo Fisher Scientific», США) (для РАМО L). Затем ДНК очищали электрофорезом в 1% агарозном геле и лигировали с расщепленной теми же эндонуклеазами рестрикции плазмидой pET28a. После лигирования реакционной смесью трансформировали клетки *E. coli* DH5α и высевали их на чашки Петри с агаризованной средой («Difco», Германия), содержащей канамицин (30 мкг/мл), и выдерживали 16 ч при 37 °С. Для каждой конструкции из чашки брали по три колонии и из них выделяли плазмиды. Для контроля полученных конструкций проводили секвенирование плазмидной ДНК в Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН).

**Экспрессия.** Для экспрессии ферментов проводили трансформацию плазмидной ДНК в штамм *E. coli* BL21(DE3). Колонии клеток штамма-производителя помещали в 4 мл среды LB («Difco», Германия), содержащую 30 мкг/мл канамицина и культивировали в течение ночи при 37 °С и 180 об./мин. Клетки из ночной культуры пересевали в 200 мл свежей среды ТВ (дрожжевой экстракт 24 г/литр, бактотриптон 12 г/литр (оба «Difco», Германия), глицерин 4 мл/литр, 0,017 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,072 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0) с аналогичной концентрацией канамицина. Клетки растили при 37 °С и 120 об./мин. По достижении поглощения  $A_{600} = 0,8$  добавляли ИПТГ до концентрации 200 мкМ. Экспрессию проводили в течение 24 или 7 ч при 120 об./мин и различных температурах (30 или 37 °С). Клетки осаждали центрифугированием на центрифуге Beckman J21 («Beckman», США) в течение 20 мин при 6000 об./мин и 4 °С. Осадок ресуспендировали в охлажденном буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl и 20 мМ имидазол, pH 7,5.

**Выделение и очистка.** К суспензии клеток добавляли водный раствор FAD до конечной концентрации 10 мкМ. Разрушение клеток проводили на ультразвуковом дезинтеграторе Branson Sonifier 250 («Thermo Fisher Scientific», США) в течение 4–5 циклов по 90 с во льду с перерывами на охлаждение. Далее раствор инкубировали при 55 °С в течение 10 мин с последующим

осаждением дебриса на центрифуге Beckman J21 («Beckman», США) (40 мин, 10 000 об./мин, 4 °С). Бесклеточный экстракт наносили на колонку HisTrap HP («GE Healthcare Life Science», США) объемом 1 мл, уравновешенную буферным раствором 50 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl, pH 7,5 содержащим 20 мМ имидазол, и смывали возрастающим линейным градиентом концентрации имидазола 20–500 мМ. Фракции, содержащие целевой белок, переводили в 50 мМ натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7,5 с помощью гель-фильтрации на колонке, заполненной Сефадекс G-25 («Pharmacia Biotech», Швеция). За эффективностью очистки следили методом белкового электрофореза в денатурирующих условиях на приборе Mini Protean 2 («BioRad», Австрия) согласно протоколу фирмы производителя.

**Анализ препаратов РАМО с помощью MALDI-масс-спектрометрии.** При проведении данных исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук».

**Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле.** Из геля, окрашенного с помощью Coomassie Brilliant Blue, согласно протоколу фирмы («BioRad», Австрия), вырезали кусочек размером 3–4 мм<sup>3</sup> с полосой фермента, который для удаления красителя дважды промывали в 100 мкл 40% раствора ацетонитрила в 0,1М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  в течение 20 мин при 37 °С. После удаления раствора, для дегидратации к гелю добавляли 100 мкл ацетонитрила. Для удаления ацетонитрила кусочек геля высушивали и затем к нему прибавляли 3,5 мкл раствора (15 мкг/мл) модифицированного трипсина («Promega», США) в 0,05 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Гидролиз проводили в течение 20 ч при 37 °С, затем к раствору добавляли 5,25 мкл 0,5% трифторуксусной кислоты (ТФУ) в 50% растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров.

Для подготовки образцов для масс-спектрометрии на мишени смешивали по 1,5 мкл раствора образца и 0,5 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (10 мг/мл в 20% водном ацетонитриле, 0,5% ТФУ) («Sigma», Германия). Полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре Ultraflextreme («Bruker», Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность измеренных

моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,002–0,011% (20–110 ppm). Спектры получали в диапазоне масс 500–6500  $m/z$ , выбирая мощность лазера оптимальную для достижения наилучшего разрешения.

Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 («Bruker Daltonics», Германия). При помощи программы Mascot (опция «пептидный фингерпринт») провели поиск в локальной базе данных с указанной выше точностью, с учетом возможных модификаций: Acetyl (Protein N-term), Gln pyro-Glu (N-term Q), Oxidation (M), Propionamide (C). Кандидатные белки, имеющие параметры достоверности score >42 в базе данных NCBI, считали определенными надежно ( $p < 0,05$ ).

#### Определение каталитических параметров.

Концентрацию активных центров фермента определяли на спектрофотометре Shimadzu 1800PC («Shimadzu GmbH», Германия) по поглощению FAD при 441 нм ( $\varepsilon = 12,4 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Раствор РАМО перед измерениями инкубировали при 55 °С в течение 10 мин. За протеканием реакции следили при 30 °С по расходу NADPH, измеряя уменьшение поглощения при 340 нм. Объем реакционной среды составлял 1 мл. Для измерений использовался 50 мМ натрий-фосфатный буфер pH 7,5, содержащий 50 мкМ NADPH и 10 мМ бензилацетон. Для определения  $K_M$  концентрации NADPH и бензилацетона варьировали в диапазоне 5–500 мкМ и 0,25–15 мМ соответственно.

**Изучение кинетики термоинактивации.** Термостабильность ферментов измеряли в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,5 при нескольких температурах. Для каждого эксперимента готовили серию из пластиковых пробирок объемом 0,5 мл по 100 мкл раствора фермента (0,2 мг/мл) в каждой. Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (точность термостатирования  $\pm 0,1$  °С) («Waters», США). В определенные моменты времени отбирали по одной пробирке и переносили в лед на 5 мин, после чего пробирку центрифугировали в течение 3 мин при 12 000 об./мин на центрифуге Eppendorf 5415D («Eppendorf», Германия). Остаточную активность РАМО измеряли, как описано выше. Константу скорости термоинактивации  $k_{in}$  определяли как тангенс угла наклона прямой из графика зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты

$\ln(A/A_0) - t$ ) методом линейной регрессии, используя программу «Origin Pro 8.5» («OriginLab Corporation», США).

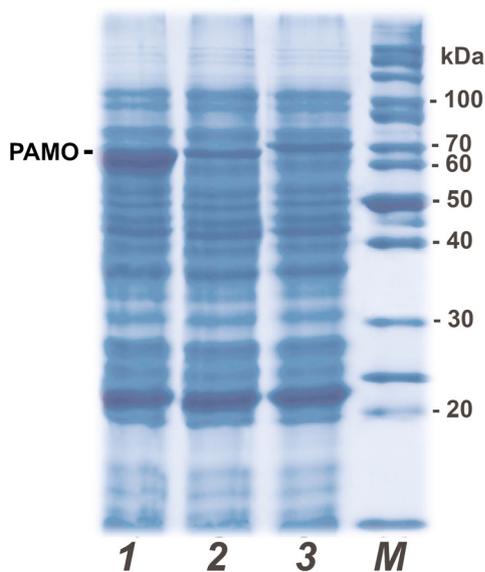
#### Изучение термостабильности с помощью ДСК.

Эксперименты по определению зависимости теплоемкости от температуры для полученных РАМО проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре MicroCal VP DSC («Malvern Panalytical Ltd», Великобритания). Рабочий объем капиллярных калориметрических ячеек из тантала составлял 140 мкл. Для предотвращения образования пузырьков и закипания растворов при повышении температуры в ячейках калориметра поддерживалось избыточное давление 3 атм. Калибровку прибора осуществляли путем подачи на одну ячейку фиксированной мощности (25 мкВт). Перед проведением калориметрического эксперимента определяли инструментальную базовую линию. При измерениях в контрольную ячейку помещали буферный раствор, а в рабочую – раствор исследуемой РАМО. Концентрация ферментов составляла 1 мг/мл, а скорость прогрева – 1 град./мин.

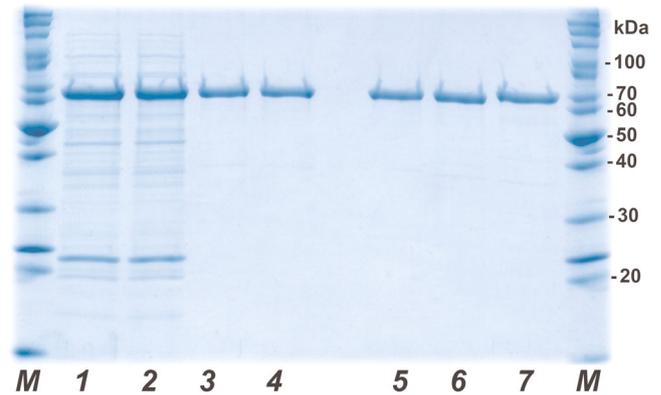
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Экспрессия, выделение и очистка.** Металл-хелатная аффинная хроматография является одним из наиболее эффективных методов очистки белков и на данный момент широко используется во всем мире. Для ее проведения необходимо наличие на *N*- или *C*-конце белка последовательности из 6–12 остатков гистидина (His-tag) [8]. Несмотря на значительное упрощение процесса очистки, введение His-tag может приводить к существенному изменению (и даже ухудшению) свойств белка, что было показано на ферментах самой разной природы [9–12]. Поэтому для каждого фермента необходимо определить влияние введения His-tag на каталитические свойства и стабильность. В нашей работе была поставлена задача получения конструкций РАМО с расположением His-tag на *N*- и *C*-концах аминокислотной последовательности (РАМО N и РАМО C соответственно) и сравнения свойств модифицированных ферментов. Для корректного сравнения полученных данных ранее нами также была получена описанная конструкция РАМО L, в которой His-tag отделен от *C*-конца фермента дополнительной аминокислотной последовательностью из 19 а.о. [2]. Как уже указывалось выше, плазмиды с тремя вариантами РАМО были получены с помощью ПЦР. Их секвенирование показало отсутствие каких-либо посторонних нуклеотидных замен.

В своей работе мы отказались от использования систем, в которых экспрессия целевого гена находится под контролем арабинозного промотора в силу высокой стоимости индуктора L-арабинозы. Для получения рекомбинантных РАМО была использована более дешевая система на основе вектора рЕТ28а и клеток *E. coli* BL21(DE3). В этой системе экспрессия целевого фермента индуцируется под действием ИПТГ или значительно более дешевой лактозы. Для оптимизации условий экспрессии РАМО варьировали питательную среду, концентрацию индуктора ИПТГ, время и температуру культивирования. Наибольший выход фермента был достигнут при экспрессии в течение 24 ч в среде ТВ при 30 °С и индукции действием 0,2 мМ ИПТГ. Повышение температуры до 37 °С приводило к преждевременному лизису клеток. Уменьшение времени экспрессии до 8 ч и использование среды 2YT также приводили к меньшему выходу фермента. Следует отметить, что изменение условий культивирования абсолютно одинаково влияло на уровень экспрессии всех трех вариантов РАМО, однако во всех экспериментах при одинаковых условиях уровень экспрессии фермента с His-tag на N-конце аминокислотной последовательности был в 3–5 раз больше, чем таковой для РАМО С и РАМО L (рис. 1). На рис. 1 также хорошо видно, что из-за наличия дополнительных 19 а.о. РАМО L (дорожка 3) имеет большую молекулярную массу по сравнению с РАМО N и РАМО С (дорожки 1 и 2).



**Рис. 1.** Аналитический электрофорез в денатурирующих условиях проб биомассы клеток *E. coli* после экспрессии. 1 – РАМО N, 2 – РАМО С, 3 – РАМО L, M – маркер молекулярных масс



**Рис. 2.** Аналитический электрофорез в денатурирующих условиях проб на разных стадиях очистки. M – маркер молекулярных масс, РАМО N – лизат клеток (1), лизат после термообработки (2), после метало-хелатной хроматографии (3) и после обессоливания (4). Дорожки 5–7 – РАМО N, РАМО С и РАМО L после всех стадий очистки

Очистка содержащих His-tag РАМО была проведена с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии. На рис. 2 представлены данные аналитического электрофореза в денатурирующих условиях для препаратов РАМО N на разных стадиях очистки (дорожки 1–4) и для очищенных препаратов всех трех форм (дорожки 5–7). Из рис. 2 видно, что все три формы РАМО с His-tag могут быть получены в практически гомогенном виде в одну стадию. Для подтверждения аутентичности целевых белков препараты ферментов были выделены из геля и проанализировали с помощью MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии. Результаты анализа показали, что при экспрессии в клетках *E. coli* во всех трех случаях не происходит посттрансляционной модификации наших ферментов, и последовательности His-tag расположены в полном соответствии с последовательностями, кодируемыми генетическими конструкциями.

Было обнаружено, что все три варианта РАМО в ходе очистки теряют часть связанного FAD, однако, после инкубации со свободным FAD фермент восстанавливает свою активность. Успешное связывание фермента с FAD подтверждается спектром препарата фермента после обессоливания для отделения от несвязавшегося FAD (рис. 3).

**Кинетические свойства.** В табл. 2 представлены кинетические параметры РАМО с разными положениями аффинной метки. Полученные данные свидетельствуют о том, что положение His-tag не оказывает существенного влияния на каталитические параметры фермента. В случае РАМО с His-tag на N-конце величина каталитической константы немного меньше, но это раз-

**Таблица 2.** Кинетические параметры трех вариантов РАМО с различным расположением His-tag (50 мкМ Tris-HCl, pH 7,5, 30 °С)

Фермент	$K_M^{\text{NADPH}}$ , мкМ	$K_M^{\text{benzylacetone}}$ , мМ	$k_{\text{cat}}$ , с <sup>-1</sup>	Источник данных
РАМО N	3,2 ± 0,4	7,1 ± 0,6	1,5 ± 0,2	Настоящая работа
РАМО С	4,2 ± 0,7	5,5 ± 0,6	1,8 ± 0,2	Настоящая работа
РАМО L	4,4 ± 0,9	6,4 ± 0,5	1,9 ± 0,2	Настоящая работа
РАМО L (pBAD)	3,0	0,36	1,8	[2]

личие находится в пределах ошибки эксперимента. Константы Михаэлиса для NADPH также в пределах погрешности совпадают с данными для РАМО L, полученной в другой системе экспрессии [2]. Однако для всех трех полученных нами ферментов величина  $K_M$  по бензил-ацетону была в несколько раз выше по сравнению с литературными данными [2]. Также отметим, что активность всех трех форм фермента линейно зависела от его концентрации.

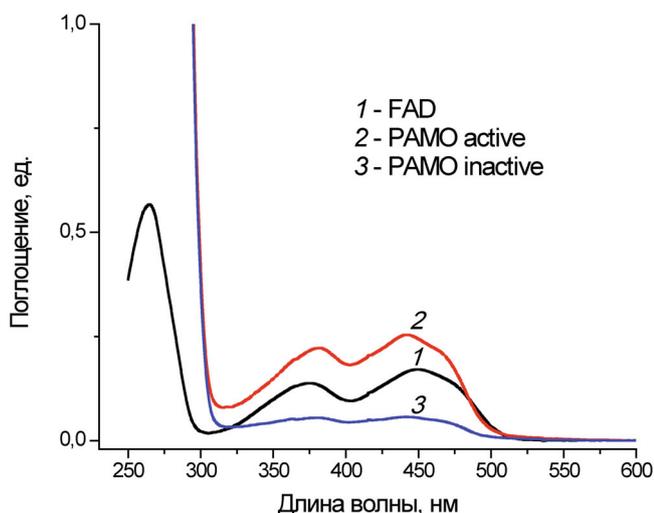
**Термостабильность.** На рис. 4 в полулогарифмических координатах представлены зависимости изменения остаточной активности от времени для полученных РАМО при 59 °С. Линейный характер наблюдаемых зависимостей свидетельствует, что термоинактивация протекает в соответствии с кинетикой реакции первого порядка. Из тангенса угла наклона прямых были рассчитаны эффективные константы скорости термоинактивации ферментов ( $k_{\text{in}}$ ). В случае РАМО N, наблюдаемая при 59 °С  $k_{\text{in}}$  в 3–4 раза ниже по сравнению с константами скорости

инактивации для двух форм фермента, содержащих His-tag на С-конце.

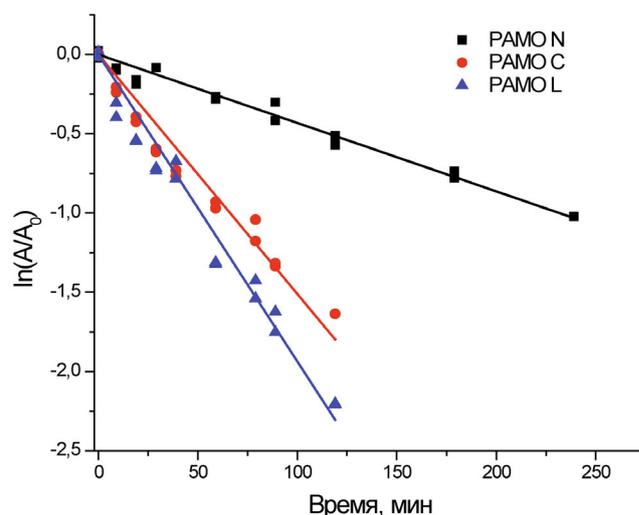
Результаты исследования кинетики термоинактивации согласуются с данными, полученными дифференциальной сканирующей калориметрией (рис. 5). Как видно из рис. 5, в случае РАМО N температура плавления белковой глобулы на 1 градус выше по сравнению с двумя другими ферментами. Принимая во внимание, что в среднем константа скорости термоинактивации белков увеличивается в 10 раз на каждые три градуса, то разница в температурах плавления в один градус как раз и согласуется с наблюдаемыми для разных форм РАМО различиями в значениях наблюдаемых констант скорости термоинактивации.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

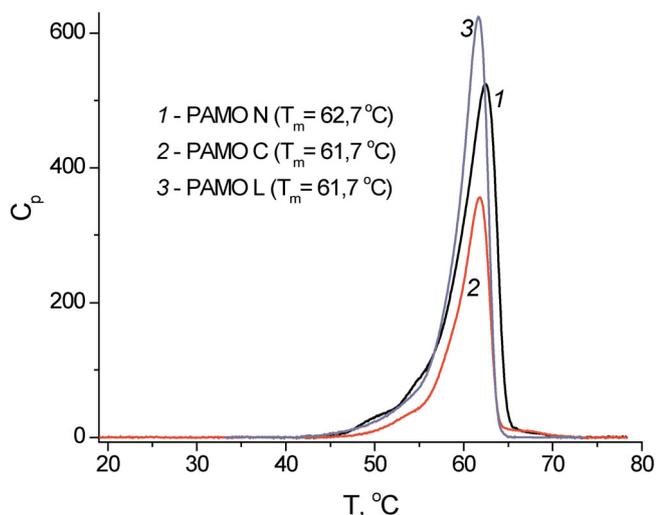
Как уже указывалось выше, NAD(P)<sup>+</sup>-зависимые оксидоредуктазы являются высокоэф-



**Рис. 3.** Спектры поглощения свободного FAD (1) и РАМО до и после добавления FAD (3 и 2 соответственно). 0,05 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,5. (С цветным вариантом рис. 3–6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)



**Рис. 4.** Зависимости натурального логарифма остаточной активности от времени для трех вариантов РАМО при 59 °С (0,05 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,5)



**Рис. 5.** Кривые плавления для трех вариантов РАМО с различным расположением His-tag (0,05 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,5; концентрация ферментов 0,7–1,0 мг/мл, скорость сканирования 1 град./мин)

фективными ферментами, которые позволяют практически с количественным выходом и оптической чистотой >99% получать соединения, которые невозможно получить с помощью методов традиционной органической химии. Однако, в силу очень высокой стоимости восстановленного кофермента NAD(P)H, для экономически оправданного применения таких ферментов на практике необходимо использовать вторую дополнительную реакцию, в результате которой кофермент из окисленной формы вновь возвращается в восстановленную. Одним из ферментов, которые нашли широкое применение для регенерации восстановленного кофермента является форматдегидрогеназа (FDH). Первый биокаталитический процесс получения  $\epsilon$ -капролактонов по реакции Байера–Виллигера с участием циклогексанонмонооксигеназы с ферментативной регенерацией восстановленного кофермента был описан в 1997 году [13, 14]. Для восстановления NADP<sup>+</sup> в NADPH использовали мутантные FDH из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (NP-PseFDH), у которых с помощью белковой инженерии коферментная специфичность была изменена от NAD<sup>+</sup> к NADP<sup>+</sup> [15–17].

Производительность системы из двух растворимых биокатализаторов ограничена по каталитическим свойствам отдельных ферментов. Поэтому для общего повышения эффективности биокатализа в последнее время очень популярно создание химерных белков, в которых два фермента, катализирующие сопряженные реакции, объединены в одну полипептидную цепь. Сближение двух активных центров в одной гло-

буле часто приводит к тому, что такие биокатализаторы в несколько раз более эффективны, чем смесь отдельных ферментов. Данная работа является частью нашего большого проекта по созданию таких новых химерных биокатализаторов, включая слитый фермент на основе мутантных NADP<sup>+</sup>-специфичных FDH из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и РАМО. Ранее нами было показано, что в случае PseFDH наиболее оптимальным является присоединение дополнительного полипептида к N-концу фермента [18], т.е. логичным является получение слитого фермента в последовательности РАМО-PseFDH. Для очистки такого гибридного белка His-tag должен находиться на N-конце РАМО. Поскольку в литературе информация о РАМО N отсутствует, было решено получить и изучить такой фермент. Кроме того, было интересно выяснить насколько необходим дополнительный пептид между C-концом РАМО и His-tag, который был предложен другими авторами ранее [2]. Результаты наших экспериментов в очередной раз подтвердили, что при введении аффинной метки необходимо проведение отдельных исследований по изучению влияния His-tag на N- или C-конец аминокислотной последовательности фермента. В случае РАМО оказалось, что аффинная метка очень слабо влияет на каталитические свойства фермента (в пределах ошибки эксперимента константы практически одинаковы). Отсутствие влияния положения His-tag в белковой глобуле на каталитические свойства РАМО согласуется с данными рентгеноструктурного анализа [3]. На рис. 6, а представлена экспериментальная структура фермента (PDB 1W4X) с указанием положения N- и C-концов. Из рисунка хорошо видно, что N- и C-концы аминокислотной последовательности РАМО расположены вдали как от центров связывания изоаллоксазинового кольца FAD и NADPH, так и от центра связывания субстрата. Причина расхождения значений  $K_M$  по бензил-ацетону для полученных нами ферментов с данными для РАМО L, полученной в другой системе экспрессии, на настоящий момент остается невыясненной. Хотя система экспрессии и может оказывать влияние на эффективность фолдинга и пространственную структуру белка, такое избирательное ухудшение только одного параметра объяснить сложно. Для этого требуются дополнительные эксперименты и изучение реакции РАМО с бензилацетоном методом газовой хроматографии.

В то же время введение His-tag на N-конец РАМО положительно влияет как на уровень экспрессии фермента в клетках *E. coli*, так и на термостабильность, что является абсолютно не-

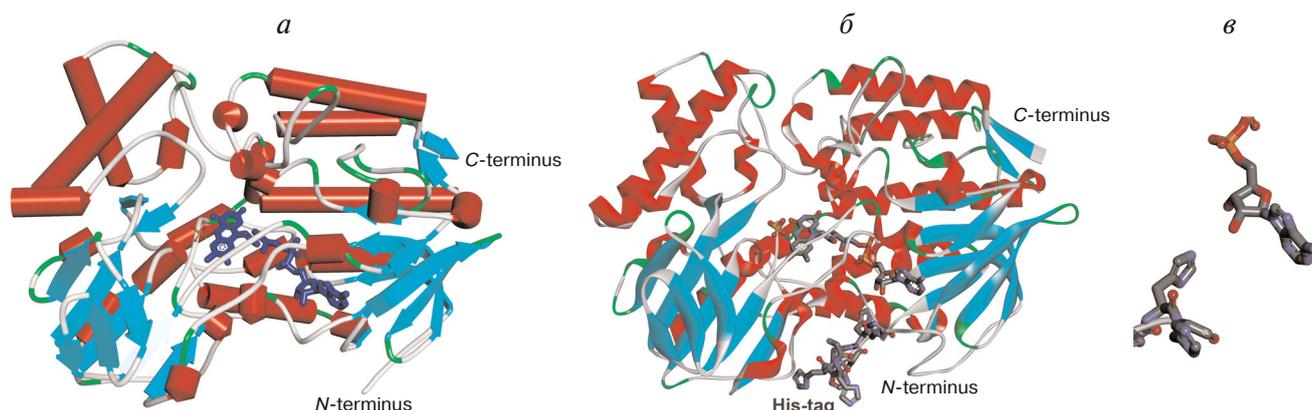


Рис. 6. *а* – Экспериментальная трехмерная структура РАМО PDB 1W4X с указанием положения *N*- и *C*-концов фермента. *б* – Модельная структура РАМО N с достроенными 10-ю а.о. и His-tag. *в* – Взаимная ориентация адениновой части FAD и пятого остатка гистидина из His-tag

ожиданным. В обоих случаях наблюдается увеличение показателя в 3–5 раз. Одним из возможных объяснений большего уровня экспрессии фермента с His-tag на *N*-конце аминокислотной последовательности является более оптимальная для экспрессии в клетках *E. coli* частота встречаемости кодонов, кодирующих остатки гистидина по сравнению с таковой для кодонов, кодирующими а.о. *N*-конца самого фермента. Однако разница в частоте встречаемости кодонов не такая значительная, чтобы объяснить наблюдаемое увеличение уровня экспрессии. Тем не менее увеличение экспрессии в 3–5 раз является важным фактором для практического применения РАМО.

Более высокая термостабильность РАМО N по сравнению с вариантами с His<sub>6</sub> на *C*-конце может быть связана с изменением структуры *N*-конца после введения в него His-tag. Данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют, что *N*-конец РАМО дикого типа очень подвижен и в кристаллической структуре полипептидная цепь видна только начиная с 10-го остатка [3], в то время как *C*-конец хорошо структурирован. Это очень хорошо видно на рис. 6, *а*. Литературные данные [2] и результаты нашей работы свидетельствуют, что FAD не очень прочно связан в активном центре. Поэтому одним из наиболее вероятных механизмов термоинактивации РАМО может быть диссоциация кофактора из активного центра фермента. На высокую вероятность такого механизма указывает тот факт, что адениновая часть кофактора экспонирована в раствор (рис. 6). Нами была построена модельная структура РАМО N, в которой добавлены недостающие в экспериментальной структуре на *N*-конце 10 а.о., а также собственно последовательность His-tag (рис 6, *б*). Методология моделирования и оптимизация

структуры подробно описаны в нашей работе по введению His-tag в PseFDH [18]. Анализ модельной структуры РАМО N (рис. 6, *б*) свидетельствует, что *N*-конец РАМО N с положительно заряженным His-tag может быть пространственно сближен с адениновой частью FAD. Данные моделирования свидетельствуют, что электростатическое взаимодействие между имидазолами His-tag и отрицательно заряженной пирофосфатной частью FAD невозможно из-за стерических ограничений, однако имидазол пятого остатка гистидина из His-tag образует водородную связь с 3'- и частично с 2'-ОН группами рибозы аденозина (рис 6, *в*). По-видимому, возникновение такой связи приводит к структуризации *N*-конца и, как следствие, к повышению термостабильности. Отметим, что величина стабилизирующего эффекта примерно соответствует энергии образующейся связи. В то же время наличие дополнительного пептида между *C*-концом РАМО и His<sub>6</sub> в РАМО L уменьшает структурирование этого конца и, как результат, стабильность РАМО L оказывается меньше, чем РАМО С (рис. 4).

На основании данных о положительном влиянии введения His-tag на *N*-конец РАМО нами уже начаты эксперименты по созданию и изучению свойств слитых гибридных ферментов РАМО с NP PseFDH. Данные этих экспериментов вскоре будут опубликованы.

**Финансирование.** Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 19-34-70036. При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Геном» Института мо-

лекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН и Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

**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

- Kamerbeek, N. M., Janssen, D. B., van Berkel, W. J. H., and Fraaije, M. W. (2003) Baeyer–Villiger monoxygenases, an emerging family of flavin-dependent biocatalysts, *Adv. Synth. Catal.*, **345**, 667–678, doi: 10.1002/adsc.200303014.
- Fraaije, M. W., Wu, J., Heuts, D. P. H. M., Van Hellemond, E. W., Spelberg, J. H. L., and Janssen, D. B. (2005) Discovery of a thermostable Baeyer–Villiger monoxygenase by genome mining, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 393–400, doi: 10.1007/s00253-004-1749-5.
- Malito, E., Alfieri, A., Fraaije, M. W., and Mattevi, A. (2004) Crystal structure of a Baeyer–Villiger monoxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 13157–13162, doi: 10.1073/pnas.0404538101.
- Torres Pazmiño, D. E., Baas, B. J., Janssen, D. B., and Fraaije, M. W. (2008) Kinetic mechanism of phenylacetone monoxygenase from *Thermobifida fusca*, *Biochemistry*, **47**, 4082–4093, doi: 10.1021/bi702296k.
- Secundo, F., Fialà, S., Fraaije, M. W., De Gonzalo, G., Meli, M., Zambianchi, F., and Ottolina, G. (2011) Effects of water miscible organic solvents on the activity and conformation of the Baeyer–Villiger monoxygenases from *Thermobifida fusca* and *Acinetobacter calcoaceticus*: a comparative study, *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 491–499, doi: 10.1002/bit.22963.
- Jensen, C. N., Ali, S. T., Allen, M. J., and Grogan, G. (2013) Mutations of an NAD(P)H-dependent flavoprotein monoxygenase that influence cofactor promiscuity and enantioselectivity, *FEBS Open Bio*, **3**, 473–478, doi: 10.1016/j.fob.2013.09.008.
- Van Bloois, E., Dudek, H. M., Duetz, W. A., and Fraaije, M. W. (2012) A stepwise approach for the reproducible optimization of PAMO expression in *Escherichia coli* for whole-cell biocatalysis, *BMC Biotechnol.*, **12**, 12–31, doi: 10.1186/1472-6750-12-31.
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., and Pedersen, J. (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins, *Protein Expr. Purif.*, **48**, 1–13, doi: 10.1016/j.pep.2005.12.002.
- Zhao, D., and Huang, Z. (2016) Effect of His-tag on expression, purification, and structure of zinc finger protein, ZNF191(243–368), *Bioinorg. Chem. Appl.*, **2016**, 8206854, doi: 10.1155/2016/8206854.
- Tishkov, V. I., Pometun, A. A., Stepashkina, A. V., Fedorchuk, V. V., Zarubina, S. A., Kargov, I. S., Atroshenko, D. L., Parshin, P. D., Kovalevski, R. P., Boiko, K. M., Eldarov, M. A., D’Oronzo, E., Facheris, S., Secundo, F., and Savin, S. S. (2018) Rational design of practically important enzymes, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **73**, 1–6, doi: 10.3103/S0027131418020153.
- Booth, W. T., Schlachter, C. R., Pote, S., Ussin, N., Mank, N. J., Klapper, V., Offermann, L. R., Tang, C., Hurlburt, B. K., and Chruszcz, M. (2018) Impact of an N-terminal polyhistidine tag on protein thermal stability, *ACS Omega*, **3**, 760–768, doi: 10.1021/acsomega.7b01598.
- Esen, H., Alpdağtaş, S., Mervan Çakar, M., and Binay, B. (2019) Tailoring of recombinant FDH: effect of histidine tag location on solubility and catalytic properties of *Chaetomium thermophilum* formate dehydrogenase (CtFDH), *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **49**, 529–534, doi: 10.1080/10826068.2019.1599394.
- Rissom, S., Schwarz-Linek, U., Vogel, M., Tishkov, V. I., and Kragl, U. (1997) Synthesis of chiral  $\epsilon$ -lactones in a two-enzyme system of cyclohexanone monoxygenase and formate dehydrogenase with integrated bubble-free aeration, *Tetrahedron Asymmetry*, **8**, 2523–2526, doi: 10.1016/S0957-4166(97)00311-X.
- Schwarz-Linek, U., Krödel, A., Ludwig, F.-A., Schulze, A., Rissom, S., Kragl, U., Tishkov, V. I., and Vogel, M. (2001) Synthesis of natural product precursors by Baeyer–Villiger oxidation with cyclohexanone monoxygenase from *Acinetobacter*, *Synthesis*, **33**, 947–951, doi: 10.1055/s-2001-13394.
- Тишков В. И. (1993) *Структура, механизм действия и белковая инженерия NAD<sup>+</sup>-зависимой форматдегидрогеназы*, Дис. докт. хим. наук, МГУ, Москва.
- Tishkov, V. I., Galkin, A. G., Fedorchuk, V. V., Savitsky, P. A., Rojkova, A. M., Gieren, H., and Kula, M.-R. (1999) Pilot scale production and isolation of recombinant NAD<sup>+</sup>- and NADP<sup>+</sup>-specific formate dehydrogenase, *Biotechnol. Bioeng.*, **64**, 187–193.
- Serov, A. E., Popova, A. S., Fedorchuk, V. V., and Tishkov, V. I. (2002) Engineering of coenzyme specificity of formate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.*, **367**, 841–847, doi: 10.1042/BJ20020379.
- Пометун А. А., Паршин П. Д., Галаничева Н. П., Упоров И. В., Атрошенко Д. Л., Савин С. С., Тишков В. И. (2020) Влияние последовательности His<sub>6</sub> на свойства форматдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101, *Вестник МГУ, Сер. 2: Химия*, **61**, 317–325.

**INFLUENCE OF POSITION OF HIS<sub>6</sub>-SEQUENCE ON EXPRESSION AND PROPERTIES OF PHENYLACETONE MONOOXYGENASE FROM *Thermobifida fusca*\***

**P. D. Parshin<sup>1,2</sup>, A. A. Pometun<sup>1,2,3\*\*</sup>, U. A. Martysuk<sup>4</sup>, S. Yu. Kleymenov<sup>3,5</sup>,  
D. L. Atroshenko<sup>1,2,3</sup>, E. V. Pometun<sup>6</sup>, S. S. Savin<sup>1,2,3</sup>, and V. I. Tishkov<sup>1,2,3\*\*</sup>**

<sup>1</sup> *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119234 Moscow, Russia;  
E-mail: aapometun@gmail.com; vitishkov@gmail.com*

<sup>2</sup> *Innovations and High Technologies MSU Ltd, 109551 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology  
of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia*

<sup>4</sup> *Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 125047 Moscow, Russia*

<sup>5</sup> *Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

<sup>6</sup> *Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

Received March 23, 2020

Revised March 27, 2020

Accepted March 27, 2020

Phenylacetone monooxygenase (EC 1.14.13.92, PAMO) is an enzyme catalyzing ketone oxidation with molecular oxygen and NADPH to yield esters. PAMO is a promising enzyme for biotechnological processes. In this work, genetic constructs based on PAMO gene from *Thermobifida fusca*, containing N- and C-terminal His-tags (His<sub>6</sub> sequence), e.g. PAMO N and PAMO C, respectively, were generated as well as PAMO L construct with His-tag attached to the enzyme C-terminus via a 19 a.a. spacer. All PAMO variants were expressed in active form in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells, however, the PAMO N expression level was 3-5-fold higher than for the other variants. Catalytic constants ( $k_{cat}$ ) determined for PAMO C and PAMO L agreed with those published for PAMO L produced in a different expression system. For PAMO N, a small decrease (15%) in  $k_{cat}$  was observed. The values of Michaelis constants for NADPH for all PAMO variants were in agreement within the experimental error with the literature data for PAMO L, but  $K_M$  for benzyl acetone was several times higher. Thermal inactivation kinetics and differential scanning calorimetry demonstrated a 3- to 4-fold higher thermal stability for PAMO N compared to the enzyme variants with C-terminal His-tag.

**Keywords:** phenylacetone monooxygenase, His-tag, gene expression, mutagenesis, catalytic properties, temperature stability

УДК 618.39-021.3

## АКТИВАЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ

© 2020 Л.В. Кречетова, Л.В. Ванько, В.В. Вторушина,  
М.А. Николаева, Е.В. Инвиева\*, Н.К. Тетрушвили

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии  
имени академика В.И. Кулакова Минздрава России, 117997 Москва, Россия;  
электронная почта: e\_inviyeva@oparina4.ru

Поступила в редакцию 08.11.2019

После доработки 20.03.2020

Принята к публикации 20.03.2020

Исследовано значение уровня активации лимфоцитов у женщин с идиопатическим привычным выкидышем (ИПВ) в формировании иммунной толерантности и для исхода беременности при иммуноцитотерапии (ИЦТ). Выявлены особенности фенотипической характеристики и содержания активированных Т- и НК-лимфоцитов периферической крови женщин с ИПВ в зависимости от исхода беременности, заключающегося в пролонгировании до доношенного срока или реализации привычного выкидыша. Доля активированных клеток среди субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD8^+ / CD3^+CD8^+CD69^+$ ) у женщин с прервавшейся беременностью до ИЦТ была значимо ниже, а после ИЦТ в 5–6 недель беременности выше, чем при пролонгированной беременности. Чрезмерное увеличение в содержании и доле активированных цитотоксических лимфоцитов может быть механизмом нарушения иммуноtolерантности матери к аллоантигенам плода, являющегося ведущим фактором прерывания беременности на ранних сроках. Получены данные, подтверждающие участие активированных Th-17-клеток наряду с  $FOXP3^+Treg$  в механизмах формирования толерантности к отцовским антигенам плода. Снижение доли  $CD4^+CD25^{high}ROR\gamma t^+$ -лимфоцитов на ранних сроках гестации (5–6 недель) при значимо повышенном уровне продукции ИЛ-17 стимулированными *in vitro* клетками цельной крови у женщин с выкидышем, по сравнению с уровнем у женщин с пролонгированной беременностью, позволяет предполагать нарушение баланса между провоспалительными Th17- и регуляторными Т-клетками. У женщин с доношенной беременностью показано отсутствие дисбаланса в содержании Т-эффекторных лимфоцитов. В совокупности полученные данные свидетельствуют о важной роли гестационной активации лимфоцитов в формировании реакций женской иммунной системы на аллоантигены плода, необходимые для пролонгирования беременности.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** иммуноtolерантность, привычный выкидыш, иммуноцитотерапия, экспрессия CD69, Т-лимфоциты, НК-клетки.

DOI: 10.31857/S0320972520050073

### ВВЕДЕНИЕ

Толерантность к отцовским антигенам является необходимым условием для нормального течения беременности и ключевым фактором нормального развития плода. Установлено, что сигналы от оплодотворенной яйцеклетки (ее поверхностные антигены и продуцируемые ею

различные пептиды, такие, как факторы роста, цитокины, хорионический гонадотропин человека, преимплантационный фактор) появляются уже через несколько часов после фертилизации и запускают каскад ответных гормональных сигналов, подготавливающих материнский организм к беременности [1]. Распознавание чужеродных отцовских антигенов плода приводит к аллогенной стимуляции материнской иммунной системы и последующему развитию клеточных и гуморальных реакций, способствующих формированию иммунной толерантности, препятствующей отторжению плода и нормальному развитию беременности. Однако у 1–5% женщин наблюдают повторяющиеся спонтанные потери беременности на ранних сроках [2]. Потери беременности на сроках до 7–8 недель при исключении всех известных факторов выкидыша, в том числе, инфекционных, связывают с

Принятые сокращения: ИПВ – идиопатический привычный выкидыш; ИЦТ – иммуноцитотерапия; НК-клетки – натуральные клетки-киллеры; AHR – рецептор ароматических углеводородов; Treg – Т-регуляторные клетки; Th1 – Т-хелперы 1 типа; Th17 – Т-хелперы 17 типа; FOXP3 – транскрипционный фактор, регулирующий дифференцировку клеток и экспрессию цитокинов (forkhead box p3), участвующих в супрессии иммунного ответа; ROR $\gamma t$  – транскрипционный фактор, регулирующий дифференцировку Т лимфоцитов в направлении Th17 (retinoid-related orphan receptors).

\* Адресат для корреспонденции.

нарушениями иммунологических процессов, прежде всего, с нарушением распознавания отцовских антигенов, которое проявляется недостаточным контролем над интенсивностью воспалительных реакций в этот период. Предполагается, что нарушение иммуноtolерантности матери в отношении аллоантигенов плода является ведущим фактором прекращения развития беременности, а в случае неоднократно повторяющихся потерь беременности формирования симптомокомплекса — идиопатического привычного выкидыша (ИПВ).

Проблемы контроля уровня и направленности воспалительных реакций в ранние сроки беременности, как с научной, так и с практической целью, обсуждаются в иммунологии репродукции на протяжении десятилетий, особенно с точки зрения использования различных видов иммунокорректирующей терапии — аллоиммунизации введением отцовских лимфоцитов, или иммуноцитотерапии (ИЦТ), предложенной с целью коррекции нарушений формирования толерантности и пролонгирования беременности до доношенного срока у женщин с ИПВ. Несмотря на достаточно продолжительное время использования ИЦТ для предупреждения прерывания беременности на ранних сроках, мнение об эффективности этого способа лечения неоднозначно [3]. Поэтому продолжают исследования механизмов, лежащих в основе нарушений иммуноtolерантности матери к аллоантигенам плода, и влияния на них ИЦТ.

Изучение проявлений аллоиммунных нарушений при беременности проводится на клеточном и молекулярном уровнях, в клинических исследованиях и на экспериментальных моделях, однако до сих пор недостаточно выяснены вопросы о том, какие иммунные механизмы обеспечивают формирование толерантности и какие изменения в содержании молекулярных и клеточных факторов приводят к нарушению гестационного процесса. Популярной гипотезой долгое время была парадигма Th1/Th2-ответа, отражающая важность определенного соотношения провоспалительных и противовоспалительных факторов, согласно которой клетки, продуцирующие цитокины Th2-типа, являются основой для индукции и поддержания толерантности при беременности и особенно на ранних ее этапах. К настоящему времени она сменяется на парадигму, включающую T-регуляторные клетки (Th1/Th2/Th17/Tрег). Важная роль в формировании и поддержании толерантности отводится цитотоксическим и регуляторным T-клеткам, а также естественным клеткам-киллерам (NK-клетки). Для понимания механизмов влияния ИЦТ на состояние иммунной системы

женщин с привычным выкидышем необходимо учитывать не только соотношение субпопуляций лимфоцитов, но и их способность отвечать на активационный стимул. В эксперименте в качестве активационного стимула используют митогены — поликлональные активаторы, которые вызывают каскад изменений T- и B-лимфоцитов, сходный с происходящими при действии специфических антигенов, но не приводящий к их дальнейшей дифференцировке. Наиболее ранним маркером активации служит мембранный гликопротеин CD69, временно экспрессируемый на активированных лимфоцитах. Экспрессия CD69 T-лимфоцитами индуцируется активационным сигналом через T-клеточный рецептор (ТКР). Неполная активация может приводить к анергии T-эффекторных клеток, а через нарушение продукции трансформирующего фактора роста (ТФР-β) — к дисфункции T-регуляторных клеток (Трег). В случае полноценной активации индуцированная экспрессия CD69 коррелирует с пролиферацией T-лимфоцитов, их дифференцировкой, высокой продукцией ТФР-β, снижением интенсивности воспалительных процессов и формированием толерогенных дендритных клеток [4]. Трег-клетки также отвечают увеличением экспрессии CD69 на активацию митогенами с последующим изменением их функционального состояния [5].

Своей цитоплазматической частью CD69 взаимодействует с белками сигнальных путей Jak3/Stat5, которые регулируют функцию RORγt, транскрипционного фактора Th17-клеток, направляя дифференцировку T-хелперов в направлении линии Th17-клеток [6], что отражает возможные механизмы участия CD69 в поляризации эффекторного иммунного ответа в направлении Th1/Th17/Tрег-клеток, особенно значимого в ранние сроки беременности. Есть данные, что STAT5 играет ключевую роль в индукции экспрессии FOXP3, транскрипционного фактора T-клеток с естественной супрессорной активностью, что подтверждается, с одной стороны, наличием STAT5-связанных сайтов в промоторном регионе интрона гена *FOXP3* и, с другой, — отсутствием у STAT5-дефицитных мышей FOXP3<sup>+</sup> Трег-клеток [7]. Следовательно, CD69 может напрямую участвовать в регуляции баланса Th17/Tрег-клеток [8, 9], и поэтому CD69 может рассматриваться как естественный модулятор программ T-клеточной дифференцировки. В отличие от T-лимфоцитов активация NK-клеток связана не с пролиферацией, а с эффекторной функцией, в основе которой лежит баланс ингибиторных и активирующих рецепторов.

Несомненный интерес представляет выяснение особенностей функционирования иммун-

ной системы у пациенток с ИПВ, соотношения и активации цитотоксических иммунных клеток и Трег после применения ИЦТ у женщин с ИПВ в случае успешного пролонгирования беременности до рождения жизнеспособного плода или выкидыша, что может иметь значение для прогноза исхода беременности у женщин с ИПВ.

Целью данной работы было выяснение значения уровня активации лимфоцитов у женщин с идиопатическим привычным выкидышем в формировании толерантности при беременности на фоне иммуноцитотерапии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группу исследования составили 36 пациенток с ИПВ, которые забеременели после предгестационной аллоиммунизации, у 30 пациенток беременность пролонгирована до доношенного срока и завершилась рождением жизнеспособного ребенка, у 6 — прервалась до 12 недель гестации. В контрольной группе обследовано 15 фертильных женщин вне беременности и 11 женщин в 12 недель физиологической беременности.

Критерии включения в группу исследования: наличие не менее 2-х потерь беременности в I-м триместре (от одного партнера), отсутствие инфекционного, анатомического, генетического, гормонального, аутоиммунного факторов потерь беременности и тяжелой экстрагенитальной патологии.

Критерии включения в контрольную группу: наличие, как минимум, одних родов в анамнезе, неотягощенный акушерский и гинекологический анамнез, физиологическое течение данной беременности.

В обеих группах возраст женщин был 20–40 лет, беременность наступала самопроизвольно.

**Кровь для анализа** забирали натошак из локтевой вены. У женщин вне беременности забор проводили на 18–22 день менструального цикла, у беременных — при сроке 5–6 недель, в 8–9 недель и в 12 недель гестации.

**Процедуру ИЦТ** проводили лимфоцитами супругов в предгестационной подготовке и в I-м триместре наступившей беременности. Методика выделения лимфоцитов и проведения ИЦТ утверждена на заседании Ученого совета ФГБУ «НЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 19 от 25 декабря 2012 г.). Для проведения процедуры использовали лимфоциты, соответствующие критериям донорства.

В процедурном кабинете осуществляли забор крови у мужчин из локтевой вены в стерильную пробирку объемом 50 мл, в качестве анти-

коагулянта использовали 200 мкл раствора гепарина (концентрация раствора гепарина 5000 МЕ/мл). В специальном помещении, оснащенном стерильным ламинарным шкафом («АМС-МЗМО», Россия) и необходимым лабораторным оборудованием — центрифугой, («ELMI», Латвия) осуществляли выделение лимфоцитарной взвеси. После тщательного перемешивания кровь инкубировали при 37 °С в течение 1–1,5 ч. После разделения крови на 2 слоя (верхний — плазма с моноклеарными клетками, нижний — эритроциты), верхний слой переносили в центрифужную стерильную пробирку объемом 14 мл и центрифугировали в течение 7 мин при 1500 об./мин. После удаления супернатанта в пробирку вносили 6 мл стерильного физиологического раствора, наслаивали на 3 мл фиколла в двух пробирках параллельно, сохраняя соотношение 1 : 2, и центрифугировали в течение 30 мин при 1500 об./мин. Лимфоцитарные кольца собирали в чистую стерильную пробирку объемом 14 мл, отмывали дважды физиологическим раствором в течение 7 мин при 1500 об./мин, после чего надосадочную жидкость удаляли, осадок тщательно перемешивали в 2 мл стерильного физиологического раствора. Концентрация лимфоцитов в физиологическом растворе составляла 30–50 млн в 1 мл раствора. Лимфоциты вводили внутрикожно в ладонную поверхность предплечья женщин дважды с интервалом в один месяц на 5–10 день менструального цикла. Во время наступившей беременности иммунизацию проводили при сроке 5–6 недель и 8–9 недель.

Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, оценивали после стимуляции цельной крови фитогемагглютинином (ФГА) в концентрации 10 мкг/мл в течение 2 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе («SANYO», Япония) при температуре 37 °С. Для оценки поверхностного фенотипа стимулированных лимфоцитов использовали моноклональные антитела (mAb), объединенные набором FastImmune, предназначенные для определения фенотипов CD3/CD4/CD69, CD3/CD8/CD69, CD45/CD56/CD69, («Becton Dickinson», США). В данных наборах антитела к CD3 и CD45 были мечены перидинин-хлорофилл-протеином (PerCP), антитела к CD4, CD8, CD56 были мечены флюоресцеинизотиоцианатом (FITC), антитела к CD69 были мечены фикоэритрином (PE). mAb добавляли непосредственно к цельной крови, лизировали с помощью раствора OptiLyse («Beckman Coulter», США).

Для оценки в периферической крови доли Th17-клеток, экспрессирующих RORγt<sup>+</sup>, среди лимфоцитов с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> клетки выделяли стандартным методом центрифугиро-

вания в градиенте плотности с использованием смеси фиколл-верографин плотностью 1,077 [28]. До пермеабилзации клетки окрашивали антителами к CD4, меченными FITC, и антителами к CD25, меченными PE; после пермеабилзации – антителами к ROR $\gamma$ t, меченными аллофикоцианином (APC) («eBioscience», США). Содержание клеток в лимфоцитарном гейте составляло 1–1,5 млн.

Цитометрический анализ проводили на проточном флуориметре Gallios («Beckman Coulter», США) с использованием программы Kaluza Software Version 1.2 («Beckman Coulter», США).

Содержание IL-17 оценивали с помощью мультиплексного анализа с использованием аналитической системы Cytometric Bead Array (CBA), с помощью стандартного набора «Human IL-17A Flex set» («Becton Dickinson», США) в супернатантах клеточных культур после добавления к 1 мл цельной крови смеси митогенов (4 мкг ФГА, 4 мкг конканавалина А (Кон А)), 2 мкг липополисахарида, используя набор «Цитокин-стимул-бест» («Вектор-Бест», Россия). Клетки инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C в течение 24 ч. Супернатант получали последовательным центрифугированием сначала в течение 10 мин при 3000 g, затем в течение 3 мин при 10 000g («Hettich», Германия), образцы аликвотировали и хранили при –80 °C. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur («Becton Dickinson», США). Расчет результатов производили с помощью программы FlowCytomix-Pro-3.0 («Becton Dickinson», США).

**Статистическая обработка данных** проводилась с использованием пакета Microsoft Office Excel 2007 и программы MedCalc12 для Windows 7. Проверку гипотезы о нормальном распределении осуществляли, используя критерии Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка [29]. Данные представлены средней арифметической величиной и её стандартной ошибкой ( $M \pm m$ ). Для оценки значимости различий использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Особенности содержания в периферической крови женщин с ИПВ лимфоцитов, экспрессирующих CD69.** В табл. 1 представлен ретроспективный анализ содержания лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих CD69 спонтанно и после стимуляции *in vitro*, у пациенток с ИПВ в анамнезе с учетом исходов беременности, наступившей после проведения предгес-

тационной ИЦТ, а также у фертильных женщин контрольной группы вне беременности.

Как следует из представленных данных, у женщин с беременностью, пролонгированной на фоне ИЦТ до доношенного срока, различий в оцениваемых параметрах с контрольной группой фертильных женщин не выявлено ни до назначения лечения, ни после ИЦТ. У женщин, потерявших беременность в I-м триместре содержание лимфоцитов, отвечающих на стимуляцию *in vitro* до ИЦТ, было значимо меньше, чем в контроле (субпопуляции CD45<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) и у женщин с пролонгированной беременностью (субпопуляции CD45<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>). После ИЦТ в этой группе обнаружена яркая тенденция ( $0,05 \leq p \leq 0,09$ ) к увеличению содержания указанных субпопуляций по сравнению с исходными значениями, а содержание лимфоцитов с цитотоксической активностью, экспрессирующих CD69 после стимуляции *in vitro* (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>), было значимо выше, чем у женщин с пролонгированной беременностью. По-видимому, исходно сниженное и повышенное после ИЦТ количество лимфоцитов, реагирующих на активационный стимул *in vitro*, у женщин, потерявших беременность, может быть связано с измененной функциональной активностью этих клеток, особенно с их цитотоксическим действием.

Для выяснения вопроса о том, происходит ли у пациенток с благополучным исходом беременности на ранних сроках изменение содержания лимфоцитов, экспрессирующих CD69, определяли количество лимфоцитов, отвечающих на активационный стимул *in vitro*, в течение I-го триместра беременности. Результаты проведенного исследования представлены в табл. 2. Как следует из данных таблицы, у женщин с пролонгированной беременностью в течение I-го триместра не выявлено динамики измеренных показателей.

Сравнительный анализ измеренных показателей в 5–6 недель беременности, наступившей после проведенной предгестационной ИЦТ, у женщин с пролонгированной на фоне ИЦТ беременностью и у женщин, потерявших беременность, выявил значимые различия (табл. 3). В 5–6 недель гестации у женщин, потерявших беременность на фоне ИЦТ, определяли значимо большее, чем у женщин с пролонгированной беременностью, количество лимфоцитов, как спонтанно экспрессирующих CD69 (CD45<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>), так и после стимуляции митогеном (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>), то есть количество Т-лимфоцитов, но не NK-клеток (CD45<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>).

**Таблица 1.** Содержание вне беременности в периферической крови пациенток с ИПВ лимфоцитов, экспрессирующих CD69 *in vitro* ( $M \pm m$ )

Фенотип лимфоцитов, экспрессирующих CD69	Экспрессия		Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %		
			в контроле ( $n = 15$ )	с доношенной беременностью ( $n = 30$ )	с выкидышем ( $n = 6$ )
CD45 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	спонтанная	до ИЦТ	7,9 ± 0,8	7,8 ± 0,8	7,3 ± 1,3
		после ИЦТ		7,4 ± 0,6	7,2 ± 1,2
CD45 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	до ИЦТ	30,7 ± 2,9	30,2 ± 3,7	20,6 ± 2,9 <sup>*,**</sup>
		после ИЦТ		24,9 ± 2,9	42,0 ± 11,7 <sup>#</sup>
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	спонтанная	до ИЦТ	6,2 ± 0,6	6,1 ± 0,7	6,0 ± 1,1
		после ИЦТ		5,7 ± 0,5	5,7 ± 1,3
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	до ИЦТ	25,7 ± 3,7	27,1 ± 4,1	19,1 ± 2,7 <sup>**</sup>
		после ИЦТ		22,0 ± 2,65	38,9 ± 10,6 <sup>#</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	до ИЦТ	15,9 ± 2,2	15,4 ± 2,4	12,5 ± 2,1
		после ИЦТ		12,8 ± 1,9	22,2 ± 6,2 <sup>#</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	до ИЦТ	12,8 ± 1,6	11,7 ± 2,0	6,6 ± 0,7 <sup>*,**</sup>
		после ИЦТ		9,2 ± 0,9	16,7 ± 4,5 <sup>*,∇,♦</sup>
CD45 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	до ИЦТ	3,8 ± 0,5	4,5 ± 0,8	2,7 ± 0,3 <sup>*,**</sup>
		после ИЦТ		4,0 ± 0,7	5,6 ± 1,3 <sup>∇</sup>

Примечание. Различия значимы при  $p \leq 0,05$  при сравнении: \* с контролем, \*\* между группами, <sup>∇</sup> с исходными значениями. Различия значимы при  $0,05 \leq p \leq 0,09$  при сравнении: ♦ между группами, # с исходными значениями.

**Таблица 2.** Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, у пациенток с ИПВ в течение первого триместра пролонгированной беременности ( $M \pm m$ )

Фенотип лимфоцитов, экспрессирующих CD69	Экспрессия	Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %		
		в 5–6 недель ( $n = 19$ )	в 8–9 недель ( $n = 18$ )	в 12 недель ( $n = 11$ )
CD45 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	спонтанная	6,5 ± 0,6	5,9 ± 0,6	7,0 ± 0,5
CD45 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	29,2 ± 4,0	33,6 ± 2,8	37,2 ± 5,3
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	спонтанная	5,0 ± 0,5	5,9 ± 0,6	5,0 ± 0,4
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	26,0 ± 3,6	29,7 ± 3,1	35,4 ± 5,5
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	15,9 ± 2,6	17,6 ± 1,9	18,4 ± 2,5
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	10,7 ± 1,3	12,8 ± 1,7	17,0 ± 4,6
CD45 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	4,6 ± 0,6	4,7 ± 0,6	6,3 ± 2,5

Была проведена оценка доли активированных лимфоцитов (CD69<sup>+</sup>) среди клеток CD45<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-субпопуляций (табл. 4) и выявлено, что у пациенток,

потерявших данную беременность, доля Т-лимфоцитов с цитотоксической функцией, экспрессирующих на своей поверхности CD69 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>,  $p = 0,006$ ), до предгестаци-

онной ИЦТ была ниже, чем у женщин с пролонгированной беременностью. После ИЦТ отмечены тенденции к увеличению доли активированных Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>,  $p = 0,09$ , CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>,  $p = 0,1$ ), и это увеличение в 5–6 недель гестации стало значимым, особенно для доли Т-лимфоцитов с цитотоксической функцией (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>-клеток среди CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов  $p = 0,016$ ). Разницы в доле активированных НК-клеток не обнаружено.

Сравнительный анализ активированных лимфоцитов исследованных субпопуляций у пациенток с пролонгированной беременностью в 12 недель гестации с уровнем у женщин с физиологическим течением беременности не выявил значимых различий в содержании лимфоцитов, экспрессирующих CD69 после стимуляции *in vitro*, за исключением количества лимфоцитов, спонтанно экспрессирующих CD69 *in vitro* (табл. 5). У пациенток с пролонгированной беременностью содержание таких активирован-

**Таблица 3.** Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, у пациенток с ИПВ в 5–6 недель гестации (M ± m)

Фенотип лимфоцитов, экспрессирующих CD69	Экспрессия	Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %	
		при пролонгированной беременности	при выкидыше
		в 5–6 недель ( $n = 19$ )	в 5–6 недель ( $n = 6$ )
CD45 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	спонтанная	6,5 ± 0,6	9,0 ± 0,7 ( $p = 0,008$ )
CD45 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	29,2 ± 4,0	45,1 ± 6,9 ( $p = 0,04$ )
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	спонтанная	5,0 ± 0,5	7,1 ± 0,7 ( $p = 0,019$ )
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	26,0 ± 3,6	41,8 ± 7,1 ( $p = 0,042$ )
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	15,9 ± 2,6	24,7 ± 4,1 ( $p = 0,052$ )
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	10,7 ± 1,3	17,2 ± 3,3 ( $p = 0,058$ )
CD45 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	4,6 ± 0,6	4,9 ± 0,9

**Таблица 4.** Доля активированных лимфоцитов у пациенток с ИПВ с разными исходами беременности, наступившей после предгестационной ИЦТ (M ± m)

Фенотип лимфоцитов, экспрессирующих CD69	Исходы беременности	Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %		
		до ИЦТ	после ИЦТ	в 5–6 недель гестации
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	пролонгированная до доношенного срока	24,8 ± 4,3	21,1 ± 3,0	25,7 ± 4,2
	выкидыш в I триместре	20,3 ± 3,3	41,1 ± 12,2; $p = 0,09$	40,3 ± 7,6; $p = 0,06$
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	пролонгированная до доношенного срока	33,3 ± 4,3	26,2 ± 2,6	32,5 ± 3,8
	выкидыш в I триместре	19,4 ± 2,4; $p = 0,006$	42,6 ± 10,7; $p = 0,1$	51,4 ± 8,2; $p = 0,016$
CD45 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	пролонгированная до доношенного срока	28,9 ± 4,0	25,5 ± 3,2	34,6 ± 4,9
	выкидыш в I триместре	21,9 ± 3,7	31,8 ± 7,7	39,9 ± 3,8

Примечание. Указаны значимые различия между показателями в группах с разными исходами беременности на конкретном этапе обследования.

Таблица 5. Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, у пациенток с ИПВ в 12 недель гестации ( $M \pm m$ )

Фенотип лимфоцитов, экспрессирующих CD69	Экспрессия	Содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, %	
		при физиологической беременности	при пролонгированной беременности
CD45 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	спонтанная	8,4 ± 0,5	7,0 ± 0,5 ( $p = 0,04$ )
CD45 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	37,2 ± 5,4	37,2 ± 5,3
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	спонтанная	6,6 ± 0,6	5,0 ± 0,4 ( $p = 0,02$ )
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	27,5 ± 2,6	35,4 ± 5,5
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	19,4 ± 2,5	18,4 ± 2,5
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	13,4 ± 2,4	17,0 ± 4,6
CD45 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	стимулированная	5,5 ± 0,9	6,3 ± 2,5
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	стимулированная	32,0 ± 4,3	32,3 ± 4,4
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	стимулированная	42,3 ± 7,2	42,7 ± 7,2
CD45 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	стимулированная	43,4 ± 5,6	38,3 ± 5,9

ных клеток было ниже (CD45<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>,  $p = 0,04$  и  $p = 0,02$  соответственно). При оценке доли активированных лимфоцитов (CD69<sup>+</sup>) среди стимулированных субпопуляций CD45<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> также не обнаружено значимых различий между группами.

Таким образом, у пациенток с ИПВ, получавших ИЦТ, в случае пролонгирования беременности ответ Т-лимфоцитов на стимулирующее воздействие в течение I-го триместра не отличается от ответа лимфоцитов контрольной группы.

**Содержание Th17-лимфоцитов и продукция *in vitro* ИЛ-17 у женщин с ИПВ.** До предгестацион-

ной ИЦТ и после ее проведения в периферической крови женщин, потерявших беременность, и женщин с пролонгированной беременностью не обнаружено различий ни в доле Th17-клеток (ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>) среди лимфоцитов с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, ни в уровне продукции ИЛ-17 стимулированными клетками цельной крови (рис. 1).

В 5–6 недель гестации при значимом снижении доли субпопуляции CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> выявлен значимо повышенный уровень продукции ИЛ-17 стимулированными клетками цельной крови женщин с выкидышем по сравнению с уровнями указанных показателей у женщин с пролонгированной беременностью.

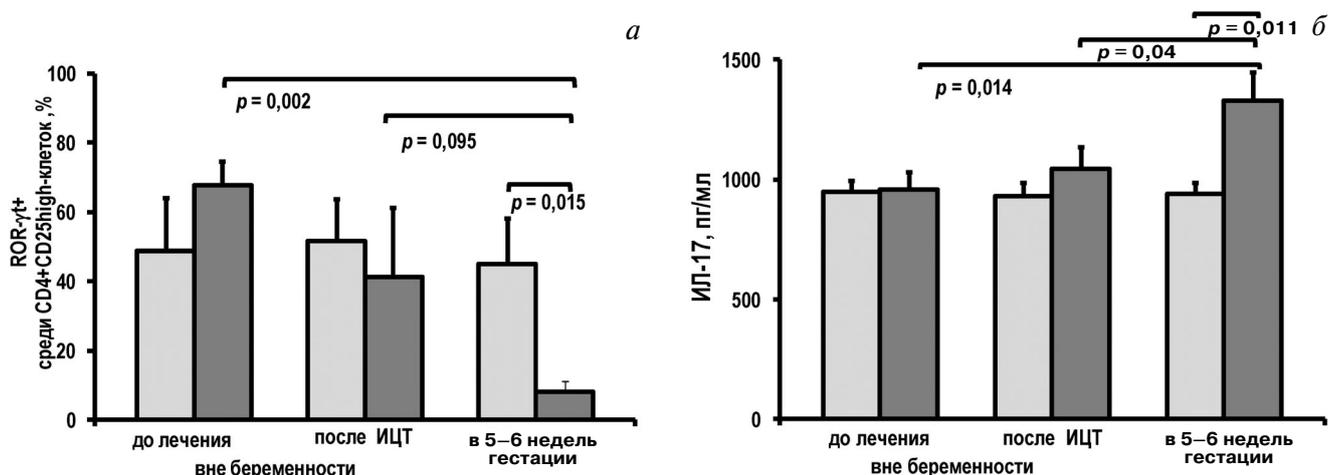
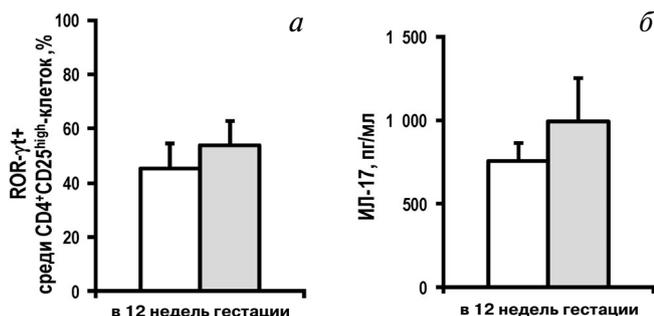


Рис. 1. Доля субпопуляции ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> среди лимфоцитов с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> в периферической крови женщин с ИПВ (а) и продукция ИЛ-17 стимулированными *in vitro* клетками цельной периферической крови (б). Квадрат светло-серого цвета – группа с пролонгированной беременностью, квадрат темно-серого цвета – группа с прервавшейся беременностью



**Рис. 2.** Доля субпопуляции RORγt<sup>+</sup> среди лимфоцитов с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (а) и продукция ИЛ-17 стимулированными *in vitro* клетками цельной периферической крови (б) женщин с ИПВ в 12 недель пролонгированной беременности. Квадрат белого цвета – группа с физиологическим течением беременности; квадрат светло-серого цвета – группа с пролонгированной беременностью

В 12 недель гестации у женщин с пролонгированной беременностью и с физиологическим течением беременности не выявлено значимых различий в доле CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>RORγt<sup>+</sup>-лимфоцитов и в уровне продукции ИЛ-17 стимулированными клетками цельной крови (рис. 2).

Следовательно, у пациенток с пролонгированной беременностью доля Th17-клеток среди лимфоцитов с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> и продукция ИЛ-17 митоген-стимулированными *in vitro* клетками цельной периферической крови в 12 недель не отличается от показателей контрольной группы.

Таким образом, выявленное в 5–6 недель гестации снижение доли CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>RORγt<sup>+</sup>-лимфоцитов при значимо повышенном уровне продукции ИЛ-17 стимулированными клетками цельной крови у женщин с выкидышем, по сравнению с уровнем у женщин с пролонгированной беременностью, позволяет предполагать нарушение баланса между Th17-клетками и регуляторными Т-клетками, важного для нормального формирования иммунологической толерантности и регуляции иммунного ответа в самые ранние сроки гестационного периода.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Толерантность к отцовским антигенам является необходимым условием для нормального течения беременности и ключевым фактором нормального развития плода. Очевидна необходимость иммунологического контроля уровня возникающих воспалительных реакций в ранние сроки гестации для создания гармоничного равновесия между процессами сохранения функциональной и анатомической целостности материнского организма при процессах дециду-

ализации матки, имплантации эмбриона, инвазии трофобласта, плацентации и последующего роста плода (при условии отсутствия у него генетических аномалий). Лимитирующими являются события на сроках до 5–6 недель гестации, когда при ультразвуковом исследовании четко визуализируется плодное яйцо и устанавливается наличие ритмичного сердцебиения. Поэтому потери беременности на сроках до 7–8 недель при исключении известных факторов выкидыша связывают с нарушениями иммунологических процессов и с недостаточностью контроля интенсивности связанных с распознаванием отцовских антигенов воспалительных реакций, приводящих либо к отторжению плода, либо к остановке его роста (замершей беременности). Идиопатический привычный выкидыш является, пожалуй, единственным акушерским осложнением, в генезе которого иммунологические причины признаются ведущими.

Проблемы контроля уровня и направленности воспалительных реакций в ранние сроки беременности с помощью ИЦТ до сих пор являются дискуссионными. К сожалению, однозначного мнения об эффективности данной процедуры в мировой практике нет, что обусловлено разнородностью анамнеза женщин, включенных в исследование, разными протоколами иммунизации и разнообразием показателей, используемых для оценки состояния женской иммунной системы при иммунизации [10, 11]. Успех ИЦТ в случае пролонгирования беременности до последнего времени связывают с изменением провоспалительного состояния иммунной системы беременной на противовоспалительное. Однако все чаще звучат утверждения о необходимости провоспалительного состояния материнской иммунной системы для успешности процессов и имплантации, и плацентации, что вызывает необходимость переосмысления роли ИЦТ для пролонгирования беременности у женщин с ИПВ [12].

В представленной работе анализируются результаты исследования содержания среди лимфоцитов периферической крови субпопуляций, которые при стимуляции митогеном *in vitro*, экспрессируют CD69 – самый ранний антиген, появление которого на клеточной поверхности свидетельствует об ответе на активационный стимул. CD69 индуцируется на клетках большинства типов гемопоэтических линий, включая Т-, В- и НК-клетки, и регистрируется уже через час после активационного стимула [13].

Оценка субпопуляций, экспрессирующих CD69, в ответ на активирующие сигналы в течение гестационного периода может иметь важное значение для понимания механизмов формиро-

вания толерантности и регуляции баланса реакций иммунной системы матери на антигены плода отцовского происхождения.

В настоящее время обсуждается участие CD69 в поляризации эффекторного иммунного ответа в направлении Th1/Th17/Трег-клеток посредством нескольких механизмов [4, 14, 15]. С одной стороны, известно, что одним из специфических лигандов для CD69 является галектин-1 (Gal-1), который экспрессируется стромальными клетками эндометрия на протяжении всего менструального цикла со значительным увеличением во время имплантации. Gal-1 индуцирует дифференцировку дендритных клеток в направлении фенотипа, который подавляет пути дифференцировки Th1/Th17 через ИЛ-10 и ИЛ-27. Взаимодействие галектина-1 с CD69, с одной стороны, способно стимулировать сигнальные пути JAK3/STAT5, участвующие в формировании клеток с фенотипом, присущим клеткам с естественной регуляторной (супрессивной) активностью (Трег, или FOXP3-экспрессирующие Трег). С другой стороны, экспрессия CD69 в активированных лимфоцитах способствует интернализации и деградации рецептора S1PR1 и блокированию STAT3-индуцированной экспрессии ИЛ-17, поскольку взаимодействие сфингозин-фосфата-1 (S1P1) с его рецептором S1PR1 (сопряженным с G-белком) стимулирует сигнальные пути mTORc/HIF-1 $\alpha$  (mammalian target of rapamycin/Нурохиа-inducible factor 1-alpha) и JAK2/pSTAT3, запускающие формирование Th1 или Th17 эффекторных реакций. И в этом варианте поддерживаются сигнальные пути, направленные на формирование Трег-клеток [14, 15].

Также участие CD69 в поддержании баланса Th1/Th17/Трег-клеток возможно через усиление транспорта триптофана комплексом LAT1-CD98 и активацию рецептора ароматических углеводородов (АНР) в результате связывания с высокоафинным природным лигандом FICZ (6-формилиндоло[3,2-b] карбазолом), индуцирующего Th17-направленность иммунного ответа через передачу сигнала на соответствующий промоторный участок (DRE – dioxin responsible element, или, что то же, AHRE aryl hydrocarbon responsible element) [30]. Также транспорт аминокислот комплексом CD69/LAT1-CD98 активирует серин-треониновую протеинкиназу mTOR – субъединицу внутриклеточных мультимолекулярных сигнальных комплексов TORC1 и TORC2, направляя развитие Th1 и Th17 эффекторного ответа и предотвращая дифференцировку Трег-клеток. Кроме того, mTOR контролирует активность HIF-1 $\alpha$ , который негативно регулирует функцию Трег-клеток, способ-

ствуя деградации Foxp3. Однако активация АНР ослабляет HIF-1 $\alpha$ -опосредованные эффекты, тем самым влияя на направленность дифференцировки эффекторных Т-клеток [14, 15].

При ранней беременности в условиях измененного метаболизма под влиянием гормонов и белков данного периода один из преимущественных путей передачи сигнала через CD69 может быть связан с усилением транспорта триптофана комплексом LAT1-CD98 и активацией АНР. Кроме того, в условиях гипоксии, которая характерна для ранних сроков беременности в физиологических условиях децидуализации эндометрия и перестройки спиральных артерий матки, могут нарушаться регуляторные механизмы, что приводит к недостаточному образованию Трег.

При действии ИЦТ скорее всего активируются оба этих механизма, поскольку помимо метаболической активации введение большого количества антигенов при действии ИЦТ активирует специфический иммунный ответ и на слабые антигены (адьювантный эффект). Ответ лимфоцитов на активирующее воздействие в разных локальных условиях (кожа, матка) различен, и скорее всего в матке во время беременности как минимум один из механизмов в условиях временной гипоксии не способствует образованию Трег.

Все вышеизложенное суммируется на схеме, представленной на рис. 3. За основу рисунка была принята схема, предложенная Sibrian и Sanchez-Madrid [14].

Активация иммунной системы женщин с ИПВ при иммунизации лимфоцитами супруга подтверждается появлением антиотцовских антителкоцитарных антител и динамикой указанных антител от процедуры к процедуре как вне беременности, так и во время беременности [16, 17]. Однако признаков активации Т-клеточного звена после ИЦТ вне беременности при анализе субпопуляционного состава лимфоцитов, включая содержание Трег с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup>, в периферической крови женщин с доношенной настоящей беременностью нами не было обнаружено [18], как не выявлено и изменений в содержании Th17-лимфоцитов с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>ROR $\gamma$ <sup>+</sup> (рис.1, а), в продукции ИЛ-17 (рис.1, б), в субпопуляционном составе лимфоцитов, экспрессирующих CD69 (табл. 1). Динамика Трег-клеток у женщин с доношенной беременностью была обнаружена в I-м триместре гестации [19], что свидетельствует о важной роли гестационной метаболической активации и различных регуляторных белков и пептидов ранней беременности в формировании реакций женской иммунной

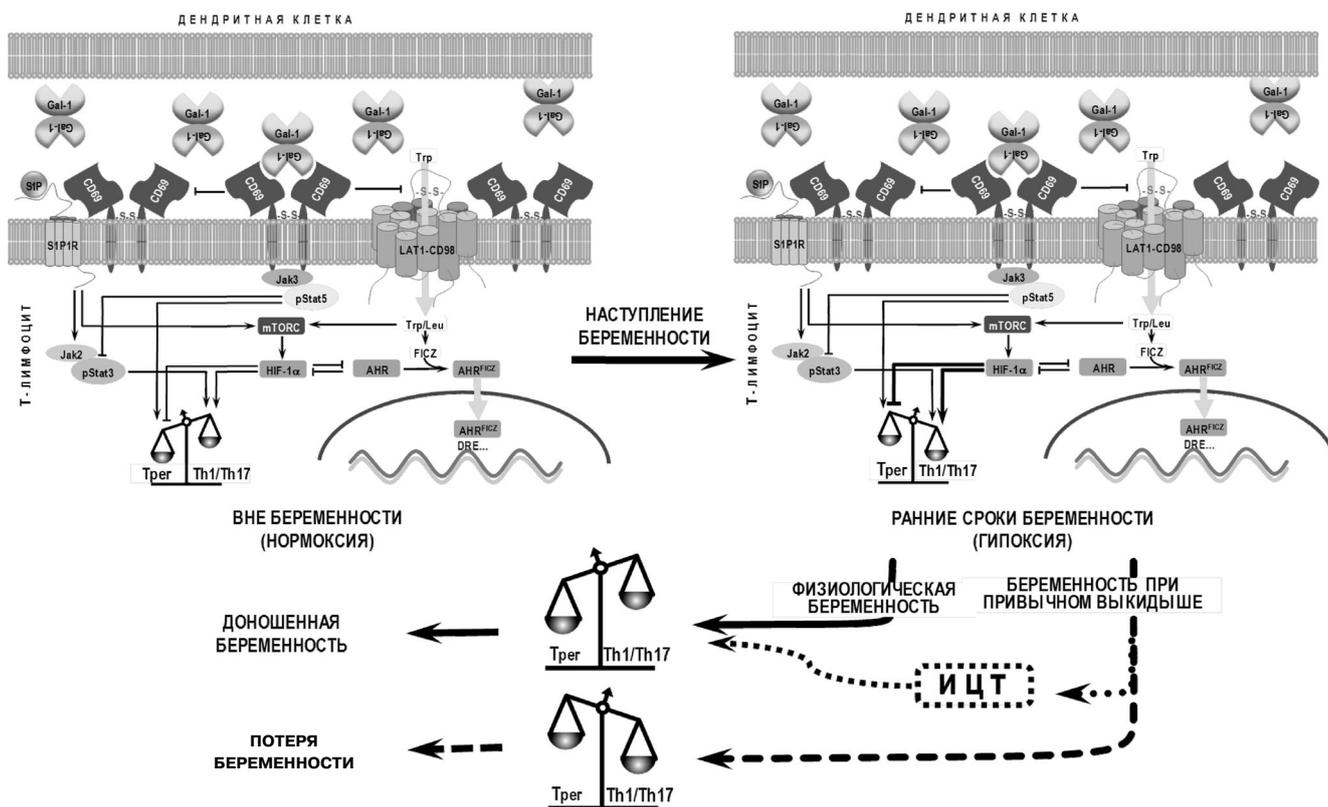


Рис. 3. Возможные механизмы регуляции баланса Th1/Th17/Tрег во время физиологической беременности и при привычном выкидыше

системы на аллоантигены плода. В субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови женщин с ИПВ, доживших беременность, и у женщин с физиологическим течением беременности, начиная с 12-ти недель гестации, не было выявлено отличий [20], так же как в составе лимфоцитов, экспрессирующих CD69 (табл. 5), в доле CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>RORγt<sup>+</sup>-лимфоцитов и продукции ИЛ-17 (рис. 2). Следовательно, ИЦТ способствовала пролонгированию беременности у данной категории женщин, и успех связан с формированием баланса в содержании Т-эффекторных лимфоцитов и цитокиновой продукции, поддерживающего развитие беременности (рис. 3).

У женщин с ИПВ, потерявших данную беременность в I-м триместре, до назначения ИЦТ было значимо меньше содержание лимфоцитов, отвечающих на стимуляцию *in vitro*, чем у женщин с пролонгированной беременностью (табл. 1). После предгестационной иммунотерапии в этой группе обнаружено увеличенное содержание CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>-лимфоцитов, а в 5–6 недель гестации определяли значимо большее количество именно Т-лимфоцитов, как спонтанно экспрессирующих CD69 (CD45<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> и

CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>), так и после стимуляции митогеном (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>), а также увеличение доли Т-лимфоцитов с цитотоксической функцией CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>-клеток среди CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов (табл. 3 и 4). Разницы в содержании НК-клеток, экспрессирующих CD69, и в доле активированных НК-клеток не обнаружено.

Уже устоялось представление о том, что во время нормальной беременности НК-клетки – это, прежде всего клетки, обеспечивающие процессы инвазии трофобласта и ремоделирования спиральных артерий под влиянием микроокружения, появляющегося в случае адекватного распознавания фетальных антигенов, что, в свою очередь, является условием возникновения специфической периферической толерантности при физиологической беременности [21]. Баланс между цитотоксической активностью Т-лимфоцитов и НК-клеток является очень важным для нормального развития беременности [22]. Вероятно, уровень экспрессии CD69 на поверхности Т-лимфоцитов, определяемый в периферической крови до стимуляции *in vitro* в условиях ИЦТ, является маркером уровня специфического ответа Т-лимфоцитов на отцовские

антигены плода. В таком случае можно предположить, что у женщин с выкидышем повышенный ответ цитотоксических лимфоцитов на поликлональную стимуляцию отражает и усиление специфического ответа на антигены плода.

Таким образом, по результатам представленного исследования гипотеза о нарушении распознавания отцовских антигенов плода как ведущего фактора выкидыша не подтверждается. И на первый план выдвигается гипотеза о контроле воспалительных реакций в ответ на появление антигенов полуаллогенного плода в репродуктивном тракте женщины. Вполне вероятно, что одним из таких контролирующих терапевтических мероприятий и выступает ИЦТ. Нельзя исключить, что у большинства пациенток ИЦТ может снижать избыточный ответ лимфоцитов как на поликлональную стимуляцию, так и на стимуляцию Т-лимфоцитов антигенами плода, о чем свидетельствует выявленный нами стабильный на всех сроках беременности уровень экспрессии CD69 на поверхности CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов у женщин с пролонгированной беременностью, но не у пациенток с выкидышем, у которых митоген-стимулированная экспрессия *in vitro* CD69 Т-лимфоцитами с цитотоксической направленностью была выше, чем у женщин с пролонгированной беременностью без различий в уровне ответа НК-клеток на поликлональный стимул.

Ранее нами было показано, что у женщин, потерявших данную беременность, содержание клеток с естественной киллерной активностью было низким по сравнению с содержанием у пациенток с пролонгированной беременностью уже до иммунизации вне беременности, и зависимость между низким содержанием CD56<sup>+</sup>-лимфоцитов и вероятностью потери беременности в I-м триместре сохранялась и в 5–6 недель беременности [23], что подтверждает мнение о том, что как низкое содержание Трег, так и низкое содержание НК-клеток являются значимыми маркерами спонтанных аборт [24]. Низкий уровень Трег с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup> в периферической крови был характерен для женщин с ИПВ как до предгестационной ИЦТ, так и в 5–6 недель гестации [23,25], и рост содержания этих лимфоцитов, как уже упоминалось, наблюдали в I-м триместре только у пациенток с пролонгированной беременностью. Кроме того, нами обнаружено не только снижение на фоне ИЦТ уровня НК-клеток до минимального в 5–6 недель гестации по сравнению с исходным у женщин, потерявших данную беременность [23], но и снижение доли субпопуляции CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>RORγt<sup>+</sup>-лимфоцитов, которое также стало минимальным

в 5–6 недель гестации при высоком уровне продукции ИЛ-17 стимулированными клетками цельной периферической крови (рис. 1). С одной стороны, низкий уровень в периферической крови клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>RORγt<sup>+</sup> может отражать усиленную миграцию Th17-клеток из периферической крови, а с другой, высокий уровень продукции ИЛ-17 отражает присутствие в периферической крови клеток, способных при стимуляции интенсивно продуцировать ИЛ-17 и формировать Th17-тип провоспалительных реакций.

Все вышеизложенное позволяет сделать вывод о дисбалансе иммунного ответа у пациенток с ИПВ, потерявших беременность, и о неэффективности ИЦТ у данной категории пациенток в контроле воспалительных реакций, развивающихся в ранние сроки беременности. При этом высокий уровень продукции ИЛ-17 стимулированными клетками периферической крови женщин с физиологическим течением беременности и у пациенток с пролонгированной беременностью в 12 недель гестации свидетельствует о том, что терапевтические мероприятия, проводимые для пролонгирования беременности, должны приводить к ослаблению, но не к отмене Th17-ответа у женщин с ИПВ.

Полученные результаты подтверждают участие активированных Th-17-клеток наряду с FOXP3<sup>+</sup>Tрег в механизмах формирования толерантности к отцовским антигенам плода. В будущем еще предстоит оценить роль транскрипционных факторов RORγt и Th17-клеток в механизмах формирования или срыва толерантности к отцовским антигенам плода при беременности [26]. И хотя в данной работе не показана возможность одновременной экспрессии RORγt и FOXP3 в клетках с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, однако есть экспериментальные данные о том, что именно с экспрессией RORγt в FOXP3<sup>+</sup>Tрег связана продукция высокого уровня интерферон-регулирующего фактора 4, который наделяет Трег способностью супрессировать Th2-ответ, что очень важно именно в ранние сроки беременности [27].

Таким образом, представленные результаты оценки способности лимфоцитов периферической крови пациенток с ИПВ отвечать на стимулирующее воздействие *in vitro* экспрессией CD69 согласуются с современными представлениями об иммунных взаимоотношениях матери и плода в ранние сроки беременности, подтверждают формирование толерантности к аллоантигенам плода отцовского происхождения у пациенток с ИПВ, у которых беременность была пролонгирована до доношенного срока на фоне ИЦТ в предгестационной подготовке и в I-м триместре

гестации и завершилась рождением живого ребенка, а также неэффективность ИЦТ в контроле иммунных реакций, направленных на формирование толерантности, у женщин с ИПВ, потерявших данную беременность. Полученные результаты расширяют наши представления о роли активации лимфоцитов в формировании иммунной толерантности к аллоантигенам плода в ранние сроки беременности у женщин с ИПВ.

**Финансирование.** Работа была выполнена в рамках государственного задания АААА-А18-118053190024-2.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Всеми женщинами было подписано информированное согласие на проведение исследования.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сухих Г. Т., Ванько Л. В. (2003) *Иммунология беременности*, Изд-во РАМН, Москва.
2. Сидельникова В. М., Сухих Г. Т. (2011) *Невынашивание беременности: руководство для практикующих врачей*, Медицинское информационное агентство, Москва.
3. Carr, H. J. A. (2014) *Recurrent Pregnancy Loss: Causes, Controversies, and Treatment*, CRC Press, London.
4. Sancho, D., Gómez, M., and Sánchez-Madrid, F. (2005) CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation, *Trends Immunol.*, **26**, 136-140, doi: 10.1016/j.it.2004.12.006.
5. Hu, Y. P., Li, X. J., and Liu, S. W. (2010) Effects of ConA on early activation and function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cells in mice, *Chinese J. Cell. Mol. Immunol.*, **26**, 118-120, [in Chinese].
6. Martín, P., Gómez, M., Lawana, A., Cruz-Adalia, A., Ramírez-Huesca, M., Ursa, M. A., Yáñez-Mo, M., and Sánchez-Madrid F. (2010) CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation, *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 4877-4889, doi: 10.1128/MCB.00456-10.
7. Lu, L. F., and Rudensky, A. (2009) Molecular orchestration of differentiation and function of Regulatory T cells, *Genes Dev.*, **23**, 1270-1282, doi: 10.1101/gad.1791009.
8. Martín, P., and Sánchez-Madrid, F. (2011) CD69: an unexpected regulator of TH17 cell-driven inflammatory responses, *Sci. Signal.*, **4**, 14, doi: 10.1126/scisignal.2001825.
9. Miki-Hosokawa, T., Hasegawa, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tofukuji, S., Watanabe, Y., Hosokawa, H., Motohashi, S., Hashimoto, K., Shirai, M., Yamashita, M., and Nakayama, T. (2009) CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation, *J. Immunol.*, **183**, 8203-8215, doi: 10.4049/jimmunol.0900646.
10. Farquharson, R. G., and Stephenson, M. D. (2017) *Early pregnancy*, Cambridge University Press, Cambridge.
11. Porter, T. F., LaCoursiere, Y., and Scott, J. R. (2006) Immunotherapy for recurrent miscarriage, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2**, CD000112, doi: 10.1002/14651858.CD000112.pub2.
12. Mor, G. (2008) Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1127**, 121-128, doi: 10.1196/annals.1434.006.
13. Marzio, R., Mauël, J., and Betz-Corradin, S. (1999) CD69 and regulation of the immune function, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **21**, 565-582, doi: 10.3109/08923979909007126.
14. Cibrian, D., and Sanchez-Madrid, F. (2017) CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper, *Eur. J. Immunol.*, **47**, 946-953, doi: 10.1002/eji.201646837.
15. Labiano, S., Meléndez-Rodríguez, F., Palazón, A., Teijeira, A., Garasa, S., Etxeberria, I., Aznar, M. A., Sánchez-Paulete, A. R., Azpilikueta, A., Bolaños, E., Molina, C., de la Fuente, H., Maiso, P., Sánchez-Madrid, F., de Landázuri, M. O., Aragonés, J., and Melero, I. (2017) CD69 is a direct HIF-1 $\alpha$  target gene in hypoxia as a mechanism enhancing expression on tumor-infiltrating T lymphocytes, *Oncimmunology*, **6**, doi: 10.1080/2162402X.2017.1283468.
16. Кречетова Л. В., Хачатрян Н. А., Тетруашвили Н. К., Вторушина В. В., Степанова Е. О., Голубева Е. Л., Николаева М. А., Сухих Г. Т. (2015) Динамика выработки антилейкоцитарных антител к отцовским антигенам при иммунизации аллогенными клетками женщин с привычным выкидышем, *Акушерство и гинекология*, **3**, 16-20.
17. Кречетова Л. В., Тетруашвили Н. К., Вторушина В. В., Николаева М. А., Голубева Е. Л., Сарибегова В. А., Агаджанова А. А., Ванько Л. В. (2017) Динамика выработки антилейкоцитарных антител в течение беременности у женщин с привычным выкидышем на фоне иммуноцитотерапии, *Акушерство и гинекология*, **9**, 48-55, doi: 10.18565/aig.2017.9.48-55.
18. Кречетова Л. В., Степанова Е. О., Николаева М. А., Вторушина В. В., Голубева Е. Л., Хачатрян Н. А., Тетруашвили Н. К., Сухих Г. Т. (2015) Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови женщин с привычным выкидышем при предгестационной иммуноцитотерапии, *Акушерство и гинекология*, **4**, 37-43.
19. Кречетова Л. В., Тетруашвили Н. К., Вторушина В. В., Степанова Е. О., Николаева М. А., Голубева Е. Л., Хачатрян Н. А. (2015) Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови в первом триместре беременности у женщин с привычным выкидышем на фоне проведения иммуноцитотерапии, *Акушерство и гинекология*, **6**, 59-66.
20. Тетруашвили Н. К., Кречетова Л. В., Сарибегова В. А., Вторушина В. В., Голубева Е. Л., Хачатрян Н. А., Агаджанова А. А. (2017) Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациенток с привычным выкидышем аллоиммунного генеза в течение беременности, *Акушерство и гинекология: Новости, Мнения, Обучение*, **4**, 28-36.
21. Siewiera, J., Siewiera, J., Gouilly, J., Hocine, H. R., Cartron, G., Levy, C., Al-Daccak, R., and Jabrane-Ferrat, N. (2015) Natural cytotoxicity receptor splice variants orchestrate the distinct functions of human natural killer cell subtypes, *Nat. Commun.*, **6**, 12, doi: 10.1038/ncomms10183.
22. Nakashima, A., Nakashima, A., Shima, T., Inada, K., Ito, M., and Saito, S. (2012) The balance of the immune system between T cells and NK cells in miscarriage, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **67**, 304-310, doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01115.x.
23. Кречетова Л. В., Тетруашвили Н. К., Вторушина В. В., Николаева М. А., Хачатрян Н. А., Агаджанова А. А., Ванько Л. В., Иванец Т. Ю., Сухих Г. Т. (2017) Особенности

- ности фенотипа лимфоцитов периферической крови женщин с идиопатическим привычным выкидышем в зависимости от исхода беременности на фоне иммуноцитотерапии, *Акушерство и гинекология*, **7**, 52-60, doi: 10.18565/aig.2017.7.52-60.
24. Vacca, P., Moretta, L., Moretta, A., and Mingari, M. C. (2011) Origin, phenotype and function of human natural killer cells in pregnancy, *Trends Immunol.*, **32**, 517-523, doi: 10.1016/j.it.2011.06.013.
  25. Кречетова Л. В., Хачатрян Н. А., Тетруашвили Н. К., Вторушина В. В., Степанова Е. О., Николаева М. А., Сухих Г. Т. (2014) Особенности фенотипа лимфоцитов периферической крови женщин с привычным выкидышем, *Акушерство и гинекология*, **10**, 27-33.
  26. Nakachima, A., Ito, M., Yoneda, S., Shiozaki, A., Hidaka, T., and Saito, S. (2010) Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **63**, 104-109, doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00771.x.
  27. Ohnmacht, C., Park, J. H., Cording, S., Wing, J. B., Atarashi, K., Obata, Y., Gaboriau-Routhiau, V., Marques, R., Dulauroy, S., Fedoseeva, M., Busslinger, M., Cerf-Bensussan, N., Boneca, I. G., Voehringer, D., Hase, K., Honda, K., Sakaguchi, S., and Eberl, G. (2015) The microbiota regulates type 2 immunity through ROR $\gamma$ <sup>+</sup> T cells, *Science*, **349**, 989-993, doi: 10.1126/science.aac4263.
  28. Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Золотницкая Р. П. (1987) *Лабораторные методы исследования в клинике*, Медицина, Москва.
  29. Shapiro, S. S., and Wilk, M. B. (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples), *Biometrika*, **52**, 591-611.
  30. Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., and Weiner, H. L. (2008) Control of T reg and TH 17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor, *Nature*, **453**, 65-71, doi: 10.1038/nature06880.

## LYMPHOCYTE ACTIVATION IN IMMUNE TOLERANCE DEVELOPMENT IN WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS

L. V. Krechetova, L. V. Vanko, V. V. Vtorushina,  
M. A. Nikolaeva, E. V. Inviyaeva\*, and N. K. Tetrushvili

National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, 117997 Moscow, Russian Federation; E-mail: e\_inviyaeva@oparina4.ru

Received November 8, 2019  
Revised March 20, 2020  
Accepted March 20, 2020

Association between lymphocyte activation and formation of immune tolerance, as well as pregnancy outcome, in the case of immunocytotherapy (ICT) was studied in women with idiopathic recurrent pregnancy loss (IRPL). The content and phenotypic characteristics of activated T lymphocytes and NK cells were investigated in the peripheral blood of IRPL patients with different pregnancy outcomes (pregnancy prolongation to the full term and habitual miscarriage). The fraction of activated cells in the subpopulation of cytotoxic T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) before ICT was significantly lower in women who lost the pregnancy. After ICT, the fraction of these cells during weeks 5-6 of pregnancy in woman with miscarriage was higher than in women with pregnancy prolonged to the full-term. Excessive content of activated cytotoxic lymphocytes can be a mechanism underlying impaired maternal immunotolerance to fetal alloantigens, which is a leading factor of early pregnancy loss. The obtained data confirm the involvement of activated Th17 cells and FOXP3<sup>+</sup> Treg cells in the formation of tolerance to paternal antigens of the fetus. Comparison of the decrease in the fraction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>ROR $\gamma$ <sup>+</sup> lymphocytes at the early gestation period (5-6 weeks) and significant upregulation of the IL-17 production by *in vitro* stimulated whole blood cells in women with miscarriage with the same parameters in women with prolonged pregnancy suggested an imbalance between pro-inflammatory Th17 cells and Treg cells. No such imbalance in the content effector T lymphocytes was observed in women with the full-term pregnancy. Taken together, our data indicate an important role of gestational activation of lymphocytes in the formation of maternal immune response to fetal alloantigens necessary for the prolongation of pregnancy.

**Keywords:** immunotolerance, recurrent pregnancy loss, immunocytotherapy, CD69 expression, T lymphocytes, NK cells

УДК 577.15: 541.128

## РОЛЬ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ Arg243 И His239 В ПРОЦЕССЕ УЗНАВАНИЯ ПОВРЕЖДЕННОГО НУКЛЕОТИДА УРАЦИЛ-ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗОЙ ЧЕЛОВЕКА SMUG1\*

© 2020 Д.А. Яковлев<sup>1,2</sup>, И.В. Алексеева<sup>1</sup>, Н.А. Кузнецов<sup>1\*\*</sup>, О.С. Федорова<sup>1\*\*</sup>

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

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

Поступила в редакцию 03.02.2020

После доработки 17.03.2020

Принята к публикации 19.03.2020

Урацил-ДНК-гликозилаза человека SMUG1 удаляет из ДНК остатки урацила и некоторые другие неканонические или поврежденные основания. Несмотря на функциональную важность SMUG1, для нее до сих пор не получены рентгеноструктурные данные. Ранее нами проведено гомологичное моделирование структуры SMUG1 и сделан вывод о роли некоторых аминокислотных остатков в процессе узнавания поврежденных нуклеотидов и их удаления из ДНК. В настоящей работе методом «остановленного потока» в режиме реального времени по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp фермента и 2-аминопурина и флуорофоров, обеспечивающих резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), в ДНК изучена кинетика конформационных переходов в белке и ДНК-субстратах в ходе ферментативного процесса. Установлен кинетический механизм взаимодействия и рассчитаны кинетические параметры образования и распада интермедиатов реакции. Полученные результаты позволили уточнить роль а.о. His239 и Arg243 в процессе узнавания поврежденного нуклеотида и удаления повреждения при катализе урацил-ДНК-гликозилазой человека SMUG1.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** репарация ДНК, урацил-ДНК-гликозилаза человека SMUG1, флуоресценция, конформационная динамика, метод «остановленного потока».

DOI: 10.31857/S0320972520050085

### ВВЕДЕНИЕ

Урацил – одно из наиболее распространенных повреждений ДНК, которое образуется при спонтанном [1–3] или ферментативном [4, 5] дезаминировании цитозина, а также при ошибочном включении остатка уридина во время репликации [6]. Урацил в ДНК человека узнается и удаляется несколькими ДНК-гликозилазами: урацил-ДНК-*N*-гликозилазой (UNG2), тимин-ДНК-гликозилазой (TDG), специфичной к одноцепочечной ДНК монофункциональной

ДНК-гликозилазой (SMUG1) и метил-СрG-связывающим доменом 4 (MBD4) [7, 8]. Несмотря на то, что все урацил-ДНК-гликозилазы катализируют гидролиз *N*-гликозидной связи с урацилом, они обладают индивидуальными отличиями, связанными со способностью ферментов узнавать одноцепочечные ДНК-субстраты, мисматчи T/G [9–13] или некоторые окисленные основания, такие как 5-гидроксиметилурацил, 5-формилурацил и 5-гидроксиурацил, которые являются природными производными 5-метилцитозина и образуются в процессе эпигенетической регуляции [14].

Одной из актуальных проблем в области репарации ДНК остается выяснение механизмов, обеспечивающих высокоточное узнавание поврежденных оснований. В последние годы активно проводили исследования различных ДНК-гликозилаз, направленные на выяснение того, каким образом происходит поиск и узнавание единичных повреждений гетероциклических оснований ДНК среди огромного числа немодифицированных оснований [15]. Анализ литературных данных показывает [16], что раз-

Принятые сокращения: SMUG1 – специфичная к одноцепочечной ДНК монофункциональная ДНК-гликозилаза; AP-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт; F – (2*R*,3*S*)-2-(гидроксиметил)-3-гидрокситетрагидрофуран; aPu – 2-аминопурин, FAM – 6-карбоксифлуоресцеин; BHQ1 – тушитель флуоресценции «black hole quencher»; FRET – резонансный перенос энергии флуоресценции; PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле, WT – диккий тип.

\* Статья на английском языке опубликована в режиме открытого доступа на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 5, 2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

личные ДНК-гликозилазы, имеющие совершенно разную структуру ДНК-связывающего центра, активного центра и аминокислотных остатков, участвующих в специфическом узнавании поврежденного нуклеотида и катализе, тем не менее обладают общими особенностями при взаимодействии с субстратами. Так, большая часть ДНК-гликозилаз, для которых в настоящее время установлена структура, изгибают ДНК и выворачивают поврежденный либо комплементарный к нему нуклеотид из двойной спирали ДНК. При этом, как правило, поврежденный нуклеотид располагается в кармане активного центра фермента, где происходит его окончательная верификация. В образовавшуюся полость в дуплексе ДНК встраиваются некоторые аминокислотные остатки фермента, которые выталкивают поврежденный нуклеотид из спирали ДНК и стабилизируют внеспиральное положение нуклеотида. Далее происходит гидролиз *N*-гликозидной связи между поврежденным гетероциклическим основанием и остатком рибозы и образование апуринового/апириимидинового сайта (AP-сайта).

В настоящее время наиболее обоснованным механизмом узнавания поврежденных нуклеотидов ДНК-гликозилазами на начальных этапах взаимодействия является модель, в соответствии с которой фермент поочередно вставляет

в двойную спираль ДНК между основаниями аминокислотный остаток – сенсор повреждения или «клин» (wedge amino acid) [17]. Эта модель узнавания повреждений была значительно развита в исследованиях с применением одномолекулярных кинетических методов (single-molecule kinetics) [18–21] и предстационарных кинетических методов [22], которые позволили в реальном времени визуализировать движение фермента по молекуле ДНК при поиске поврежденного нуклеотида и изучить динамику конформационных перестроек фермента и ДНК как на начальных, так и на последующих стадиях узнавания повреждения и их каталитического превращения.

В настоящее время структура ДНК-гликозилазы человека SMUG1 неизвестна. Ранее нами с помощью гомологичного моделирования [23] на основе структур с GmeSMUG1 из *Geobacter metallireducens* (Protein Data Bank [PDB] ID 5H98 и 5H9I) [24] и xSMUG1 из *Xenopus laevis* (PDB 1OE4 и 1OE5) [10] получена модель структуры фермента человека в свободном состоянии и в комплексе с ДНК, содержащей уридин (рис. 1). Было показано, что 11 а.о. (239–249) SMUG1 человека формируют интеркалирующую петлю, которая может служить «клином», проникающим в двойную спираль ДНК в области поврежденного нуклеотида [10, 25]. При этом функционально важными а.о. интеркалирующей петли могут являться Arg243, который занимает пространство внутри спирали ДНК, образовавшееся после выворачивания урацила, и His239, способный образовывать контакты и с урацилом, расположенным в активном центре, и с фосфатной группой ДНК. Мутационный анализ показал [23, 25], что His239 необходим для протекания каталитического гидролиза *N*-гликозидной связи.

Кроме того, ранее [26] методом «остановленного потока» с регистрацией изменения интенсивности флуоресценции остатков триптофана, входящих в состав фермента, и 2-аминопурина (аPu) или FRET-пары флуорофор/тушитель (6-карбоксифлуоресцеин (FAM) и тушитель флуоресценции «black hole quencher» (BHQ1)), обеспечивающих резонансный перенос энергии флуоресценции, расположенных в модельных ДНК-субстратах, был предложен кинетический механизм взаимодействия SMUG1 дикого типа (WT) с поврежденной ДНК (схема 1). Показано, что взаимодействие SMUG1 с ДНК включает, как минимум, две стадии (1 и 2) связывания ДНК и узнавания поврежденного нуклеотида, которые приводят к образованию каталитически компетентного комплекса. В этом комплексе происходит необратимая ста-

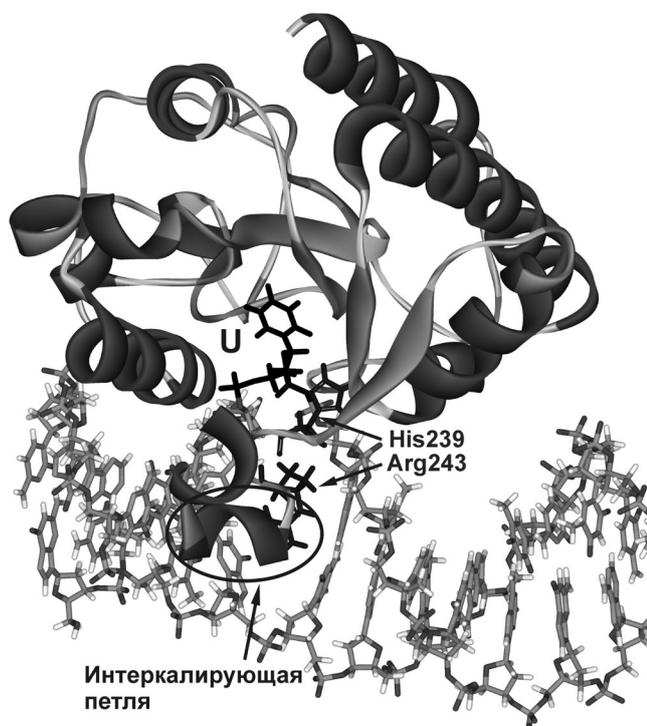
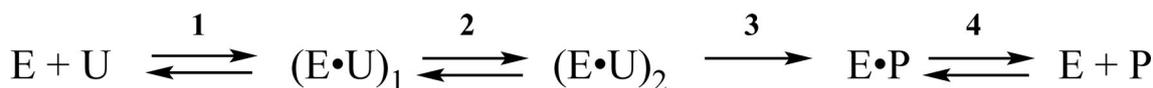


Рис. 1. Модель структуры SMUG1 человека в комплексе с ДНК, содержащей уридин



**Схема 1.** Кинетический механизм, характеризующий стадии взаимодействия SMUG1 WT человека с поврежденной ДНК [26]. E – SMUG1; U – ДНК-субстрат, содержащий уридин; (E · U)<sub>n</sub> – различные фермент-субстратные комплексы, образующиеся в ходе узнавания урацила; E · P – комплекс фермента с продуктом реакции P

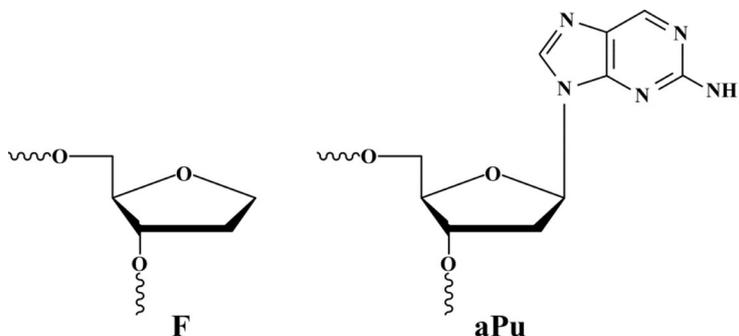
дия (3) каталитического гидролиза N-гликозидной связи с урацилом. Последняя стадия кинетического механизма (4) характеризует равновесный процесс диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции.

Анализ флуоресцентных данных, характеризующих конформационные переходы как молекулы SMUG1, так и ДНК в ходе каталитического цикла свидетельствует о том, что на первой стадии взаимодействия (1) происходит перемещение интеркалирующей петли фермента, которое сопровождается частичным плавлением ДНК-дуплекса вблизи поврежденного нуклеотида. По-видимому, образование контактов на этой стадии взаимодействия также индуцирует частичное выворачивание поврежденного основания из ДНК-дуплекса. Вторая стадия (2) характеризует процесс встраивания аминокислотных остатков, входящих в интеркалирующую петлю фермента. Ранее при исследовании конформационной динамики ДНК-субстрата методом FRET и кинетики накопления продукта

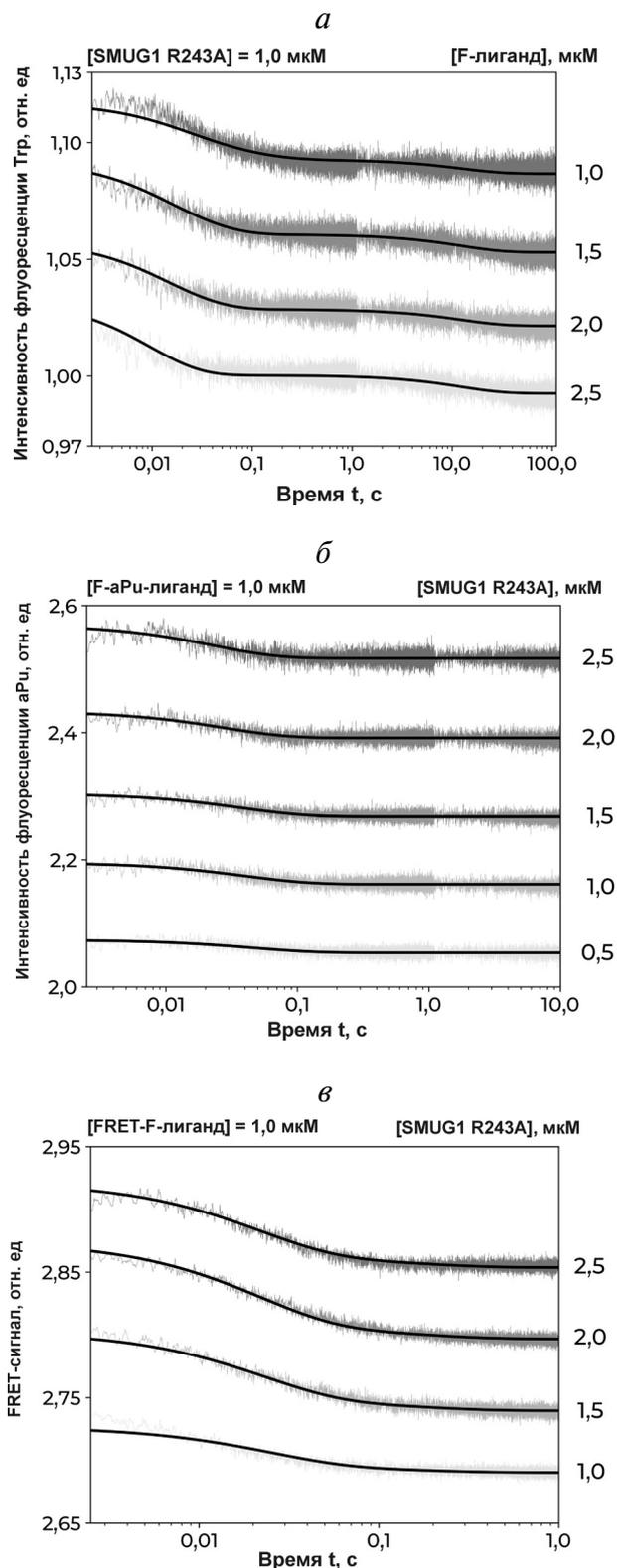
N-гликозилазной реакции методом электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE) нами было показано, что мутантная форма SMUG1, содержащая замену H239A, каталитически неактивна, тогда как мутант R243A полностью сохраняет свою активность [23]. Для уточнения функции остатков Arg243 и His239 в процессе специфического узнавания поврежденного нуклеотида и катализе в настоящем исследовании был проведен комплексный предстационарный кинетический анализ конформационных изменений в мутантных формах SMUG1 (R243A и H239A) и в ДНК-субстрате, а также в продукте его превращения. Для этого проводили регистрацию изменений интенсивности флуоресценции остатков Trp в молекуле фермента и aPu, расположенного с 3'-стороны от апуринового/апиримидинового сайта в ДНК, или FRET-пары, введенной на 3'- и 5'-концы ДНК-дуплекса. Эти данные позволили более детально проследить конформационные переходы белка и ДНК в процессе взаимодействия. Итогом

**Таблица 1.** Последовательности дезоксирибоолигонуклеотидов и структуры модифицированных нуклеотидов F и aPu

Сокращенное название	Последовательность
X-субстрат/лиганд	5'-GCTCA(X)GTACAGAGCTG-3'
X = U/F	3'-CGAGT G CATGTCTCGAC-5'
X-aPu-субстрат/лиганд	5'-GCTCA(X)(aPu)TACAGAGCTG-3'
X = U/F	3'-CGAGT G C ATGTCTCGAC-5'
FRET-X-субстрат/лиганд	5'-FAM-GCTCA(X)GTACAGAGCTG-3'
X = U/F	3'-CGAGT G CATGTCTCGAC-BHQ1-5'



\* F – стабильный аналог AP-сайта, (2R,3S)-2-(гидроксиметил)-3-гидрокситетрагидрофуран; aPu – 2-аминопурин.



**Рис. 2.** Взаимодействие R243A SMUG1 с ДНК-дуплексами, содержащими F-сайт. Изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp белка (а), интенсивности флуоресценции остатков aPu, расположенных с 3'-стороны от F-сайта (б) и FRET-сигнала (в). Концентрации фермента и ДНК указаны на рисунке

представленной работы является уточнение роли функционально значимых остатков His239 и Arg243 в процессе узнавания поврежденного основания и его удаления при катализе ДНК-гликозилазой человека SMUG1.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы реактивы: акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, ДТТ, мочевины, ЭДТА, ацетонитрил, глицерин, Tris-(гидрокси-метил)-аминометан («Sigma-Aldrich», США).

**ДНК-субстраты.** Субстраты и лиганды фермента представляли собой 17-ти звенные дуплексы, состоящие из дезоксирибоолигонуклеотидов, представленных в табл. 1. Олигонуклеотиды очищали с помощью ВЭЖХ на ионно-обменной колонке PRP-X500 (3,9 × 300 мм; размер частиц 12–30 мкм; «Hamilton Company», США) и последующей обращено-фазовой хроматографии (Nucleoprep 100–20 C<sub>18</sub> 10 × 250 мм, «Macherey-Nagel», Германия). Гомогенность препаратов проверяли методом электрофореза в 20%-ном (w/v) PAGE в денатурирующих условиях.

**Фермент SMUG1.** Мутантные формы фермента SMUG1, содержащие замену R243A или H239A, были выделены из клеток *Escherichia coli* штамма Rosetta 2, трансформированных плазмидой pET28с, несущей ген урацил-ДНК-гликозилазы человека, как описано ранее [23, 26]. Все эксперименты по исследованию ферментативной реакции проводили в буферном растворе: 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 50 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 7% (v/v) глицерин при 25 °С.

**Изучение кинетики процесса методом «остановленного потока».** Флуоресцентные кинетические кривые были получены на спектромет-

**Таблица 2.** Константы скорости и равновесия, соответствующие Схеме 2, описывающей взаимодействие SMUG1 R243A с ДНК, содержащей F-сайт

Константа	Флуорофор		
	Trp	aPu	FRET
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\cdot\text{c}^{-1}$	$35 \pm 8$	$14 \pm 4$	$6 \pm 2$
$k_{-1}, \text{c}^{-1}$	$0,5 \pm 0,3$	$5,4 \pm 1,0$	$30 \pm 7$
$k_2, \text{c}^{-1}$	$(1,1 \pm 0,8) \times 10^{-2}$	–	$0,4 \pm 0,1$
$k_{-2}, \text{c}^{-1}$	$(7 \pm 2) \times 10^{-2}$	–	$6 \pm 2$

\* Различия статистически достоверны при  $p < 0,05$ .



**Схема 2.** Кинетический механизм, характеризующий образование комплекса SMUG1 R243A с продуктом реакции F, зарегистрированный по изменению интенсивности флуоресценции Trp и FRET-сигнала

ре остановленной струи SX.20 («Applied Photophysics», Великобритания), как описано ранее [27–30]. Белок SMUG1 содержит 4 остатка Trp и 4 остатка Tyr. Возбуждение флуоресценции SMUG1 проводили при 290 нм, регистрацию флуоресценции – при длинах волн  $> 320$  нм, фильтр WG-320 («Schott», Германия). В этих условиях основной вклад в флуоресценцию белка обеспечивается остатками Trp (>90%). При использовании субстратов, содержащих остатки aPu, возбуждение флуоресценции проводили при длине волны 310 нм, а регистрацию – при длинах волн  $> 370$  нм, фильтр LG-370 («Cognition», США). Для анализа эффективности флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) пары FAM/BHQ1 флуоресценцию красителя FAM возбуждали светом с длиной волны 494 нм. Регистрация флуоресценции красителя FAM проводилась при длинах волн  $> 515$  нм с использованием светофильтра OG-515 («Schott», Германия). Мертвое время прибора составляло 1,0 мс. Каждую кинетическую кривую строили, как минимум, по результатам трех независимых измерений.

**Анализ кинетических данных.** Для определения минимальной кинетической схемы, описывающей взаимодействие фермента с субстратами, и расчета констант скорости конформационных переходов в ходе всех элементарных стадий данной схемы получали набор кинетических кривых для разных концентраций фермента или субстрата. Количественную обработку результатов экспериментов проводили с помощью программы DynaFit («BioKin», США) [31] путем оптимизации значений параметров, входящих в кинетические схемы, как описано ранее [32–34].

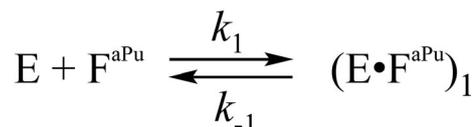
## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Взаимодействие SMUG1 R243A со стабильным аналогом продукта N-гликозилазной реакции.** Для изучения конформационных изменений SMUG1 R243A в процессе взаимодействия с продуктом гидролиза N-гликозидной связи был использован модельный ДНК-дуплекс, содержащий тетрагидрофурановый аналог AP-сайта (F-лиганд, табл. 1). Взаимодействие фермента с

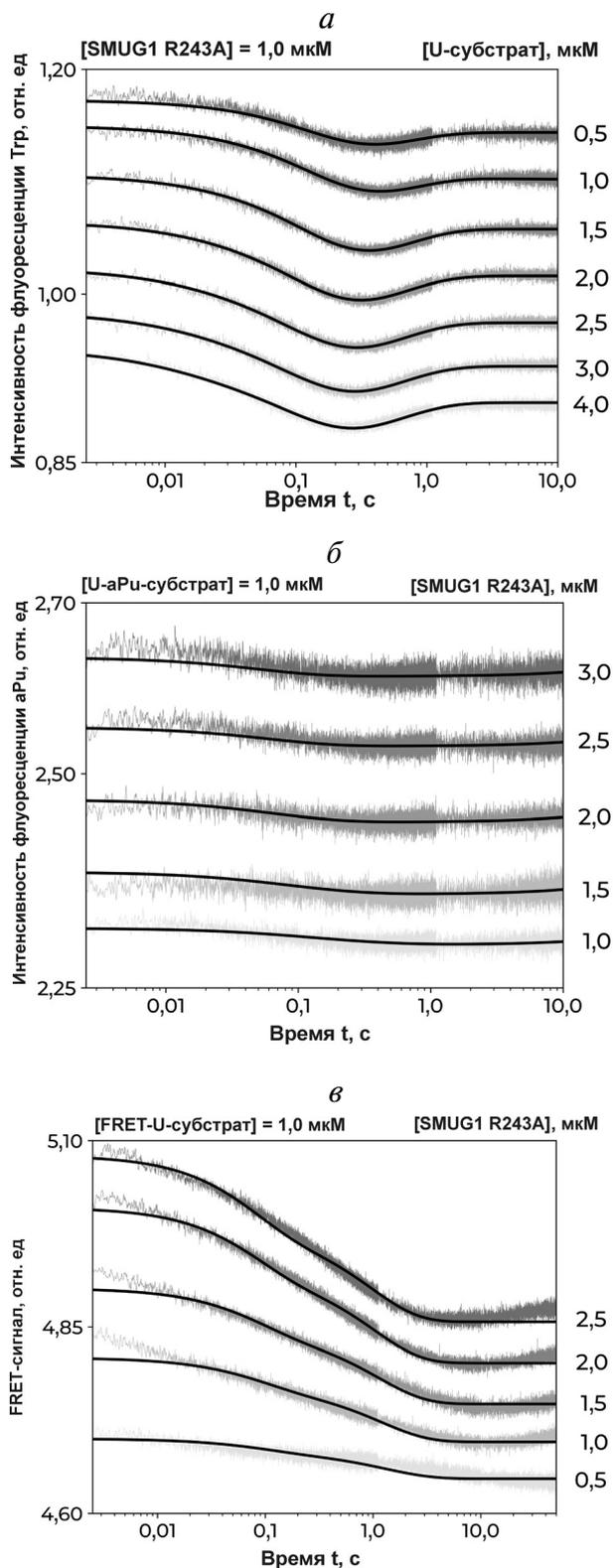
аналогом продукта приводит к двухфазному уменьшению интенсивности флуоресценции остатков Trp в течение времени  $t \leq 100$  с (рис. 2, а). Падение сигнала на начальном участке кинетических кривых, в течение 30–50 мс, по-видимому, соответствует образованию первичных неспецифических контактов с ДНК. Затем происходит небольшое снижение интенсивности флуоресценции во временном интервале  $t \leq 10$  с. Конформационные изменения фермента при взаимодействии SMUG1 R243A с F-лигандом были описаны с помощью кинетической схемы 2, содержащей две обратимые стадии. Полученные константы скорости приведены в табл. 2.

Природа процессов, происходящих на этих стадиях взаимодействия, была выяснена с помощью анализа изменений флуоресценции остатка aPu, расположенного с 3'-стороны от F-сайта (F-aPu-лиганд, табл. 1). Этот флуорофор чувствителен к изменениям диэлектрической проницаемости среды, и интенсивность его флуоресценции уменьшается при формировании гидрофобного микроокружения [35]. Смешивание фермента с F-aPu-лигандом также вызывает падение интенсивности флуоресценции остатка aPu на временах  $< 200$  мс (рис. 2, б), что свидетельствует об образовании вокруг aPu гидрофобного окружения, например, за счет взаимодействия ДНК с а.о. интеркалирующей петли. Полученные кинетические кривые описывали схемой 3, константы скорости приведены в табл. 2.

При этом кинетические кривые, полученные при регистрации сигнала FRET в процессе взаимодействия SMUG1 R243A с FRET-F-лигандом, характеризуются уменьшением сигнала в начальной области до  $t \approx 100$ –200 мс (рис. 2, в). Падение сигнала FRET свидетельствует об



**Схема 3.** Кинетический механизм, описывающий образование комплекса SMUG1 R243A с продуктом N-гликозилазной реакции, зарегистрированный по изменению интенсивности флуоресценции aPu



**Рис. 3.** Взаимодействие R243A SMUG1 с ДНК-дуплексами, содержащими уридин. Изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp белка (а), интенсивности флуоресценции остатков aPu, расположенных с 3'-стороны от уридина (б) и FRET-сигнала (в). Концентрации фермента и ДНК указаны на рисунке

уменьшении расстояния между флуорофорами, которое может происходить при изгибании молекулы ДНК при связывании с ферментом. Анализ кинетических кривых показал, что этот процесс можно описать двухстадийным равновесным механизмом (схема 2), константы скорости приведены в табл. 2.

Таким образом, процесс взаимодействия SMUG1 R243A с аналогом продукта реакции F включает как минимум две обратимые стадии. Анализ формы кинетических кривых (рис. 2) и значений констант скорости (табл. 2) показывает, что образование первичного комплекса сопровождается конформационными изменениями фермента (стадия 1, Trp,  $t \leq 30\text{--}50$  мс), затем происходит изменение микроокружения в области остатка aPu (стадия 1, aPu,  $t < 100$  мс). Такое последовательное изменение конформации фермента и ДНК субстрата свидетельствует о том, что этот процесс, вероятнее всего, связан с перемещением интеркалирующей петли и ее взаимодействием с ДНК-дуплексом в области поврежденного нуклеотида и, возможно, сопровождается выворачиванием F-сайта в активный центр фермента. Образование контактов между ДНК-связывающим центром и ДНК-дуплексом также индуцирует изгибание молекулы субстрата на временах  $t < 100\text{--}200$  мс (стадия 1, FRET). Последующие более медленные процессы (стадия 2, FRET и Trp), зарегистрированные по изменению интенсивности флуоресценции Trp и FRET-сигнала, по-видимому, свидетельствует о дополнительных перестройках конформации фермента и аналога продукта, содержащего остаток F.

Из полученных значений следует, что каждый из флуорофоров регистрирует разные этапы конформационных перестроек, протекающих во взаимодействующих молекулах. Наиболее медленной стадией является стадия 2, наблюдаемая по флуоресценции Trp, которая, скорее всего, относится к адаптации структуры hSMUG1 к структуре F-содержащего ДНК-лиганда, моделирующего продукт N-гликозилазной реакции.

**Взаимодействие SMUG1 R243A с ДНК, содержащей уридин.** Полный ферментативный цикл был изучен с использованием модельных ДНК-субстратов, содержащих уридин (табл. 1). В ходе ферментативной реакции происходит связывание фермента с субстратом, формирование каталитически компетентного комплекса, гидролиз N-гликозидной связи и диссоциация фермента с продуктом.

Кинетические кривые, характеризующие изменение интенсивности флуоресценции Trp (рис. 3, а), содержат фазу падения интенсивности флуоресценции при  $t \approx 0,3$  с и фазу роста с

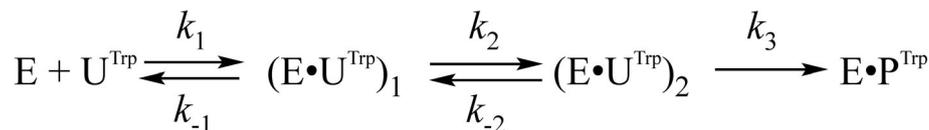


Схема 4. Кинетический механизм, характеризующий взаимодействие SMUG1 R243A с U-субстратом

выходом на плато к  $t \approx 5$  с. Сравнение этих кинетических кривых с кривыми, полученными для процесса связывания с продуктом (рис. 2, а), показывает, что начальный участок при образовании каталитического комплекса с U-субстратом имеет похожие изменения в интенсивности флуоресценции Trp. Поэтому фазу роста интенсивности флуоресценции Trp на временах  $\sim(0,5-10)$  с, отсутствующую в случае F-лиганда, можно отнести к процессу гидролиза N-гликозидной связи и диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции. Ранее для фермента SMUG1 WT было показано [26], что диссоциация комплекса фермент–продукт является скоростью-лимитирующей стадией ферментативного процесса. Поэтому в наблюдаемом временном диапазоне (0,5–10 с) скорее всего не происходит процесс диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции. Действительно, анализ кинетических кривых показал, что они описываются кинетической схемой 4, включающей две обратимые стадии связывания, за которыми следует необратимая каталитическая стадия, приводящая к образованию комплекса фермента с продуктом (табл. 3).

Кинетика конформационных изменений в ДНК, полученная при регистрации интенсивности флуоресценции aPu в U-aPu-субстрате (рис. 3, б), на начальном участке до 100 мс аналогична кинетике взаимодействия SMUG1 с аналогом продукта (рис 2, б). Такая согласованность конформационных изменений свидетельствует о том, что процесс гидролиза N-гликозидной связи не требует серьезного изменения геометрии субстрата. При этом в случае U-aPu-субстрата происходит незначительное увеличение интенсивности флуоресценции на более поздних временах  $\leq 10$  с, которое может характеризовать медленный процесс диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции. Полученные кинетические кривые описывали схемой 5, что позволило оценить значение константы скорости распада комплекса фермента с продуктом реакции  $k_{\text{off}}$  (табл. 3).

При регистрации FRET-сигнала в процессе взаимодействия SMUG1 R243A с FRET-U-субстратом (рис. 3, в) были получены кинетические кривые, содержащие снижение флуоресценции FAM на временах  $>10$  с. При этом падение сигнала FRET можно разделить на две фа-

Таблица 3. Константы скорости и равновесия, соответствующие взаимодействию SMUG1 R243A с ДНК, содержащей уридин

Константа	SMUG1 R243A			SMUG1 WT*		
	Trp	aPu	FRET	Trp	aPu	FRET
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$	22 ± 5	8 ± 3	1,2 ± 0,2	115 ± 20	130 ± 60	140 ± 20
$k_{-1}, \text{c}^{-1}$	2,2 ± 0,6	0,19 ± 0,07	8 ± 1	760 ± 90	240 ± 30	410 ± 20
$K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	10	41,6	0,16	0,15	0,54	0,34
$k_2, \text{c}^{-1}$	9 ± 3	–	1,7 ± 0,3	30 ± 8	15 ± 8	3,6 ± 0,8
$k_{-2}, \text{c}^{-1}$	0,8 ± 0,1	–	0,64 ± 0,06	11,5 ± 0,8	25 ± 6	9,7 ± 0,2
$K_2$	11,1	–	2,66	2,6	0,6	0,37
$k_3, \text{c}^{-1}$	2,0 ± 0,3	–	–	1,7 ± 0,2	–	0,6 ± 0,1
$k_{-3}, \text{c}^{-1}$	–	–	–	–	–	0,11 ± 0,02
$K_3$	–	–	–	–	–	5,4
$k_{\text{off}}, \text{c}^{-1}$	–	$(8 \pm 3) \times 10^{-3}$	–	–	–	–
$K_1 \times K_2 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	111	–	0,43	0,39	0,32	–
$K_1 \times K_2 \times K_3 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	–	–	–	–	–	0,68

\* Данные из работы Kuznetsova et al. [26].

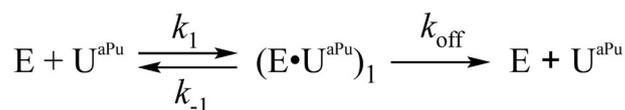


Схема 5. Кинетический механизм, характеризующий взаимодействие SMUG1 R243A с U-aPu-субстратом

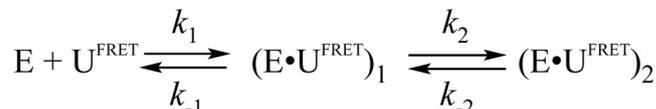


Схема 6. Кинетический механизм, характеризующий взаимодействие SMUG1 R243A с FRET-U-субстратом

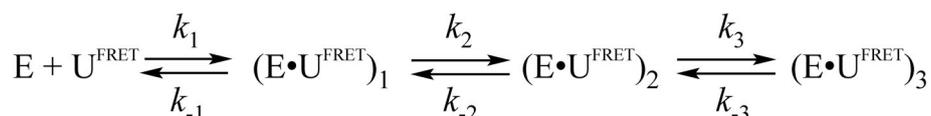


Схема 7. Кинетический механизм, характеризующий взаимодействие SMUG1 H239A с FRET-U-субстратом

зы: быстрое снижение до  $t \approx 100$  мс, как и в случае FRET-F-лиганда, и последующую медленную фазу до  $t \approx 3$  с. Можно предположить, что кривые FRET не отражают каталитический процесс, так как кривые изменения интенсивности флуоресценции aPu показывают, что гидролиз *N*-гликозидной связи не требует дополнительных конформационных изменений ДНК. Полученные кинетические кривые описывали схемой 6, содержащей две равновесные стадии связывания ДНК (табл. 3).

Следует отметить, что начальные участки кинетических кривых схожи в случае F-лигандов и U-субстратов независимо от использованного флуорофора (рис. 2 и 3). Этот факт указывает на то, что процесс образования фермент-

субстратного комплекса включает идентичные стадии и не зависит от природы поврежденного нуклеотида.

**Взаимодействие SMUG1 H239A с ДНК, содержащей уридин.** Как было показано ранее [23], активность мутантной формы SMUG1 H239A по отношению к U-содержащей ДНК значительно ниже, чем активность фермента дикого типа или мутантной формы R243A. Тем не менее процесс образования фермент-субстратного комплекса был зарегистрирован по изменению сигнала FRET в ходе взаимодействия SMUG1 H239A с FRET-U-субстратом в течение 100 с (рис. 4). Поскольку анализ активности методом электрофореза в PAGE свидетельствует о накоплении лишь незначительного количества продукта за

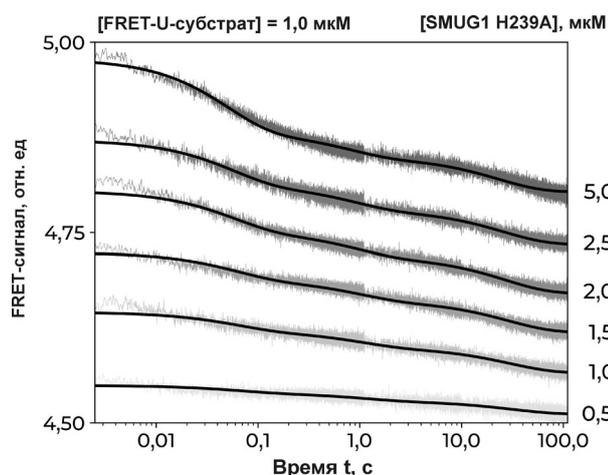


Рис. 4. Взаимодействие SMUG1 H239A с FRET-U-субстратом. Концентрации фермента и ДНК указаны на рисунке

Таблица 4. Константы скорости и равновесия, соответствующие взаимодействию SMUG1 H239A с ДНК, содержащей уридин

Константа	FRET
$k_1 \times 10^{-6}, M^{-1} \cdot c^{-1}$	$1,2 \pm 0,5$
$k_{-1}, c^{-1}$	$12 \pm 5$
$K_1 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,1
$k_2, c^{-1}$	$2 \pm 1$
$k_{-2}, c^{-1}$	$0,8 \pm 0,7$
$K_2$	2,5
$k_3, c^{-1}$	$0,04 \pm 0,01$
$k_{-3}, c^{-1}$	$0,023 \pm 0,007$
$K_3$	1,74
$K_1 \times K_2 \times K_3 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,43

этот период, то можно сделать вывод о том, что процессы, наблюдаемые методом «остановленного потока», соответствуют связыванию ДНК. Как видно из рис. 4, кинетические кривые характеризуются трехфазным уменьшением FRET-сигнала, которое было описано схемой 7, содержащей три обратимые стадии (табл. 4).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из анализа модельных структур фермента SMUG1 WT и его комплекса с ДНК [23, 26] следует, что аминокислотные остатки His239 и Arg243 должны изменять свои конформации для встраивания в ДНК и образования контактов с вывернутым поврежденным основанием (рис. 1). Однако при этом мутация H239A не должна приводить к значительным нарушениям сети контактов белок-ДНК, как и замена R243A, несмотря на потерю возможности образования нескольких водородных связей с ДНК. При этом мутантная форма SMUG1 R243A сохраняла каталитическую активность, а мутант H239A почти полностью терял активность [23].

В настоящей работе функции аминокислотных остатков His239 и Arg243 были проанализированы путем регистрации конформационных изменений в ферменте и модельных ДНК-субстратов в процессе их взаимодействия. Для выявления конформационных изменений SMUG1 R243A и H239A во время связывания ДНК использовали модельные ДНК-дуплексы, содержащие уридин или F-сайт.

В случае SMUG1 R243A взаимодействие каталитически активной формы фермента с ДНК-субстратом, содержащим уридин, или с ДНК-

продуктом, содержащим F-сайт, было зарегистрировано по изменению интенсивности флуоресценции Trp белка, остатка 2-аминопурина или FRET-пары FAM/BHQ1 (рис. 2 и 3). В то же время сравнительный анализ конформационной динамики мутантной формы SMUG1 H239A с пониженной каталитической активностью показал, что во время взаимодействия с ДНК-продуктом не происходит изменения какого-либо флуоресцентного сигнала (Trp, aPu или FRET). При этом образование фермент-субстратного комплекса с ДНК, содержащей уридин, удалось зарегистрировать только при детектировании сигнала FRET (рис. 4).

В совокупности, экспериментальные данные, характеризующие конформационные переходы мутантных форм SMUG1 R243A, H239A и ДНК в ходе каталитического цикла, и данные, полученные для фермента дикого типа [26], позволили предложить схему поэтапного изменения конформаций белка и ДНК в ходе специфического связывания ДНК и катализа (табл. 5). Общий кинетический механизм включает две обратимые стадии, характеризующие образование каталитически-компетентного комплекса, которые были зарегистрированы с использованием всех трех типов флуорофоров, что свидетельствует о взаимных конформационных изменениях как в ферменте, так и в ДНК-субстрате. При этом первичное связывание, по-видимому, включает перемещение интеркалирующей петли фермента, локальное плавление ДНК вблизи поврежденного нуклеотида и выворачивание повреждения из ДНК-дуплекса. Кроме того, движение интеркалирующей петли, вероятно, связано с встраиванием в ДНК-дуплекс аминокислотного остатка — «сensors

**Таблица 5.** Общий механизм ферментативного процесса, катализируемого SMUG1, сформулированный на основании данных, полученных в настоящей работе путем регистрации флуоресценции Trp, aPu и FRET, а также с помощью метода PAGE в работе Kuznetsova et al. [26]

Тип регистрации	Стадии взаимодействия SMUG1 WT с поврежденной ДНК (схема 1)			
	стадия 1	стадия 2	стадия 3	стадия 4
Trp	конформационные изменения в области интеркалирующей петли	заполнение полости аминокислотными остатками	каталитическая реакция	нд*
aPu	локальное плавление дуплекса и выворачивание уридина	заполнение полости аминокислотными остатками	нд	нд
FRET	образование первичного комплекса	изгибание ДНК	нд	перестройка комплекса
PAGE	нд	нд	каталитическая реакция	диссоциация комплекса фермент-продукт

\* нд — Стадия в кинетической схеме не может быть зарегистрирована с помощью данного типа регистрации.

повреждения», который отвечает за начальные стадии узнавания поврежденного нуклеотида. Этим остатком, по-видимому, является Arg243, что не противоречит выводам, сделанным в работе Iakovlev et al. [23]. На второй стадии формируется каталитически активный комплекс, в котором а.о. интеркалирующей петли полостью встраиваются в ДНК и образуют все возможные контакты с вывернутым нуклеотидом, включая контакты His239 с фосфатными группами. Каталитическая реакция протекает на третьей стадии взаимодействия. Ранее было показано, что для фермента дикого типа скорость-лимитирующей стадией ферментативного процесса выступает диссоциация комплекса фермента с продуктом [26]. Так как замена R243A уменьшает количество водородных связей с ДНК, то это дестабилизирует как фермент-субстратный комплекс, так и комплекс фермента с продуктом реакции, за счет чего увеличивается скорость оборота фермента. Сравнение значений констант скорости отдельных стадий, полученных ранее [26] по флуоресценции Trp в случае SMUG1 WT с данными для мутанта R243A (табл. 3) показывает, что их каталитическая активность примерно одинакова:  $k_3 = 1,7 \text{ с}^{-1}$  и  $2,0 \text{ с}^{-1}$  для WT и R243A соответственно. Однако скорости 1-й и 2-й стадий, ха-

рактеризующих связывание и узнавание субстрата, в случае SMUG1 WT существенно больше, чем в случае мутантной формы R243A. Аналогичный вывод можно сделать и по данным, полученным для флуоресцентных меток aPu и FRET, как в случае мутанта R243A, так и H239A. При этом сродство фермента к ДНК-субстрату не меняется. Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что а.о. Arg243 принимает участие в узнавании поврежденного нуклеотида, но не важен для протекания каталитической стадии, тогда как His239 необходим как для узнавания поврежденного нуклеотида, так и для катализа.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 16-14-10038) и частичной поддержке бюджетного финансирования для обеспечения регламентных работ на использованном оборудовании № АААА-А17-117020210022-4.

**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

- Lari, S.-U., Chen, C.-Y., Vertéssy, B. G., Morré, J., and Bennett, S. E. (2006) Quantitative determination of uracil residues in *Escherichia coli* DNA: contribution of ung, dug, and dut genes to uracil avoidance, *DNA Repair (Amst)*, **5**, 1407-1420.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature*, **362**, 709-715.
- Lewis, C. A., Crayle, J., Zhou, S., Swanstrom, R., Wolfenden, R., and Wolfenden, R. (2016) Cytosine deamination and the precipitous decline of spontaneous mutation during Earth's history, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 8194-8199.
- Jaszczur, M., Bertram, J. G., Pham, P., Scharff, M. D., and Goodman, M. F. (2013) AID and APOBEC3G haphazard deamination and mutational diversity, *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, 3089-108.
- Rebhandl, S., Hümer, M., Greil, R., and Geisberger, R. (2015) AID/APOBEC deaminases and cancer, *Oncoscience*, **2**, 320.
- Ladner, R. D. (2001) The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2**, 361-370.
- Jacobs, A. L., and Schar, P. (2012) DNA glycosylases: in DNA repair and beyond, *Chromosoma*, **121**, 1-20.
- Visnes, T., Doseth, B., Pettersen, H. S., Hagen, L., Sousa, M. M., Akbari, M., Otterlei, M., Kavli, B., Slupphaug, G., and Krokan, H. E. (2009) Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **364**, 563-568.
- Kavli, B., Sundheim, O., Akbari, M., Otterlei, M., Nilsen, H., Skorpen, F., Aas, P. A., Hagen, L., Krokan, H. E., and Slupphaug, G. (2002) hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U : A matches, U : G mismatches, and U in single-stranded DNA, with hSMUG1 as a broad specificity backup, *J. Biol. Chem.*, **277**, 39926-39936.
- Wibley, J. E. A., Waters, T. R., Haushalter, K., Verdine, G. L., and Pearl, L. H. (2003) Structure and specificity of the vertebrate anti-mutator uracil-DNA glycosylase SMUG1, *Mol. Cell*, **11**, 1647-1659.
- Hashimoto, H., Hong, S., Bhagwat, A. S., Zhang, X., and Cheng, X. (2012) Excision of 5-hydroxymethyluracil and 5-carboxylcytosine by the thymine DNA glycosylase domain: its structural basis and implications for active DNA demethylation, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 10203-10214.
- Hashimoto, H., Zhang, X., and Cheng, X. (2012) Excision of thymine and 5-hydroxymethyluracil by the MBD4 DNA glycosylase domain: structural basis and implications for active DNA demethylation, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 8276-8284.
- Sjolund, A. B., Senejani, A. G., and Sweasy, J. B. (2013) MBD4 and TDG: multifaceted DNA glycosylases with ever expanding biological roles, *Mutat. Res.*, **743-744**, 12-25.
- Ito, S., and Kuraoka, I. (2015) Epigenetic modifications in DNA could mimic oxidative DNA damage: a double-edged sword, *DNA Repair (Amst)*, **32**, 52-57.
- Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2020) Kinetic milestones of damage recognition by DNA glycosylases of the Helix-hairpin-Helix structural superfamily, *Adv. Exp. Biol. Med.*, (in press).
- Brooks, S. C., Adhikary, S., Rubinson, E. H., and Eichman, B. F. (2013) Recent advances in the structural mechanisms of DNA glycosylases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**, 247-271.
- Dunn, A. R., Kad, N. M., Nelson, S. R., Warshaw, D. M., and Wallace, S. S. (2011) Single Qdot-labeled glycosylase

- molecules use a wedge amino acid to probe for lesions while scanning along DNA, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7487-7498.
18. Lee, A. J., Warshaw, D. M., and Wallace, S. S. (2014) Insights into the glycosylase search for damage from single-molecule fluorescence microscopy, *DNA Repair*, **20**, 23-31.
  19. Nelson, S. R., Dunn, A. R., Kathe, S. D., Warshaw, D. M., and Wallace, S. S. (2014) Two glycosylase families diffusively scan DNA using a wedge residue to probe for and identify oxidatively damaged bases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **111**, E2091-E2099.
  20. Lee, A. J., and Wallace, S. S. (2016) Visualizing the search for radiation-damaged DNA bases in real time, *Radiat. Phys. Chem. Oxf. Engl.* **128**, 126-133.
  21. Lee, A. J., and Wallace, S. S. (2017) Hide and seek: how do DNA glycosylases locate oxidatively damaged DNA bases amidst a sea of undamaged bases? *Free Radic. Biol. Med.*, **107**, 170-178.
  22. Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2016) Thermodynamic analysis of fast stages of specific lesion recognition by DNA repair enzymes, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1136-1152.
  23. Iakovlev, D. A., Alekseeva, I. V., Vorobjev, Y. N., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2019) The role of active-site residues Phe98, His239, and Arg243 in DNA binding and in the catalysis of human uracil-DNA glycosylase SMUG1, *Molecules*, **24**, doi: 10.3390/molecules24173133.
  24. Zhang, Z., Shen, J., Yang, Y., Li, J., Cao, W., and Xie, W. (2016) Structural basis of substrate specificity in geobacter metallireducens SMUG1, *ACS Chem. Biol.*, **11**, 1729-1736.
  25. Matsubara, M., Tanaka, T., Terato, H., Ohmae, E., Izumi, S., Katayanagi, K., and Ide, H. (2004) Mutational analysis of the damage-recognition and catalytic mechanism of human SMUG1 DNA glycosylase, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5291-5302.
  26. Kuznetsova, A. A., Iakovlev, D. A., Misovets, I. V., Ishchenko, A. A., Saparbaev, M. K., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2017) Pre-steady-state kinetic analysis of damage recognition by human single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase SMUG1, *Mol. Biosyst.*, **13**, 2638-2649.
  27. Kuznetsov, N. A., Faleev, N. G., Kuznetsova, A. A., Morozova, E. A., Revtovich, S. V., Anufrieva, N. V., Nikulin, A. D. D., Fedorova, O. S., and Demidkina, T. V. (2015) Pre-steady-state kinetic and structural analysis of interaction of methionine gamma-lyase from *Citrobacter freundii* with inhibitors, *J. Biol. Chem.*, **290**, 671-681.
  28. Kladova, O. A., Krasnoperov, L. N., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2018) Kinetics and thermodynamics of DNA processing by wild type DNA-glycosylase endo III and its catalytically inactive mutant forms, *Genes (Basel)*, **9**, doi: 10.3390/genes9040190.
  29. Kladova, O. A., Kuznetsova, A. A., Fedorova, O. S., and Kuznetsov, N. A. (2017) Mutational and kinetic analysis of lesion recognition by *Escherichia coli* endonuclease VIII, *Genes (Basel)*, **8**, 1-13.
  30. Yakovlev, D. A., Kuznetsova, A. A., Fedorova, O. S., and Kuznetsov, N. A. (2017) Search for modified DNA sites with the human methyl-CpG-binding enzyme MBD4, *Acta Naturae*, **9**, 88-98.
  31. Kuzmic, P. (1996) Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase, *Anal. Biochem.*, **237**, 260-273.
  32. Alekseeva, I. V., Davletgildeeva, A. T., Arkova, O. V., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2019) The impact of single-nucleotide polymorphisms of human apurinic/apyrimidinic endonuclease I on specific DNA binding and catalysis, *Biochimie*, **163**, 73-83.
  33. Kladova, O. A., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2019) Thermodynamic parameters of endonuclease VIII interactions with damaged DNA, *Acta Naturae*, **11**, 29-37.
  34. Miroshnikova, A. D., Kuznetsova, A. A., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2016) Thermodynamics of damaged DNA binding and catalysis by human AP endonuclease 1, *Acta Naturae*, **8**, 103-110.
  35. Rachofsky, E. L., Osman, R., and Ross, J. B. A. (2001) Probing structure and dynamics of DNA with 2-aminopurine: effects of local environment on fluorescence, *Biochemistry*, **40**, 946-956.

## THE ROLE OF AMINO ACID RESIDUES Arg243 AND His239 IN THE PROCESS OF DAMAGE RECOGNITION BY HUMAN URACIL-DNA-GLYCOSYLASE SMUG1\*

D. A. Iakovlev<sup>1,2</sup>, I. V. Alekseeva<sup>1</sup>, N. A. Kuznetsov<sup>1\*\*</sup> and O. S. Fedorova<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine (ICBFM), Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru; fedorova@niboch.nsc.ru

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Department of Natural Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia

Received February 3, 2020

Revised March 17, 2020

Accepted March 19, 2020

Human uracil-DNA glycosylase SMUG1 removes uracil residues and some other noncanonical or damaged bases from DNA. Despite the functional importance of this enzyme, its X-ray structure is still unavailable. Previously, we performed homology modeling of human SMUG1 structure and suggested the roles of some amino acid residues in the recognition of damaged nucleotides and their removal from DNA. In this study, we investigated the kinetics of conformational transitions in the protein and in various DNA substrates during enzymatic catalysis using the stopped-flow method based on changes in the fluorescence intensity of enzyme's tryptophan residues and 2-aminopurine in DNA or fluorescence resonance energy transfer (FRET) between fluorophores in DNA. The kinetic mechanism of interactions between reaction intermediates was identified, and kinetic parameters of the intermediate formation and dissociation were calculated. The obtained data help in elucidating the functions of His239 and Arg243 residues in the recognition and removal of damaged nucleotides by SMUG1.

**Keywords:** DNA repair, human uracil-DNA glycosylase SMUG1, fluorescence, conformational dynamics, stopped-flow kinetics

УДК 577

## СУПЕРПРОДУКЦИЯ $\alpha$ -СИНУКЛЕИНА В КЛЕТКАХ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ПРИВОДИТ К НАКОПЛЕНИЮ ТИОФЛАВИН S-ПОЗИТИВНЫХ АГРЕГАТОВ И УМЕНЬШЕНИЮ ИНТЕНСИВНОСТИ ГЛИКОЛИЗА

© 2020 А.К. Мельникова<sup>1\*</sup>, Д.В. Поздышев<sup>2</sup>, К.В. Баринава<sup>2</sup>,  
С.С. Кудрявцева<sup>1</sup>, В.И. Муронец<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия; электронная почта: alksmelnikova@gmail.com

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.02.2020

После доработки 13.03.2020

Принята к публикации 25.03.2020

Важной особенностью синуклеинопатий, в том числе болезни Паркинсона, является ухудшение энергетического метаболизма пораженных клеток. Целью данной работы было изучение взаимосвязи накопления различных форм  $\alpha$ -синуклеина с интенсивностью гликолиза. Нами были получены стабильные клеточные линии нейробластомы SH-SY5Y, продуцирующие  $\alpha$ -синуклеин дикого типа и мутантный белок A53T, присутствующий у больных с наследственными формами болезни Паркинсона. Было показано, что суперпродукция двух типов  $\alpha$ -синуклеина приводит к накоплению тιοфлавинов S-позитивных агрегатов. При этом количество агрегатов существенно выше при суперпродукции мутантной формы  $\alpha$ -синуклеина A53T по сравнению с белком дикого типа. Изменения энергетического обмена, проявляющиеся в уменьшении накопления лактата и потреблении глюкозы, были обнаружены при суперпродукции двух форм  $\alpha$ -синуклеина в стабильных клеточных линиях. Кроме того, снижение интенсивности гликолиза коррелировало со снижением активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД). Проведенные с выделенными белками эксперименты показали, что инактивация гликолитического фермента ГАФД происходит после его связывания с мономерными и олигомерными формами  $\alpha$ -синуклеина. Таким образом, было показано, что одной из причин ухудшения энергетического обмена при синуклеинопатиях может быть уменьшение активности ГАФД, индуцированное ее взаимодействием с  $\alpha$ -синуклеином.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:**  $\alpha$ -синуклеин, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гликолиз, болезнь Паркинсона.

DOI: 10.31857/S0320972520050097

### ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона — это нейродегенеративное заболевание, характеризующееся образованием в нервных клетках белковых агрегатов, телец Леви, преимущественно состоящих из белка  $\alpha$ -синуклеина, а также изменениями энергетического метаболизма. В то время как многое известно об ухудшении энергетического обмена в митохондриях и сопутствующем окислительном стрессе [1, 2], исследований на тему вовле-

чения метаболизма глюкозы в нейродегенеративные нарушения совсем немного. С одной стороны, повышенный уровень лактата был зафиксирован в мозговых тканях у больных с болезнью Паркинсона *in vivo* с помощью магнитной резонансной спектроскопии [3], а продолжительные инкубации с лактатом приводили к олигомеризации  $\alpha$ -синуклеина в клеточной модели [4]. С другой стороны, было обнаружено, что индуцированные паракватом — веществом, вызывающим спорадические формы болезни Паркинсона — изменения метаболизма включают снижение продукции лактата и накопление глицеральдегид-3-фосфата (Г-3-Ф), являющегося субстратом глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) [5]. Кроме того, индукция продукции  $\alpha$ -синуклеина дикого типа и мутанта A53T с помощью аденовирусного вектора увеличивала токсичность параквата и усиливала нару-

Принятые сокращения: ГАФД — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; чГАФД — рекомбинантная ГАФД человека; Г-3-Ф — глицеральдегид-3-фосфат; PBS — фосфатно-солевой буфер, pH 7,4;  $\alpha$ -synWT —  $\alpha$ -синуклеин дикого типа,  $\alpha$ -synA53T —  $\alpha$ -синуклеин мутантной формы A53T, КД — круговой дихроизм, ThT — тιοфлавин T; ThS — тιοфлавин S.

\* Адресат для корреспонденции.

шения метаболизма глюкозы [5]. Эти наблюдения свидетельствуют о возможной роли дисфункции ГАФД в развитии данной патологии. Важно отметить, что исходно в нейронах наиболее активен пентозофосфатный путь метаболизма глюкозы, участвующий в наработке восстановительных агентов, в том числе защищающих клетку от окислительного стресса [6, 7]. Именно нарушения в пентозофосфатном пути считаются одними из первых патологических проявлений при развитии болезни Паркинсона [8].

В данной работе мы изучили зависимость изменений метаболизма глюкозы от содержания различных форм  $\alpha$ -синуклеина в клетке. Известно, что повышенная склонность к болезни Паркинсона у людей обнаруживается как в случае наличия мутаций A53T, E46K, A30P, связанных с аутосомно-доминантным наследованием болезни [9–11], так и в случае дупликации и трипликации участка хромосомы, содержащего ген  $\alpha$ -синуклеина дикого типа, приводящих к повышенной продукции белка [12, 13]. В связи с этим мы разработали клеточные модели болезни Паркинсона на основе клеток нейробластомы SH-SY5Y с повышенной продукцией  $\alpha$ -синуклеина дикого типа ( $\alpha$ -synWT) или мутантной формы A53T ( $\alpha$ -synA53T), полученными методом транзientной трансфекции, либо методом получения клонов со стабильной экспрессией белка.

Мы также сосредоточились на роли гликолитического фермента ГАФД в изменении интенсивности гликолиза при болезни Паркинсона. Уменьшение гликолитической активности ГАФД уже было показано для других нейродегенеративных заболеваний – болезни Альцгеймера и болезни Хантингтона [14, 15]. Иммуноцитохимические данные о колокализации  $\alpha$ -синуклеина и ГАФД в тельцах Леви [16], а также формирование структур, напоминающих тельца Леви при одновременной продукции этих двух белков [17], указывают на их возможное взаимодействие. Ранее нами были получены сведения о взаимодействии ГАФД с  $\alpha$ -синуклеином, вызывающим инактивацию фермента, в системе *in vitro* [18].

Таким образом, в данной работе нами было изучено изменение эффективности гликолиза при продукции в клетках разных форм  $\alpha$ -синуклеина, а также возможная роль взаимодействий между ГАФД и  $\alpha$ -синуклеином в регуляции энергетического обмена.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культура клеток.** Клетки нейробластомы человека SH-SY5Y были любезно предоставлены

Университетом Катании, Италия. Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 («Панэко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки («HyClone», США) и 100× раствора GlutaMAX («Gibco», США), 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («Панэко», Россия). Клеточные культуры выращивали в увлажненной атмосфере при 5%-ном содержании CO<sub>2</sub> при 37 °C и пересевали при достижении конфлюэнтности 80–90%. В экспериментах с транзientной трансфекцией использовали клеточную культуру до 25-го пассажа, полученные моноклональные культуры с продукцией  $\alpha$ -синуклеина использовали до 25-го пассажа с учетом процедур отбора.

**Транзientная и стабильная продукция  $\alpha$ -синуклеина.** Ген дикого типа  $\alpha$ -синуклеина ( $\alpha$ -synWT) был получен, как описано ранее [19], и клонирован в вектор pVax1 («Thermo Fisher», США). Мутантный ген  $\alpha$ -синуклеина A53T ( $\alpha$ -synA53T) был получен с помощью сайт-направленного мутагенеза, используя Phusion site-directed mutagenesis kit («Thermo Scientific», США). Клетки нейробластомы SH-SY5Y были трансфицированы полученными конструкциями pVax- $\alpha$ -synWT и pVax- $\alpha$ -synA53T с помощью реагента Lipofectamine 2000 («Invitrogen», США), согласно протоколу производителя. Для получения моноклонов со стабильной продукцией  $\alpha$ -synWT и  $\alpha$ -synA53T были переклонированы в вектор pcDNA3.1Hygro(+) («Invitrogen», США). Клетки были трансфицированы TransIT-LT1 («Mirus», США), через 2 дня после трансфекции в культуральной среде добавили 200 мкг/мл гиромомиина В («Invitrogen», США) и инкубировали еще 10 дней. Устойчивые клетки были использованы для получения моноклонов и протестированы на наличие вставки гена  $\alpha$ -синуклеина методом ПЦР на матрице геномной ДНК, выделенной с помощью TRI REAGENT («Molecular Research Center», США).

**Иммуноцитохимическое окрашивание.** Клетки нейробластомы SH-SY5Y переносили на 24-луночные планшеты по  $15 \times 10^4$  клеток в лунку на покровные стекла диаметром 12 мм («Menzel», Германия). Клетки окрашивали через 3–6 дней после трансфекции или, в случае стабильной продукции  $\alpha$ -синуклеина, на следующий день после рассадки. Клетки промывали холодным раствором фосфатно-солевого буфера (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl), pH 7,4 (PBS), фиксировали в течение 20 мин 4%-ным раствором параформальдегида в PBS и пермеабелизовали в течение 10 мин 0,25%-ным раствором Triton X-100. Для блокировки неспецифического связывания препарат инкубировали в течение 30 мин в

1%-ном растворе БСА в PBS (блокирующий раствор). Затем клетки инкубировали с первичными антителами, специфичными к  $\alpha$ -синуклеину, разведенными в блокирующем растворе (1 : 50, клон syn205, «Cell Signaling Technology», США), в течение 1 ч, тщательно отмывали в PBS и инкубировали со вторичными анти-мышинными антителами козы, конъюгированными с FITC (1 : 1000 в блокирующем растворе, «Abcam», США), в течение 1 ч. После отмывки в PBS от вторичных антител ядра клеток в течение 10 мин окрашивали 1 мкг/мл DAPI («Sigma», США). Для окрашивания тиофлавином S (ThS) («Sigma», США) клетки после пермеабиллизации инкубировали в течение 20 мин с 0,05%-ным раствором ThS в этаноле, дважды промывали 70%-ным этанолом и один раз PBS перед контрастированием. Покровные стекла заключали на предметных стеклах («Menzel», Германия) с помощью заключающей среды Mowiol («Sigma», США), анализировали и фотографировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 M («Carl Zeiss», Германия) и цифровой камеры с охлаждением CCD camera ORCAII-ERG2 («Hamamatsu Photonics», Япония).

**Измерение гликолитических параметров в клеточных лизатах.** Клетки нейробластомы SH-SY5Y переносили в 6-луночные планшеты по  $1 \times 10^6$  клеток в лунку и лизировали на следующий день (в случае стабильной продукции  $\alpha$ -синуклеина) или через 2–3 дня после трансфекции. Клетки открепляли от подложки с помощью 0,25%-ного раствора трипсина-версена («Панэко», Россия). Клетки осаждали центрифугированием («Eppendorf», США), клеточный осадок дважды промывали холодным PBS, затем ресуспендировали в PBS с добавлением коктейля ингибиторов протеаз («Amresco», США) и обрабатывали ультразвуком («Branson Digital Sonicator», США). Клеточные обломки отделяли центрифугированием, концентрацию общего белка измеряли по методу Брэдфорда [20]. Каждую пробу разбавляли буфером PBS для достижения одинаковой конечной концентрации общего белка. Далее каждую пробу разделяли на две части: к первой части добавляли субстрат гликолиза (10 мМ глюкозы) и смесь кофакторов гликолитических ферментов (0,5 мМ АТФ, 1 мМ АДФ, 0,5 мМ  $\text{NAD}^+$ , 0,8 мМ  $\text{Mg}^{2+}$ ), ко второй части вместо указанной смеси добавляли такой же объем растворителя субстратов (воды). Пробы инкубировали при 25 °С и измеряли ферментативную активность ГАФД. Через 2 ч инкубации для остановки гликолиза белки осаждали, как было описано ранее [21], и определяли концентрацию лактата энзиматически, как описано в подразделе

«Определение концентрации лактата». Для расчета скорости продукции лактата концентрацию лактата в пробе без добавок вычитали из концентрации лактата в пробе с добавлением глюкозы и кофакторов гликолитических ферментов и нормализовали на содержание общего белка в пробе и время инкубации.

**Определение активности ГАФД.** Ферментативную активность ГАФД (1.2. 1.12) определяли, как было описано ранее [22]. Для измерения активности в клеточных лизатах в реакционную смесь добавляли пробу, содержащую 20–40 мкг общего белка. Для измерения скорости и степени инактивации ГАФД  $\alpha$ -синуклеином к реакционной смеси добавляли аликвоты (5 мкл), содержащие 1 мкг рекомбинантной ГАФД человека (чГАФД). За единицу ферментативной активности принимали количество мкмоль образовавшегося NADH за 1 мин в расчете на 1 мг белка.

**Измерения глюкозы и лактата.** Для измерения поглощения глюкозы и образования лактата клетки нейробластомы SH-SY5Y переносили в 24-луночные планшеты по  $15 \times 10^4$  клеток в лунку. На следующий день культуральную среду заменяли на свежую, и после 4 ч инкубации отбирали 200 мкл среды. В отобранных аликвотах и некондиционированной среде измеряли концентрацию лактата и глюкозы энзиматическим методом, как описано ниже. Клетки в каждой лунке лизировали в 50 мкл PBS с 1%-ным раствором Triton X-100, и концентрацию общего белка определяли с бицинониновой кислотой, используя BSA Protein Assay Kit («Thermo Scientific», США), согласно протоколу производителя.

**Определение концентрации лактата.** Концентрацию лактата определяли энзиматически с помощью реакции с лактатдегидрогеназой (1.1.1.27), измеряя накопление NADH спектрофотометрически при длине волны 340 нм («Shimadzu», Япония), как описано ранее [21].

**Определение концентрации глюкозы.** Концентрацию глюкозы определяли энзиматически, используя набор Glucose Assay Kit («Sigma», США), согласно инструкции производителя.

**Иммуноблоттинг.** Для подтверждения продукции  $\alpha$ -синуклеина в моноклонах со вставкой рекомбинантного гена клетки лизировали в буфере RIPA (25 мМ Tris-HCl, pH 7,6, 150 мМ NaCl, 1%-ный NP-40, 1%-ный дезоксихолат натрия, 0,1%-ный Ds-Na, 1 мМ PMSF) («Sigma», США) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз. Концентрацию общего белка в растворимой части лизатов определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм и разбавляли до одинакового значения перед на-

несением на гель. Для детекции олигомеров  $\alpha$ -синуклеина в лунку наносили 3 мкг общего белка. Ds-Na-ПААГ электрофорез в восстанавливающих условиях проводили в 16%-ном разделяющем геле (в случае клеточных лизатов) или 4–20%-ном градиентном разделяющем геле (в случае олигомеров) с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану («BioRad», США) в течение 2 ч при постоянной силе тока 150 мА. Перед окрашиванием антителами мембрану фиксировали в 0,4%-ном растворе параформальдегида в PBS [23]. Мембрану блокировали в 5%-ном растворе молока в Tris-солевом буфере (20 мМ Tris-HCl, pH 7,6, 150 мМ NaCl, 0,05%-ный (v/v) раствор Tween 20) и согласно стандартной методике окрашивали мышинными моноклональными антителами к  $\alpha$ -синуклеину (1 : 1000, клон syn205, «Cell Signaling Technology», США или 1 : 2000, клон LB509, «Abcam», США) в течение ночи при 4 °С, затем инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (1 : 2000, «Jackson ImmunoResearch», США) в течение 1 ч при 25 °С и проявляли с помощью усиленной хемилюминесценции («Advansta WesternBright ECL», США) на ChemiDoc XRS+ («BioRad», США).

**Выделение и анализ рекомбинантных белков. чГАФД.** Рекомбинантная ГАФД человека была выделена согласно ранее опубликованному протоколу [22]. чГАФД хранили в виде сульфат-аммонийной суспензии при 4 °С и обессоливали непосредственно перед экспериментом на гелефильтрационной колонке с G-50 сефарозой («GE Healthcare», США). Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда [20].

**$\alpha$ -синуклеин.** Рекомбинантный  $\alpha$ -синуклеин человека дикого типа и мутантная форма A53T были выделены по ранее описанному протоколу [24]. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, используя удельный коэффициент поглощения  $A_{280\text{ nm}}^{1\%}$  4,12.

**Получение олигомеров и фибрилл  $\alpha$ -синуклеина.** Сульфат-аммонийную суспензию  $\alpha$ -синуклеина осаждали с помощью центрифугирования («Eppendorf», США) и диализовали против буфера PBS, pH 7,4 (для получения олигомеров), или PBS, pH 4,0 (для получения фибрилл). После диализа раствор белка центрифугировали («Eppendorf», США) в течение 10 мин при 12 000 g для избавления от потенциальных агрегатов. Для получения олигомеров 8–12 мг/мл раствор  $\alpha$ -синуклеина в PBS pH 7,4 инкубировали при 37 °С в течение 20–24 ч без перемешивания, далее центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 g, после чего супернатант фильтровали через центрифужные фильтры

YM-100 с пределом пропускания 100 кДа («Millipore», США) для обогащения олигомерной фракции. Концентрацию олигомеров определяли либо спектрофотометрически, используя удельный коэффициент поглощения  $A_{280\text{ nm}}^{1\%}$  4,12, либо методом с использованием бицинхониновой кислоты (BCA Protein Assay Kit, «Thermo Scientific», США), согласно протоколу производителя. Для получения фибрилл раствор  $\alpha$ -синуклеина (1 мг/мл) в PBS pH 4,0 инкубировали при 37 °С при перемешивании 600 rpm («Biosan», Латвия) в течение 72 ч. Образование фибрилл контролировали с помощью изменения флуоресценции тиофлавина Т (ThT) («BMG LABTECH GmbH», Германия). Для определения концентрации белка равный объем 6 М гидрохлорида гуанидина добавляли к пробе фибрилл, инкубировали в течение 24 ч при 25 °С, затем измеряли концентрацию белка спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

**Анализ флуоресценции ThT.** Для записи спектра эмиссии флуоресценции ThT пробы, содержащие 7 мкМ белка (в расчете на мономер) и 150 мкМ ThT, инкубировали в течение 10 мин при 25 °С. Спектр прописывали в диапазоне 450–600 нм при длине волны возбуждающего света 435 нм на спектрофлуориметре FluoroMax-3 («Horiba Jobin Yvon», Франция). Для контроля образования фибрилл отбирали аликвоты 5 мкл от пробы (70 мкМ (1 мг/мл)  $\alpha$ -синуклеина в PBS pH 4,0), добавляли к 95 мкл 25 мкМ раствора ThT и измеряли флуоресценцию на планшетном ридере CLARIOstar («BMG LABTECH GmbH», Германия), как описано ранее [24].

**Спектроскопия кругового дихроизма (КД).** Образцы с концентрацией белка 70 мкМ в PBS, pH 7,4 исследовали с помощью спектроскопии КД, регистрируя спектры в диапазоне 200–240 нм при 20 °С в кюветках с длиной оптического пути 0,1 мм на спектрометре Applied Photophysics Chirascan («Applied Photophysics», Великобритания). Каждый представленный спектр получали усреднением 5 записей.

**Нативный электрофорез в щелочной среде.** Пробы белка в буфере для образцов (состав 4× буфера: 0,2 М Tris-HCl, pH 6,8; 20%-ный (v/v) глицерин; 0,02%-ный бромфеноловый синий), содержащие 10 мкг белка, наносили на 3%-ный концентрирующий гель (pH 6,8) и разделяли в 3–15%-ном градиентном разделяющем геле (pH 8,8) без Ds-Na. Электрофорез проводили при максимальном напряжении 120 В в течение 3–4 ч в охлажденном до 4 °С буфере (0,025 М Tris-HCl, 0,192 М глицин, pH 8,3).

**Статистическая обработка результатов.** Данные представлены либо в виде диаграммы раз-

маха, усы которой показывают возможные выбросы согласно расчету:  $X_1 = Q_1 - k(Q_3 - Q_1)$ ,  $X_2 = Q_3 + k(Q_3 - Q_1)$ , где  $X_1$  и  $X_2$  – нижняя и верхняя границы усов соответственно;  $Q_1$  и  $Q_3$  – первый и третий квартили;  $k = 1,5$ . Для статистического анализа был использован программный пакет OriginPro b9.2.196 (2015) («OriginLab Corporation», США). Для определения наличия статически значимого отличия между выборками с использованием всех полученных данных был использован однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными множественными сравнениями по критерию Фишера (критерию наименьших значимых различий) (<https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/ANOVA-CRD>) и тестом Левена ([https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/OneWayANOVA-Algorithm#Homogeneity\\_of\\_Variance](https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/OneWayANOVA-Algorithm#Homogeneity_of_Variance)) на гомогенность дисперсий с уровнем значимости 0,05. Нормальность распределения определяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова (<https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/NormalityTest-Algorithm>). В случае невозможности использования дисперсионного анализа был применен непараметрический  $U$ -критерий Манна–Уитни (<https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/MW-Test-Algorithm>) с уровнем статистической значимости  $p = 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки возможного влияния разных форм  $\alpha$ -синуклеина на интенсивность гликолиза нами были получены клетки нейробластомы SH-SY5Y, транзигентно трансфицированные вектором pVax, содержащим ген  $\alpha$ -синуклеина дикого типа ( $\alpha$ -synWT) или мутантной формы A53T ( $\alpha$ -synA53T), склонной к агрегации. На рис. 1 представлены данные по иммуноцитохимическому окрашиванию транзигентно трансфицированных клеток антителами к  $\alpha$ -синуклеину (рис. 1, а и в) и флуоресцентным красителем ThS (рис. 1, б и г), связывающимся с амилоидными агрегатами, имеющими вторичную структуру бета-листа. При окрашивании антителами к  $\alpha$ -синуклеину мы наблюдали диффузное цитоплазматическое окрашивание у 20–25% клеток, продуцирующих  $\alpha$ -синуклеин в результате успешной трансфекции. ThS-позитивные агрегаты при этом наблюдали только в клетках, трансфицированных  $\alpha$ -synA53T, склонным к агрегации. Точечные скопления имели перинуклеарную и цитоплазматическую локализацию (рис. 1, г).

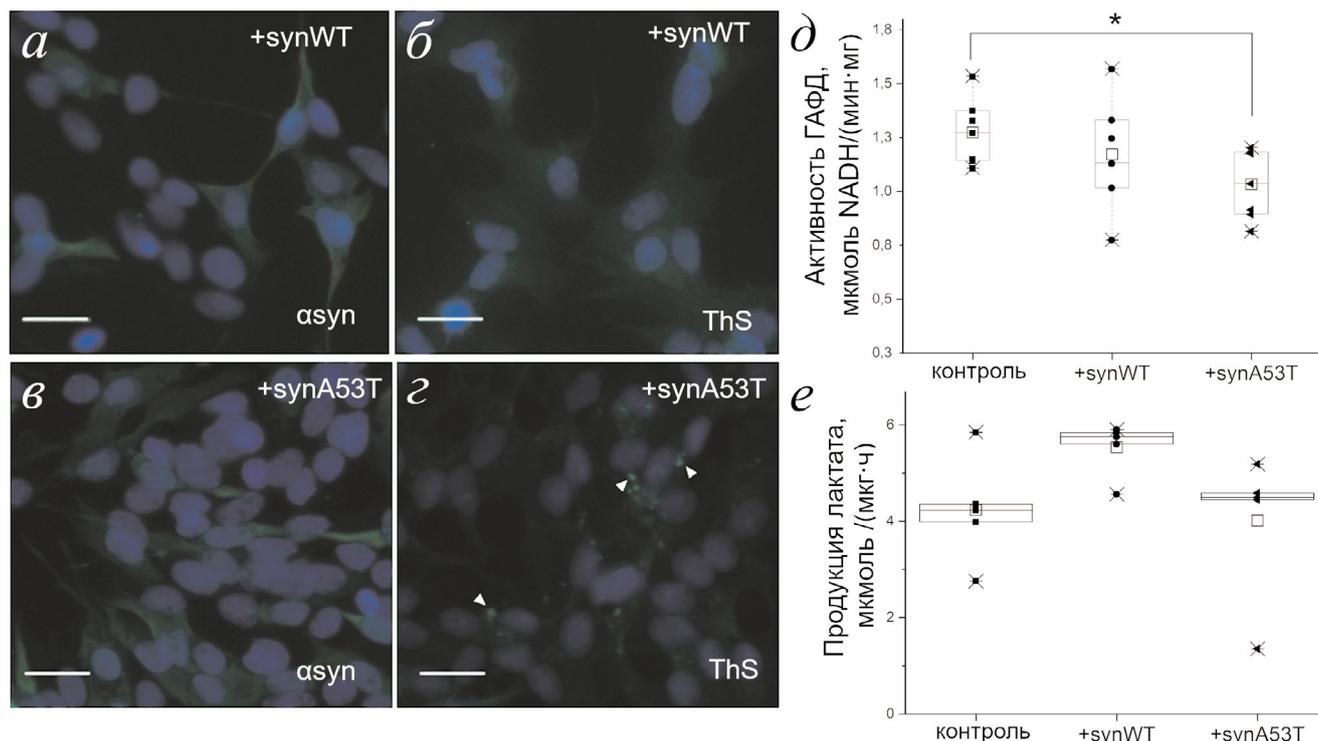
Для оценки влияния продукции и агрегации  $\alpha$ -синуклеина на энергетические процессы

клетки мы определяли активность гликолитического фермента ГАФД (рис. 1, д) и скорость накопления лактата (рис. 1, е) в лизатах клеток SH-SY5Y. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, трансфицированные пустым вектором. При измерении активности ГАФД мы предварительно подтвердили, что в отсутствие избытка субстрата ГАФД (Г-3-Ф) активность не регистрируется. Мы также убедились, что добавление глюкозы и смеси кофакторов гликолитических ферментов, которые добавляли для запуска гликолиза и регистрации накопления лактата, не влияло на активность ГАФД. Как можно видеть из рис. 1, д, активность ГАФД в лизатах статистически значимо снижена только в случае транзигентной экспрессии  $\alpha$ -synA53T, но не  $\alpha$ -synWT. При этом скорость накопления лактата при добавлении к лизатам избытка глюкозы и смеси кофакторов гликолитических ферментов статистически достоверно не отличалась для разных типов клеток.

Отсутствие значительных изменений интенсивности гликолиза в опытах с использованием транзигентной трансфекции могло быть связано с тем, что только в 20–25% клеток происходила продукция  $\alpha$ -синуклеина, и нетрансфицированные клетки вносили основной вклад в конечный результат. Для того чтобы исключить влияние нетрансфицированных клеток на измеряемые параметры, нами были получены стабильные клеточные линии, экспрессирующие  $\alpha$ -synWT или  $\alpha$ -synA53T, на основе транзигентно трансфицированных клеток с помощью метода отбора клонов.

Результаты оценки продукции  $\alpha$ -синуклеина в различных стабильных клонах клеточной линии SH-SY5Y с помощью иммуноблоттинга представлены на рис. 2, а. Как следует из приведенных на рис. 2, а результатов, нами было получено несколько клонов с высокой продукцией  $\alpha$ -synWT или  $\alpha$ -synA53T. Однако, стоит отметить, что продукция  $\alpha$ -synWT была в среднем выше, чем  $\alpha$ -synA53T. Возможно, это связано с высокой токсичностью  $\alpha$ -synA53T при суперпродукции для клетки, что было показано ранее [25]. Для дальнейшей работы мы выбрали клон 1, продуцирующий  $\alpha$ -synWT, и клон 4, продуцирующий  $\alpha$ -synA53T (рис. 2, а), как наиболее близкие друг к другу по уровню продукции белка.

При использовании стабильных клеточных линий после окраски антителами, специфичными к  $\alpha$ -синуклеину, положительное окрашивание было обнаружено во всех клетках. При этом происходило скопление  $\alpha$ -синуклеина в точечные агрегаты как в случае продукции  $\alpha$ -synWT, так и  $\alpha$ -synA53T (рис. 2, б и г). Наличие внут-

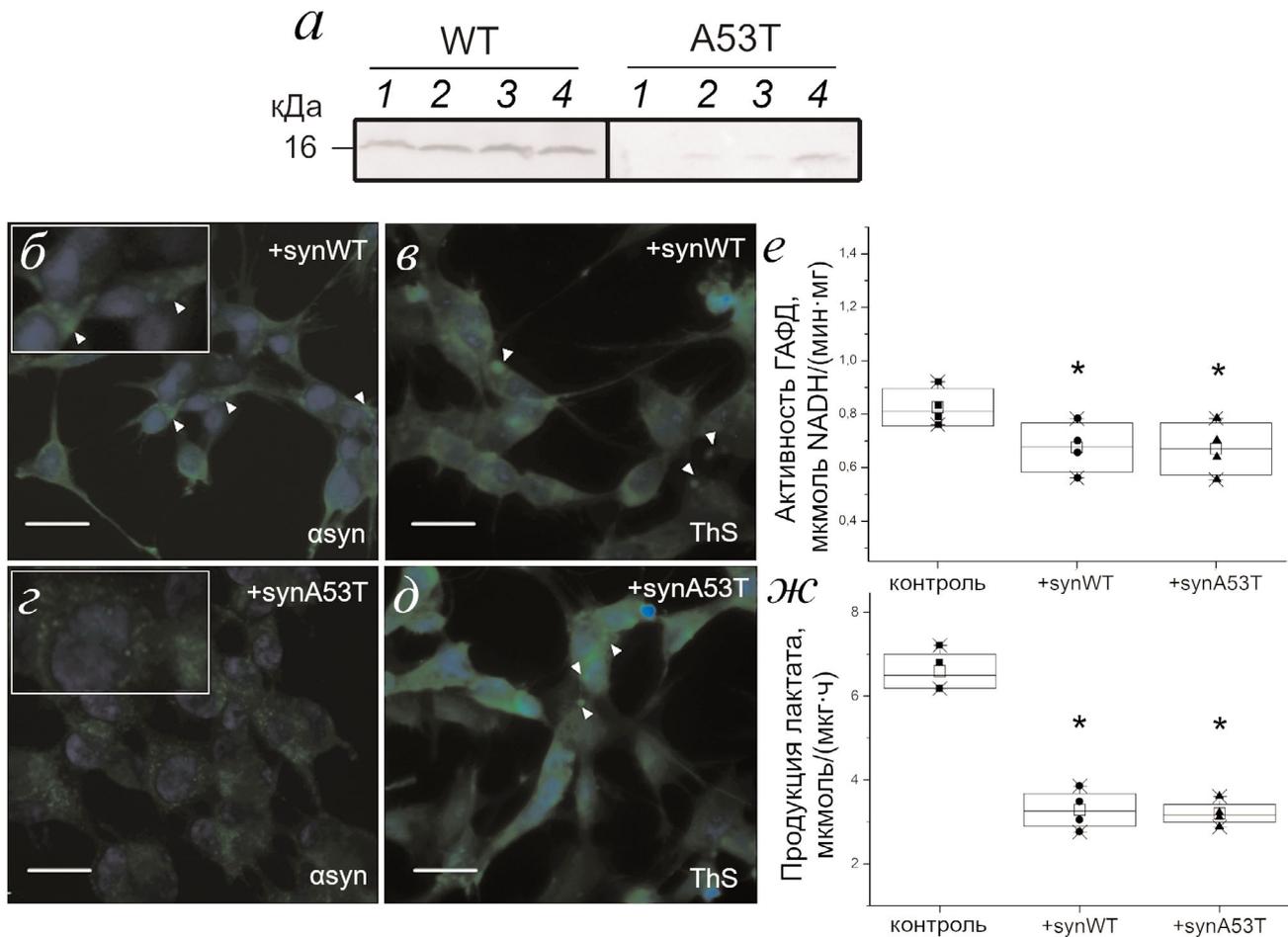


**Рис. 1.** Образование амилоидных агрегатов и оценка гликолитических параметров в клетках нейробластомы SH-SY5Y при транзientной экспрессии  $\alpha$ -synWT или  $\alpha$ -synA53T. *a–d* – Иммуноцитохимическое окрашивание клеток SH-SY5Y, трансфицированных плазмидами pVax-  $\alpha$ -synWT (+synWT) (*a, б*) или pVax-  $\alpha$ -synA53T (+synA53T) (*в, г*), через 72 ч после трансфекции. *a* и *в* – Клетки окрашивали мышиными моноклональными антителами к  $\alpha$ -синуклеину ( $\alpha$ -syn) в разведении 1 : 50 (клон syn204), затем вторичными анти-мышиными антителами козы, конъюгированными с FITC (зеленый цвет), в разведении 1 : 500. *б* и *г* – После фиксации и пермеабелизации клетки окрашивали 0,05%-ным раствором ThS в этиловом спирте. Белые стрелки указывают на ThS-позитивные агрегаты. Полученные препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа при 20 $\times$  увеличении. Отрезок шкалы равен 20 мкм. Во всех препаратах ядра были окрашены DAPI (синий цвет). *д* и *е* – Для определения активности ГАФД (*д*) и скорости накопления лактата (*е*) клетки лизировали через 48 ч после трансфекции pVax-  $\alpha$ -synWT (+synWT) или pVax-  $\alpha$ -synA53T (+synA53T), в качестве контроля были использованы клетки, трансфицированные пустым вектором pVax1 (контроль). Данные представлены в виде диаграммы размаха с указанием точками конкретных экспериментальных значений, для определения активности ГАФД  $n = 7$  (*д*) и для определения продукции лактата  $n = 5$  (*е*). \*  $p < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными множественными сравнениями с помощью критерия наименьших значимых различий). (С цветным вариантом рис. 1, 2, 4 и 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

рикеточных амилоидных агрегатов в обоих случаях было подтверждено окрашиванием ThS (рис. 2, *в* и *д*). Несмотря на повышенную продукцию  $\alpha$ -синуклеина во всех клетках стабильной линии, амилоидные агрегаты наблюдали только в отдельных клетках. При этом содержание агрегатов было приблизительно вдвое выше в клетках, содержащих мутантную форму белка, согласно ручному подсчету количества агрегатов на количество клеток при микроскопическом исследовании. Для дальнейшего исследования содержания различных форм  $\alpha$ -синуклеина в лизатах мы проанализировали лизаты, использованные для измерения активности ГАФД, и скорости накопления лактата методом иммуноблоттинга после электрофореза в денатурирующих условиях и обнаружили только соответ-

ствующие мономерному  $\alpha$ -синуклеину полосы. Полос, соответствующих высокомолекулярным олигомерным формам, обнаружено не было, в том числе в нерастворимых фракциях (данные не приведены), однако их образование было показано аналогичным методом в других работах [26, 27].

При измерении активности ГАФД (рис. 2, *е*) и скорости накопления лактата (рис. 2, *ж*) в качестве контрольных использовали лизаты не подвергавшихся модификации клеток. Активность ГАФД была снижена на 20% как в клетках, продуцирующих  $\alpha$ -synWT, так и в клетках, продуцирующих  $\alpha$ -synA53T. Скорость генерации лактата в трансгенных клетках была также заметно снижена (на 50–60%) относительно контроля.



**Рис. 2.** Образование амилоидных агрегатов и оценка гликолитических параметров в клетках нейробластомы SH-SY5Y при стабильной экспрессии  $\alpha$ -synWT или  $\alpha$ -synA53T. *а* – Оценка уровня продукции  $\alpha$ -synWT и  $\alpha$ -synA53T в отобранных моноклонах SH-SY5Y методом иммуноблоттинга. 1–4 – Номера моноклонов. *б–д* – Иммуноцитохимическое окрашивание клеток SH-SY5Y, стабильно продуцирующих  $\alpha$ -synWT (+synWT) (*б, в*) или  $\alpha$ -synA53T (+synA53T) (*г, д*). *б, г* – Клетки окрашивали мышинными моноклональными антителами к  $\alpha$ -синуклеину ( $\alpha$ -syn) в разведении 1 : 50 (клон syn204), затем вторичными анти-мышинными антителами козы, конъюгированными с FITC (зеленый цвет), в разведении 1 : 500. В белом прямоугольнике в левом верхнем углу приведено цифровое увеличение фрагмента изображения. *в, д* – После фиксации и пермеабилзации клетки окрашивали 0,05%-ным раствором ThS в этиловом спирте. Белые стрелки указывают на ThS-позитивные агрегаты. Полученные препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа при 20 $\times$  увеличении. Отрезок шкалы равен 20 мкм. Во всех препаратах ядра были окрашены DAPI (синий цвет). *е, ж* – Для анализа активности ГАФД (*е*) и скорости накопления лактата (*ж*) клетки SH-SY5Y, стабильно продуцирующие  $\alpha$ -synWT (+synWT) или  $\alpha$ -synA53T (+synA53T), лизировали через 48 ч после пересаживания, в качестве контроля были использованы немодифицированные клетки (контроль). Данные представлены в виде диаграммы размаха с указанием точками конкретных экспериментальных значений, для определения активности ГАФД  $n = 5$  (*д*) и для определения продукции лактата  $n = 4$ . Статистически значимое отличие от контроля с  $*p < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными множественными сравнениями с помощью критерия наименьших значимых различий)

Для дополнительного подтверждения изменения метаболизма в клетках нейробластомы SH-SY5Y, стабильно продуцирующей  $\alpha$ -synWT или  $\alpha$ -synA53T, мы провели измерение скорости поглощения глюкозы и продукции лактата непосредственно в культуральной среде и обнаружили снижение обоих параметров в клетках с повышенной продукцией  $\alpha$ -синуклеина (рис. 3).

Полученные данные подтверждают изменения в энергетическом метаболизме клеток, ста-

бильно экспрессирующих  $\alpha$ -синуклеин, – гликолиз, а следовательно, и снабжение клетки энергией в данных случаях нарушено. Более того, снижение уровня поглощения глюкозы относительно контроля более выражено, чем продукция лактата. Затрудненная утилизация глюкозы может помимо нарушения гликолиза свидетельствовать о нарушениях в захвате глюкозы клетками или дисфункции пентозофосфатного пути, особо важного для жизнедеятельности нервных клеток [6, 7].

Полученные результаты показывают, что существует корреляция между уменьшением интенсивности гликолиза и присутствием в исследованных клетках различных форм  $\alpha$ -синуклеина, прежде всего, мономеров  $\alpha$ -синуклеина и агрегатов, выявляемых при цитохимическом окрашивании (рис. 2, в, д). Мы предположили, что основной причиной уменьшения активности ГАФД, а следовательно, и эффективности гликолиза в целом, может быть ее инактивация из-за взаимодействия с разными формами  $\alpha$ -синуклеина. Ранее нами была показана инактивация человеческой ГАФД в системе *in vitro* в присутствии мономерного  $\alpha$ -синуклеина дикого типа; необходимым условием было частичное окисление сульфгидрильной группы в активном центре чГАФД [18]. В клеточных лизатах всех использованных клеточных линий ГАФД находится в частично окисленной форме, так как ее активность увеличивается на 30–40% после инкубации с ДТТ. Вероятно, взаимодействие  $\alpha$ -синуклеина именно с такими формами ГАФД приводит к дополнительному снижению активности фермента и к изменению интенсивности гликолиза. Чтобы дополнительно исследовать влияние различных форм  $\alpha$ -синуклеина на активность ГАФД, нами были получены рекомбинантные  $\alpha$ -synWT и  $\alpha$ -synA53T, а также их олигомеры и фибриллы. Полученные олигомеры  $\alpha$ -синуклеина были охарактеризованы с помощью изменения флуоресценции ThT,

спектроскопии КД, иммуноблоттинга с антителами, специфичными к  $\alpha$ -синуклеину, и нативного электрофореза (рис. 4, а–г). Формирование фибрилл подтверждали изменением флуоресценции ThT (данные не приведены). Затем мы протестировали взаимодействие чГАФД с различными формами  $\alpha$ -synWT и  $\alpha$ -synA53T (рис. 4, д).

Полученные нами олигомеры  $\alpha$ -синуклеина имели в своем составе бета-структуру, что было подтверждено повышением интенсивности флуоресценции ThT в их присутствии по сравнению с мономерными формами белка (рис. 4, а, кривые 1 и 2 по сравнению с кривыми 3 и 4), а также снижением молярной эллиптичности кривой олигомера (3) относительно кривой мономера  $\alpha$ -synA53T (1) при длинах волн 218–220 нм и 230 нм (рис. 4, б). При этом исходная смесь мономера и олигомера до разделения на центрифужном фильтре с пределом пропускания 100 кДа (рис. 4, б кривая 2) имеет спектр, идентичный спектру мономера белка, что указывает на маленький процент образовавшегося олигомера в исходной смеси. Схожую картину можно наблюдать (рис. 4, в) при окрашивании антителами, специфичными к  $\alpha$ -синуклеину, нитроцеллюлозной мембраны после проведения электрофоретического разделения в восстанавливающих условиях в присутствии Ds-Na. На дорожке, соответствующей смеси мономера и олигомера (рис. 4, в, дорожка 2), можно видеть

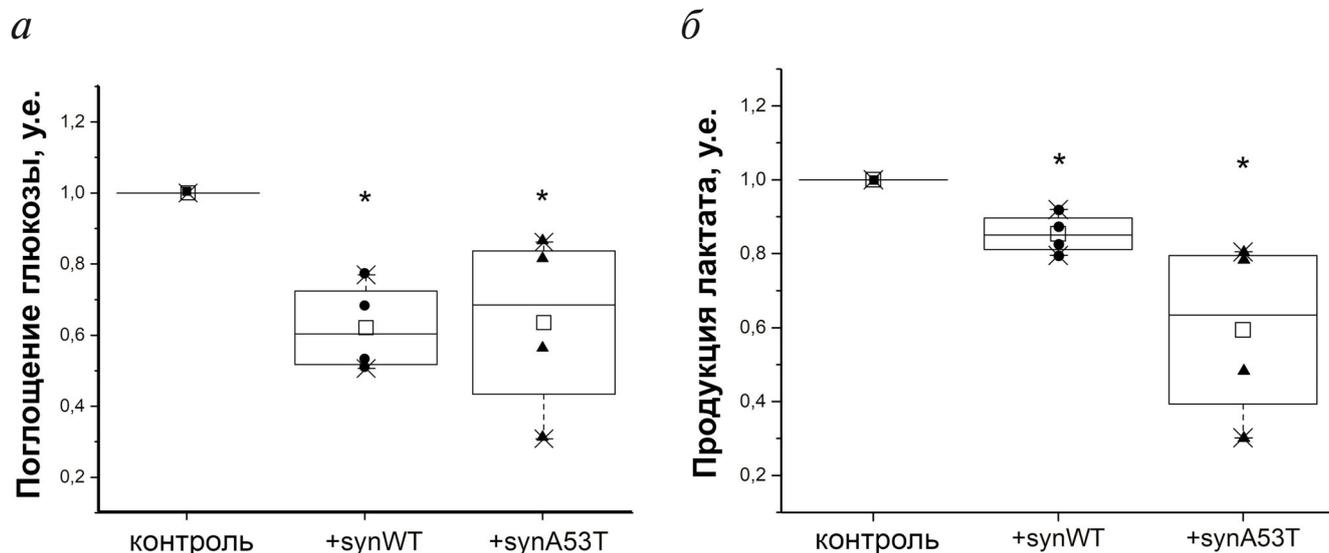
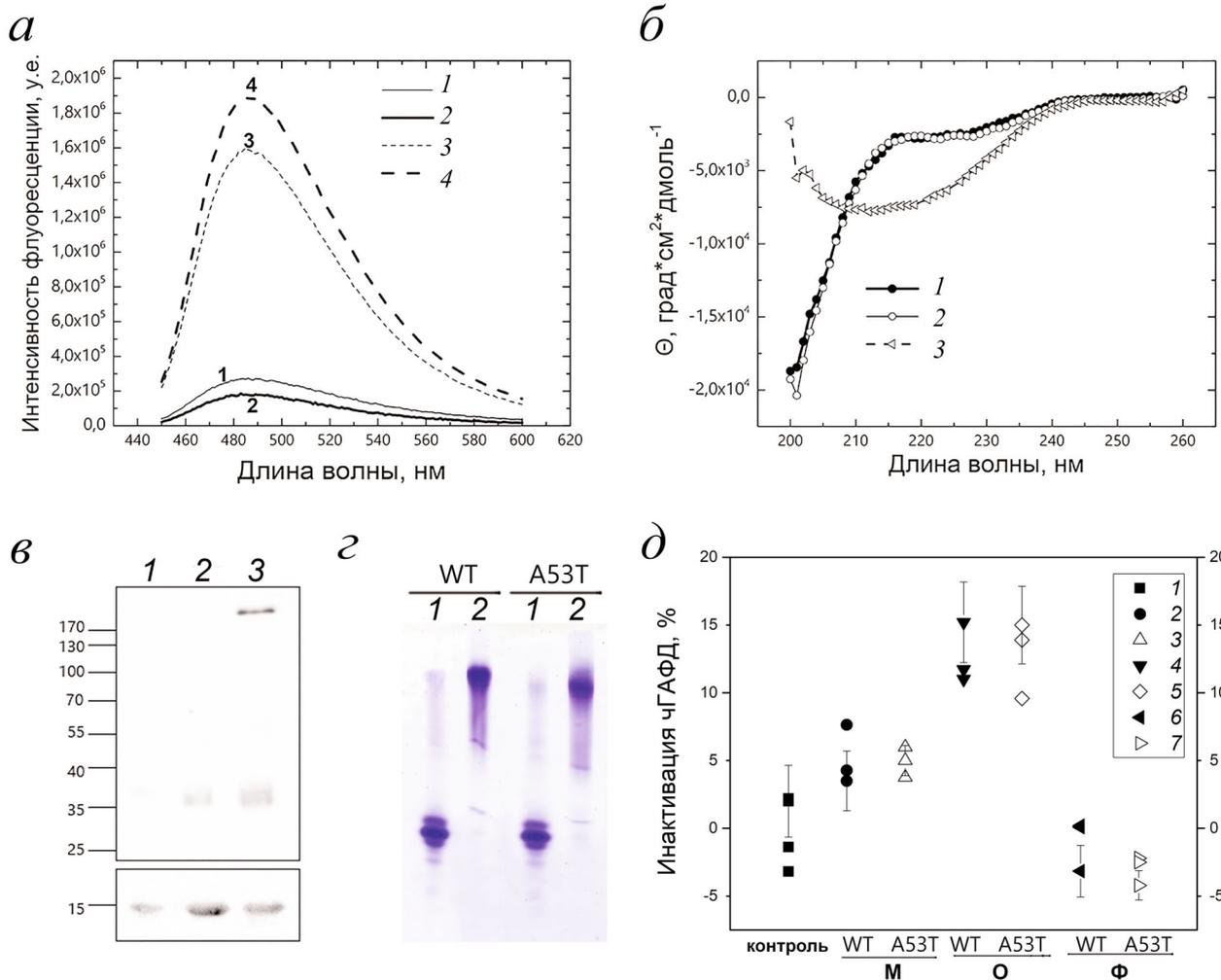


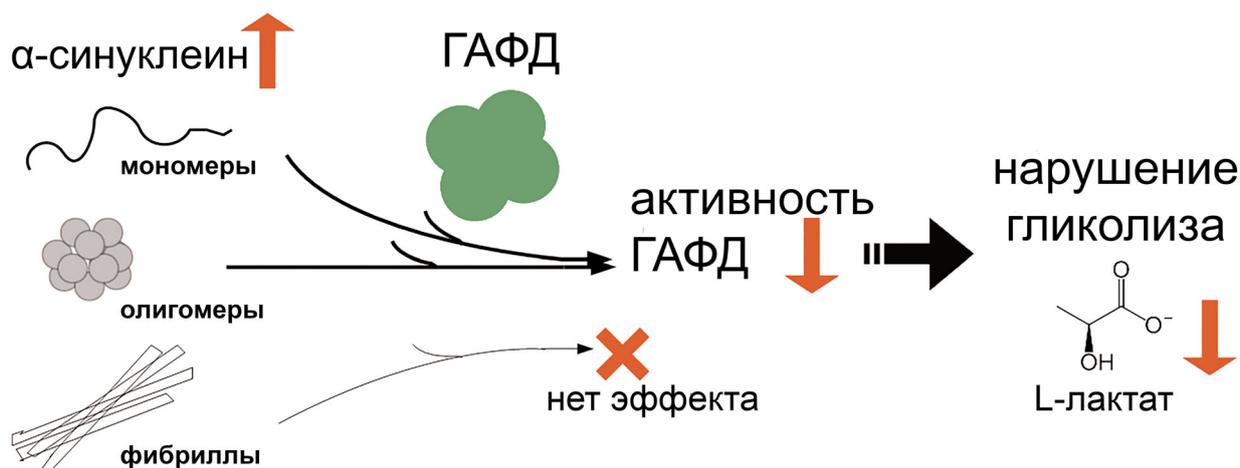
Рис. 3. Оценка интенсивности гликолиза в клетках нейробластомы SH-SY5Y, стабильно продуцирующих  $\alpha$ -synWT (+synWT) или  $\alpha$ -synA53T (+synA53T), по поглощению глюкозы (а) и продукции лактата (б) в культуральной среде. На следующий день после пересаживания клеток культуральную среду заменяли на свежую и измеряли изменение концентрации глюкозы и лактата в среде за 4 ч энзиматическим методом. Данные представлены в виде диаграммы размаха с указанием точками конкретных экспериментальных значений,  $n = 4$ . Статистически значимое отличие от контроля с  $*p < 0,05$  ( $U$ -критерий Манна–Уитни)

дополнительную полосу, соответствующую по молекулярной массе (~36 кДа) димеру  $\alpha$ -синуклеина. Однако полоса, соответствующая высокомолекулярным олигомерам (~190–220 кДа), появляется только на дорожке, соответствующей олигомерам, отделенным от низкомолекулярных форм с помощью фильтрования (рис. 4, в, дорожка 3). Также, согласно данным иммуноблоттинга, можно сделать вывод о том, что полученные олигомеры, по крайней мере частично, устойчивы к воздействию Ds-Na. С по-

мощью нативного фореза мономеров и олигомеров  $\alpha$ -синуклеина (рис. 4, г, дорожки 1 и 2 соответственно) мы подтвердили, что препарат мономера содержит преимущественно мономерную форму белка, а препарат олигомера – преимущественно олигомерную форму. Оценить молекулярную массу олигомера данным методом представляется затруднительным, поскольку мономер  $\alpha$ -синуклеина имеет кажущуюся массу 60 кДа на нативном электрофорезе вместо теоретических 14,4 кДа [28].



**Рис. 4.** Получение и анализ различных форм рекомбинантных  $\alpha$ -synWT и  $\alpha$ -synA53T (М – мономеры; М + О – неразделенная смесь мономеров и олигомеров; О – олигомеры; Ф – фибриллы). *а* – Интенсивность флуоресценции ThT в присутствии мономеров  $\alpha$ -synWT и  $\alpha$ -synA53T (1 и 2) и олигомеров  $\alpha$ -synWT и  $\alpha$ -synA53T (3 и 4). 7 мкМ белка (в расчете на мономер) и 150 мкМ ThT инкубировали в течение 10 мин при 25 °С перед записью спектра возбуждения ThT. *б* – Спектроскопия КД различных форм  $\alpha$ -synA53T (1 – мономеры, 2 – неразделенная смесь мономеров и олигомеров, 3 – олигомеры) с концентрацией белка 70 мкМ в расчете на мономер в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4. *в* – Анализ методом иммуноблоттинга антителами, специфичными к  $\alpha$ -синуклеину (клон LB509), мономера (1), неразделенной смеси мономера и олигомера (2) и полученного с помощью 100 кДа фильтра олигомера (3)  $\alpha$ -synA53T. *г* – Нативный электрофорез в щелочных условиях мономерных (1) и олигомерных (2) форм  $\alpha$ -synWT или  $\alpha$ -synA53T. На дорожку наносили 10 мкг белка. *д* – Степень инактивации 140 мкМ чГАФД в контрольном образце (1) или в присутствии молярного избытка 1 : 40 = тетрамер чГАФД : мономер  $\alpha$ -синуклеина мономеров (2, 3), олигомеров (4, 5) или фибрилл (6, 7)  $\alpha$ -synWT (2,4,6) или  $\alpha$ -synA53T (3, 5 и 7). Данные представлены как экспериментальные значения ( $n = 3$ ) с указанием стандартного отклонения от среднего



**Рис. 5.** Принципиальная схема полученных результатов. Инактивация ГАФД, происходящая вследствие взаимодействия с мономерными и олигомерными формами  $\alpha$ -синуклеина, коррелирует со снижением интенсивности гликолиза, в частности, со снижением скорости генерации L-лактата

При исследовании снижения активности чГАФД в присутствии разных форм  $\alpha$ -синуклеина (рис. 4, д) нами было обнаружено, что наиболее сильно активность чГАФД снижалась при инкубации с олигомерными формами (снижение на 12%), чуть менее выражено на активность влияли мономеры  $\alpha$ -синуклеина (снижение на 5%), а фибриллярные формы на активность чГАФД практически не влияли; самоинактивации чГАФД в тестируемом временном интервале также практически не происходило.

Поскольку мы видим выраженное падение активности ГАФД в случаях, когда при помощи иммуноцитохимии мы наблюдаем образование амилоидных агрегатов, но при этом мы не наблюдаем влияния больших фибриллярных агрегатов на активность чГАФД *in vitro*, можно предположить, что основное влияние на изменение активности ГАФД в клетках оказывают мономерные и олигомерные формы белка. Более того, мы наблюдали снижение активности ГАФД при работе с растворимой фракцией клеточных лизатов, не содержащей больших агрегатов. Несмотря на то, что мы не смогли обнаружить олигомерные формы  $\alpha$ -синуклеина методом иммуноблоттинга, их образование при повышенной экспрессии этого белка было показано в других работах [27]. Вероятно, не только мономеры  $\alpha$ -синуклеина, но и его олигомерные формы, даже присутствующие в относительно небольшом количестве, оказывают выраженное инактивирующее воздействие на ГАФД и, таким образом, вносят вклад в подавление гликолиза.

Как упоминалось ранее, нарушения в пентозофосфатном пути могут быть одними из первых патологических изменений метаболизма

при развитии болезни Паркинсона [8], что в нашей работе косвенно подтверждается снижением потребления глюкозы при стабильно повышенной экспрессии  $\alpha$ -синуклеина (рис. 3, а). Таким образом, можно предположить, что снижение восстановительного потенциала клетки вследствие нарушения регуляции пентозофосфатного пути может приводить к частичному окислению ферментов, в том числе ГАФД, что, в свою очередь, является одним из механизмов нарушения снабжения клетки энергией путем гликолиза, ведет к накоплению субстрата ГАФД — глицеральдегид-3-фосфата — и снижению продукции лактата, что было показано и на нашей клеточной модели (рис. 2, ж и 3, б).

Полученные результаты позволяют нам сделать выводы о том, что стабильная суперпродукция  $\alpha$ -синуклеина в клетках нейробластомы SH-SY5Y приводит к накоплению амилоидных агрегатов, причем продукция  $\alpha$ -synA53T приводит к накоплению большего количества агрегатов, чем  $\alpha$ -synWT. Повышенная продукция  $\alpha$ -синуклеина также вызывает изменения метаболизма, в частности, снижение скорости генерации лактата и потребления глюкозы. Обнаруженные нарушения гликолиза также коррелируют со снижением ферментативной активности ГАФД. Эксперименты, проведенные на изолированных белках в системе *in vitro*, позволяют предположить, что инактивация ГАФД происходит вследствие взаимодействия с мономерными и олигомерными формами  $\alpha$ -синуклеина (рис. 5).

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда

фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-34-00132.

**Конфликт интересов.** Авторы сообщают 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

- Schapira, A., Cooper, J., Dexter, D., Clark, J., Jenner, P., and Marsden, C. (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease, *J. Neurochem.*, **54**, 823-827, doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325.x.
- Nakamura, K. (2013)  $\alpha$ -Synuclein and mitochondria: partners in crime? *Neurotherapeutics*, **10**, 391-9, doi: 10.1007/s13311-013-0182-9.
- Henchcliffe, C., Shungu, D., Mao, X., Huang, C., Nirenberg, M., Jenkins, B., and Beal, M. (2008) Multinuclear magnetic resonance spectroscopy for *in vivo* assessment of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1147**, 206-220, doi: 10.1196/annals.1427.037.
- Jiang, P., Gan, M., Ebrahim, A., Castanedes-casey, M., Dickson, D., and Yen, S. (2013) Adenosine monophosphate-activated protein kinase overactivation leads to accumulation of  $\alpha$ -synuclein oligomers and decrease of neurites, *Neurobiol. Aging*, **34**, 1504-1515, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.001.
- Anandhan, A., Lei, S., Levysky, R., Pappa, A., Panayiotidis, M., Cerny, R., Khalimonchuk, O., Powers, R., and Franco, R. (2017) Glucose metabolism and AMPK signaling regulate dopaminergic cell death induced by gene ( $\alpha$ -synuclein)-environment (paraquat) interactions, *Mol. Neurobiol.*, **54**, 3825-3842, doi: 10.1007/s12035-016-9906-2.
- Anandhan, A., Jacome, M., Lei, S., Hernandez-Franco, P., Pappa, A., Panayiotidis, M., Powers, R., and Franco, R. (2017) Metabolic dysfunction in Parkinson's disease: bioenergetics, redox homeostasis and central carbon metabolism, *Brain Res. Bull.*, **133**, 12-30, doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.03.009.
- Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernández, E., Maestre, C., Moncada, S., and Bolaños, J. (2009) The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 747-52, doi: 10.1038/ncb1881.
- Dunn, L., Allen, G., Mamais, A., Ling, H., Li, A., Duberley, K., Hargreaves, I., Pope, S., Holton, J., Lees, A., Heales, S., and Bandopadhyay, R. (2014) Dysregulation of glucose metabolism is an early event in sporadic Parkinson's disease, *Neurobiol. Aging*, **35**, 1111-1115, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.001.
- Polymeropoulos, M., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W., Lazzarini, A., Duvoisin, R., Iorio, G., Golbe, L., and Nussbaum, R. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science*, **276**, 2045-2047, doi: 10.1126/science.276.5321.2045.
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J., Schöls, L., and Riess, O. (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease, *Nat. Genet.*, **18**, 106-108, doi: 10.1038/ng0298-106.
- Zarranz, J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., Llorens, V., Tortosa, E., Ser, T., Muñoz, D., and Yebenes, J. (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia, *Ann. Neurol.*, **55**, 164-173, doi: 10.1002/ana.10795.
- Chartier-Harlin, M.-C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Defebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M., and Destée A. (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease, *Lancet (London, England)*, **364**, 1167-1169, doi: 10.1016/S0140-6736(04)17103-1.
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M., Muentner, M., Baptista, M., Miller, D., Blacato, J., Hardy, J., and Gwinn-Hardy, K. (2003) Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease, *Science*, **302**, 841, doi: 10.1126/science.1090278.
- Shalova, I., Cechalova, K., Rehakova, Z., Dimitrova, P., Ognibene, E., Caprioli, A., Schmalhausen, E., Muronetz, V., and Saso, L. (2007) Decrease of dehydrogenase activity of cerebral glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in different animal models of Alzheimer's disease, *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**, 826-832, doi: 10.1016/j.bbagen.2007.01.014.
- Mazzola, J., and Sirover, M. (2001) Reduction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease and in Huntington's disease fibroblasts, *J. Neurochem.*, **76**, 442-449, doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00033.x.
- Tatton, N. (2000) Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease, *Exp. Neurol.*, **166**, 29-43, doi: 10.1006/exnr.2000.7489.
- Tsuchiya, K., Tajima, H., Kuwae, T., Takeshima, T., Nakano, T., Tanaka, M., Sunaga, K., Fukuhara, Y., Nakashima, K., Ohama, E., Mochizuki, H., Mizuno, Y., Katsube, N., and Ishitani, R. (2005) Pro-apoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes the formation of Lewy body-like inclusions, *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 317-326, doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.03870.x.
- Barinova, K., Khomyakova, E., Semenyuk, P., Schmalhausen, E., and Muronetz, V. (2018) Binding of alpha-synuclein to partially oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induces subsequent inactivation of the enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.*, **642**, 10-22, doi: 10.1016/j.abb.2018.02.002.
- Barinova, K., Kuravsky, M., Arutyunyan, A., Serebryakova, M., Schmalhausen, E., and Muronetz, V. (2017) Dimerization of Tyr136Cys alpha-synuclein prevents amyloid transformation of wild-type alpha-synuclein, *Int. J. Biol. Macromol.*, **96**, 35-43, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.011.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Danshina, P., Schmalhausen, E., Avetisyan, A., and Muronetz, V. (2001) Mildly oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a possible regulator of glycol-

- ysis, *IUBMB Life*, **51**, 309-314, doi: 10.1080/152165401317190824.
22. Barinova, K., Eldarov, M., Khomyakova, E., Muronetz, V., and Schmalhausen, E. (2017) Isolation of recombinant human untagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *E. coli* producer strain, *Protein Expr. Purif.*, **137**, 1-6, doi: 10.1016/j.pep.2017.06.009.
  23. Lee, B., and Kamitani, T. (2019) Improved immunodetection of endogenous  $\alpha$ -synuclein, *PLoS One*, **6**, e23939, doi: 10.1371/journal.pone.0023939.
  24. Medvedeva, M., Barinova, K., Melnikova, A., Semenyuk, P., Kolmogorov, V., Gorelkin, P., Erofeev, A., and Muronetz, V. (2020) Naturally occurring cinnamic acid derivatives prevent amyloid transformation of alpha-synuclein, *Biochimie*, **170**, 128-139, doi: 10.1016/j.biochi.2020.01.004.
  25. Liu, Z., Yu, Y., Li, X., Ross, C., and Smith, W. (2011) Curcumin protects against A53T alpha-synuclein-induced toxicity in a PC12 inducible cell model for Parkinsonism, *Pharmacol. Res.*, **63**, 439-444, doi: 10.1016/j.phrs.2011.01.004.
  26. Mishizen, A. J., Lynch, D. R., Nakashima, A., Nagatsu, T., Giasson, B. I., Ota, A., Thomas, S. A., Mazzulli, J. R., and Ischiropoulos, H. (2006) Cytosolic catechols inhibit  $\alpha$ -synuclein aggregation and facilitate the formation of intracellular soluble oligomeric intermediates, *J. Neurosci.*, **26**, 10068-78, doi: 10.1523/jneurosci.0896-06.2006.
  27. Marmolino, D., Foerch, P., Atienzar, F., Staelens, L., Michel, A., and Scheller, D. (2016) Alpha-synuclein dimers and oligomers are increased in overexpressing conditions *in vitro* and *in vivo*, *Mol. Cell. Neurosci.*, **71**, 92-101, doi: 10.1016/J.MCN.2015.12.012.
  28. Burré, J., Vivona, S., Diao, J., Sharma, M., Brunger, A., and Südhof, T. (2013) Properties of native brain  $\alpha$ -synuclein, *Nature*, **498**, 1-6, doi: 10.1038/nature12125.

## ALPHA-SYNUCLEIN OVEREXPRESSION IN SH-SY5Y HUMAN NEUROBLASTOMA CELLS LEADS TO ACCUMULATION OF THIOFLAVIN S-POSITIVE AGGREGATES AND IMPAIRMENT OF GLYCOLYSIS

A. K. Melnikova<sup>1\*</sup>, D. V. Pozdyshev<sup>2</sup>, K. V. Barinova<sup>2</sup>,  
S. S. Kudryavtseva<sup>1</sup>, and V. I. Muronetz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics,  
119234, Moscow, Russia; E-mail: alksmelnikova@gmail.com*

<sup>2</sup> *Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, 119234, Moscow, Russia*

Received February 17, 2020

Revised March 13, 2020

Accepted March 25, 2020

Deterioration of energy metabolism in affected cells is an important feature of synucleinopathies, including Parkinson's disease. Here, we studied the association between  $\alpha$ -synuclein accumulation and glycolysis using SH-SY5Y neuroblastoma cell lines stably expressing wild-type  $\alpha$ -synuclein or its A53T mutant linked to the autosomal dominant form of the disease. Overexpression of both proteins led to the accumulation of thioflavin S-positive aggregates, more pronounced for  $\alpha$ -synuclein A53T. It also caused changes in the cell energy metabolism manifested as a decrease in the lactate accumulation and glucose uptake. Impairments in glycolysis were also accompanied by a decrease in the activity of the glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). *In vitro* experiments with purified proteins indicated that GAPDH inactivation might be caused by its binding to the monomeric and oligomeric forms of  $\alpha$ -synuclein. Therefore, a decrease in the GAPDH activity induced by its interaction with  $\alpha$ -synuclein, might be one of the causes of glucose metabolism deterioration in synucleinopathies.

**Keywords:**  $\alpha$ -synuclein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, glycolysis, Parkinson's disease

УДК 577.112.5

## ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОЛА ЧЕЛОВЕКА ПЕПТИДОМНЫМ АНАЛИЗОМ ЭМАЛИ ЗУБОВ РАЗЛИЧНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ГЕНЕРАЦИИ, АРХЕОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА И ТАФНОМИЧЕСКОЙ СОХРАННОСТИ\*

© 2020 Р.Х. Зиганшин<sup>1\*\*</sup>, Н.Я. Березина<sup>2</sup>, П.Л. Александров<sup>1</sup>,  
В.В. Рябинин<sup>1</sup>, А.П. Бужилова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 Москва, Россия; электронная почта: rustam.ziganshin@gmail.com

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт и музей антропологии,  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 125009 Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.02.2020

После доработки 16.03.2020

Принята к публикации 19.03.2020

Пол индивидов, определяемый по человеческим останкам – это наиболее востребованная информация при антропологических, археологических и судебно-медицинских исследованиях. При плохой сохранности скелетов взрослых, а также на детских останках определение пола по морфологическим критериям имеет ряд существенных ограничений, поэтому для успешной реализации этой задачи проводятся регулярные попытки привлечения альтернативных методов анализа. В качестве одного из таких методов может быть использован хромато-масс-спектрометрический анализ пептидов зубной эмали. В ходе оптимизации эксперимента было показано, что кислотное травление участка зубной эмали в течение 10 мин с последующим обессоливанием продуктов травления на SDB-RPS StageTips микроколонках и анализа 1/3 части обессоленного образца методом хромато-масс-спектрометрии позволяет надежно определять пол ископаемых останков в широком диапазоне их археологического и биологического возраста, не подвергая существенному разрушению анализируемый образец. Увеличение длительности травления зубной эмали позволяет в 2–3 раза увеличить общее количество идентифицируемых в образце пептидов и, что самое важное, количество выявляемых специфических фрагментов Y изоформы амелогенина в образцах мужских зубов, что позволяет надежно определять пол ископаемых останков. Предложенный метод анализа был апробирован на 8 образцах постоянных зубов и 15 образцах зубов молочной генерации различного археологического возраста и разной степени сохранности. Были выявлены две специфичные для Y изоформы амелогенина пептидные последовательности, одна из которых (SM(+15.99)IRPPYS) обнаружена во всех без исключения образцах мужского пола, а вторая (IRPPYSS(+79.97)), содержащая фосфорилированный остаток Ser66, встречается только в эмали молочных зубов. Можно предположить, что фосфорилирование этого остатка Ser имеет функциональное значение при формировании эмали именно в зубах молочной генерации.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** зубная эмаль, идентификация пола, амелогенины, пептиды, хромато-масс-спектрометрия.

**DOI:** 10.31857/S0320972520050103

### ВВЕДЕНИЕ

Данные по идентификации пола по останкам человека наиболее востребованы в антропологических, археологических и судебно-медицинских исследованиях. В судебной медицине – это один из ключевых признаков для идентификации личности. В археологии и палеоантропологии анализ пола важен для реконструк-

ции социальной и биологической структуры группы, образа жизни с выявлением гендерных особенностей, моделирования демографических и ростовых процессов в прошлом с учетом полового диморфизма.

Определение пола человеческих останков возможно по морфологическим критериям, когда используются измерительные и описательные признаки. В результате разработан общепринятый стандарт, который в большинстве случаев (до 95%) дает успешное определение пола по костным останкам взрослых индивидуумов [1–3]. Однако определение пола у ископаемых останков неполовозрелых индивидуумов,

\* 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. 5, 2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

равно как и анализ фрагментарных останков взрослых методами морфологии, имеет ряд существенных ограничений, что на порядок снижает востребованность этого источника в научных исследованиях. Для успешной идентификации пола на ископаемых останках такого рода проводятся регулярные попытки привлечения дополнительных морфологических или молекулярных методов, например, анализ ДНК [4–8]. В большинстве случаев дополнительные морфологические критерии работают с разной долей успешной идентификации. Так, например, исследование полового диморфизма тазовой кости неполовозрелых индивидуумов по метрическим признакам, проведенное на паспортизованных коллекциях, показало, что и логистическая регрессия, и анализ дискриминантной функции дают низкие прогностические оценки, самые высокие из которых (0,68) недостаточны для последовательного прогнозирования пола. Анализ описательных морфологических признаков тазовой кости также показал, что они не могут быть использованы для надежного определения пола [9]. Исследования метрических признаков зубов дают более ясную картину идентификации пола. По размерам постоянных клыков достоверность определения пола в некоторых группах достигает 76,5–100% точности, однако в других группах этот признак работает не так успешно [10, 11]. Молекулярные методы и, в частности, анализ ДНК ископаемых индивидуумов идентифицирует пол с высокой долей достоверности. Этот метод, как правило, используют в судебно-медицинской экспертизе и при анализе уникальных ископаемых останков. Однако для анализа многочисленных палеоантропологических серий этот метод не применяется. Обратим внимание, что успешное выделение ДНК возможно только из образцов с хорошей сохранностью органики, что редко встречается на фрагментарных останках, и тем самым значительно ограничивает использование этого метода.

В качестве альтернативного метода с высокой долей успешной идентификации пола на многочисленной выборке может быть использован пептидомный анализ эмали зубов ископаемых останков. Эмаль зубов представляет собой нанокompозитную биокерамику, защищающую зубы от внешних физических и химических повреждений. Являясь наиболее твердой, плотной и кальцифицированной тканью млекопитающих, она позволяет сохранять содержащиеся в ней вещества под действием времени и окружающей среды в течение многих десятков тысяч лет. Созревание зубной эмали происходит при участии ряда белков, секретлируемых специализированными клетками – амелобластами. Ос-

новными из них являются гетерогенные по структуре амелогенины (AMELX и AMELY), амелобластин (AMBN), энамелин (ENAM), матриксная металлопротеиназа 20 (MMP20) и каллекреин 4 (KLK4). Амелогенины являются мажорными структурными белками органической матрицы зубной эмали, составляющими >90% ее белковой материи. У человека гены амелогенинов локализованы как на X- (ген *AMELX*), так и на Y-хромосоме (*AMELY*), причем структуры белков, кодируемые этими генами диморфны, т.е. имеют отличия в аминокислотных последовательностях, которые позволяют отличить эти белки друг от друга. Оба гена экспрессируют свои продукты, т.е. в состав зубной эмали женщин входит продукт экспрессии гена *AMELX*, а у мужчин – продукты экспрессии генов *AMELX* и *AMELY*, при этом уровень экспрессии гена *AMELY* составляет ~10% от уровня экспрессии *AMELX* [12]. При созревании зубной эмали, одновременно с завершением ее минерализации, происходит массовая протеолитическая деградация белков ее органической матрицы, в результате которой в состав зубной эмали вышеперечисленные белки входят уже в виде пептидных фрагментов. Целью настоящей работы являлась оптимизация условий выделения и идентификации пептидов из зубной эмали человека с использованием хромато-масс-спектрометрии с учетом археологической древности, тафономической сохранности эмали зуба и принадлежности зубов разным биологическим генерациям (молочной и постоянной).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Образцы зубов.** Образцы для исследования были получены из нескольких антропологических коллекций, большая часть которых хранится в фондах НИИ и Музея антропологии МГУ. Они различаются археологической древностью и тафономической сохранностью (табл. 1).

1) Один образец (16) из могильника каменного века Минино I – самый древний в исследованной выборке, относят по результатам радиоуглеродного анализа к эпохе мезолита,  $9435 \pm 55$  лет назад (Вологодская область, Россия) [13]. Это верхний клык постоянной генерации хорошей сохранности без видимых повреждений.

2) Два образца (17 и 18) от разных половозрелых индивидуумов из пещеры Кайлю, предположительно, относят к эпохе неолита, VI–V тыс. до н. э. (Восточный Прикаспий, Туркменистан) [14]. Это 2 постоянных зуба верхней и нижней челюстей плохой сохранности (один – предкоронной и один – резец). Эмаль коронки зубов

сильно эродирована из-за тафономических условий захоронения. В одном случае дегенеративные процессы затронули не только коронку зуба (эмаль), но и дентин. Таким образом, сохранность этих образцов в одном случае средняя, в другом – плохая.

3) 18 образцов (1–14 и 19–22) принадлежат останкам из раннесредневекового могильника Мамисондон, VII–IX вв. н. э. (Республика Северная Осетия – Алания) [15]. Присутствуют как зубы молочной генерации (14 зубов), так и постоянной (4 зуба) от разных индивидуумов. В целом эмаль зубов хорошей сохранности, коронки полностью сформированы и без видимых повреждений. В двух случаях (3 и 8) анализировали зубы детей в возрасте до года, у которых коронки молочной генерации зубов сформировались, а корень зуба находился в начальной стадии развития. Они использовались в эксперименте для сравнительной оценки присутствия амелогенинов в эмали еще не сформированного зуба молочной генерации. В целом толщина эмали на молочной генерации зубов была меньше, что подтверждается другими исследованиями [16–18]. В этом случае все образцы молочной генерации оценивались как условно хорошей сохранности, а зубы постоянной генерации – как хорошей сохранности.

4) Один образец (23) датируется 1812–1813 гг. и относится к половозрелому индивидууму из госпитального кладбища солдат армии Наполеона г. Кенигсберга (ныне г. Калининград) [19]. Это верхний резец постоянной генерации хорошей сохранности без видимых повреждений. Эмаль коронки отличалась исключительно хорошей сохранностью.

5) Один образец молочного зуба (15) принадлежит современному ребенку. Зуб без видимых повреждений, нижний первый коренной зуб. Как и другие зубы молочной генерации, был отнесен к условно хорошей сохранности.

Всего в работе были использованы образцы от 23 индивидуумов, причем 15 молочных зубов отличались условно хорошей сохранностью, 6 постоянных зубов – хорошей сохранностью, 1 постоянный зуб – средней сохранностью, 1 постоянный зуб – плохой сохранностью.

**Методы анализа пола.** Пол всех половозрелых индивидуумов, вошедших в анализ, был определен методами антропологии [1–3]. Для анализа пола детских скелетов (серия Мамисондон) использовали археологический критерий погребального обряда, когда останки женского пола хоронили на боку, а мужского – на спине [15]. В нескольких случаях в серии Мамисондон пол детей (11 индивидов) было невозможно установить по археологическому критерию в связи с

посмертным нарушением положения скелета в погребении (образцы 1–11, табл. 1). Кроме того, в этой серии отмечен случай несогласованности идентификации пола одного взрослого индивида по археологическому (женский пол) и антропологическому (мужской пол) критериям (образец 20, табл. 1) В этих случаях пол определяли только методом пептидного анализа зубной эмали. Определение пола одного взрослого индивида в серии Мамисондон (образец 22, табл. 1), помимо примененных методов, подтверждено методами генетики.

**Травление зубной эмали.** Травление зубной эмали и экстракцию из нее пептидов проводили по модифицированной методике, описанной ранее [20]. Поскольку в предварительных экспериментах, в которых поверхность зубов до основной процедуры травления механически очищали от возможных загрязнений тонким абразивом и протравливали 1,5 М HCl в течение 1 мин, не было обнаружено принципиальных отличий в списках идентифицированных пептидов от тех же образцов, у которых другую часть зубной эмали просто последовательно промывали этиловым спиртом и деионизованной водой, в дальнейшем от этой предварительной обработки зуба было решено отказаться. Для травления зубной эмали использовали 1,5 М HCl. В качестве реакторов для травления использовали крышки микропробирок 0,5 мл. В реактор вносили 80 мкл 1,5 М HCl, зуб фиксировали при помощи пинцета, зажимая его в лапках штатива, и помещали над реактором так, чтобы эмаль была погружена в раствор кислоты. Использовали 3 схемы травления:

1) 3 последовательные инкубации одной и той же части зубной эмали в 1,5 М HCl в течение 4-х мин каждая;

2) инкубация участка зубной эмали в 1,5 М HCl в течение 4-х мин;

3) инкубация участка зубной эмали в 1,5 М HCl 10-ти мин.

Растворы, полученные в результате травления эмали, замораживали в жидком азоте, высушивали на центрифужном вакуумном испарителе SpeedVac («Savant», Франция) и хранили до использования при  $-85^{\circ}\text{C}$ .

**Обессоливание пептидов на SDB-RPS StageTips микроколонках.** Микроколонки для обессоливания пептидов изготавливали из наконечника для автоматических пипеток (200 мкл) и двух кусочков мембраны Empore SDB-RPS («3M», США), вырезанных иглой 14 калибра. Высушенный продукт протравливания зубной эмали растворяли в 100 мкл 1% TFA (трифторуксусная кислота) («Merck», Германия) и наносили на микроколонку, используя цент-

Таблица 1. Список проанализированных образцов зубов

Номер образца	Происхождение образца	Датировка	Класс зуба*	Сохранность зуба	Возраст, лет	Успешность идентификации пола по данным**			Пол
						Археологии	Антропологии	Пептидомики	
1	Мамисондон, ОЧМ, п. 15	раннее средневековье	i	условно хорошая	0,5–1	x	x	+	♂
2	Мамисондон, X-1, п. 21	раннее средневековье	i	условно хорошая	0,75–1	x	x	+	♂
3	Мамисондон, X-1, п. 23	раннее средневековье	i	условно хорошая	0,25–0,75	x	x	+	♂
4	Мамисондон, ОЧМ, п. 40	раннее средневековье	m	условно хорошая	5–7	x	x	+	♂
5	Мамисондон, ОЧМ, п. 41	раннее средневековье	i	условно хорошая	0,75–1,2	x	x	+	♂
6	Мамисондон, X-1, п. 43А	раннее средневековье	i	условно хорошая	1,2–2,6	x	x	+	♂
7	Мамисондон, X-1, п. 51Б	раннее средневековье	i	условно хорошая	1,5–2,5	x	x	+	♂
8	Мамисондон, X-1, п. 51В	раннее средневековье	i	условно хорошая	0,75–1	x	x	+	♂
9	Мамисондон, ОЧМ, п. 52	раннее средневековье	i	условно хорошая	2–3	x	x	+	♂
10	Мамисондон, X-1, п. 65В, ск1	раннее средневековье	m	условно хорошая	1–2	x	x	+	♂
11	Мамисондон, X-1, п. 65В, ск2	раннее средневековье	m	условно хорошая	1,5–2	x	x	+	♀
12	Мамисондон, X-1, п. 48Б	раннее средневековье	m	условно хорошая	9–10	+	x	+	♀
13	Мамисондон, ОЧМ, п.94Б	раннее средневековье	c	условно хорошая	1–1,5	+	x	+	♀
14	Мамисондон, X-1, п. 43Б	раннее средневековье	m	условно хорошая	5–6	+	x	+	♂
15	Москва	XXI в.	m	условно хорошая	8–9	контроль	контроль	+	♂
16	Минино I, п.19, инд 3	мезолит	C	хорошая	20–29	x	+	+	♂
17	Кайлю, п. 1	неолит	P	средняя	20–35	x	x	+	♂
18	Кайлю, п. 2	неолит	I	плохая	30–49	x	x	+	♀
19	Мамисондон, ОЧМ, п. 61	раннее средневековье	P	хорошая	12–14	+	x	+	♂
20	Мамисондон, X-1, п. 53	раннее средневековье	C	хорошая	35–49	–	+	+	♂
21	Мамисондон, ОЧМ, п. 13	раннее средневековье	M	хорошая	35–45	+	+	+	♀
22	Мамисондон, X-1, п.34***	раннее средневековье	C	хорошая	20–29	+	+	+	♂***
23	Кенигсберг, L-32	XIX в.	P	хорошая	18–20	x	+	+	♂

Условные обозначения: \* I – резцы, C – клыки, P – премоляры, M – моляры; строчные буквы – молочные зубы, прописные – постоянная генерация.

\*\* «x» – Идентификация невозможна, «–» – идентификация не совпадает с финальным определением, «+» – идентификация совпадает с финальным определением.

\*\*\* Пол данного индивида подтвержден методами генетики.

рифугу 5418 R («Eppendorf», Германия) при 200 g в течение ~6 мин, промывали 100 мкл 0,2% TFA и элюировали 50 мкл раствора, содержащего 50% ацетонитрила в 0,05% TFA. Элюат высушивали на центрифужном вакуумном испарителе досуха и хранили до хромато-масс-спектрометрического анализа при  $-85^{\circ}\text{C}$ . Перед хромато-масс-спектрометрическим анализом пептиды растворяли либо в 30 мкл (для продуктов травления эмали в течение 4-х мин), либо в 15 мкл (для продуктов травления эмали в течение 10-ти мин) водного раствора, содержащего 2% ацетонитрила и 0,1% TFA.

**Хромато-масс-спектрометрический анализ пептидов.** Разделение пептидов проводили на хроматографической системе Ultimate 3000 Nano LC System («Thermo Fisher Scientific», США), сопряженной с масс-спектрометром Q Exactive Plus («Thermo Fisher Scientific», США), посредством наноэлектроспрейного источника («Thermo Fisher Scientific», США). На предколонку (100 мкм  $\times$  2 см, Reprosil-Pur C18-AQ 1,9  $\mu\text{m}$  («Dr. Maisch GmbH», Германия)) наносили 5 мкл обессоленного раствора пептидов и элюировали их на колонку (100 мкм  $\times$  50 см, Reprosil-Pur C18-AQ 1,9  $\mu\text{m}$  («Dr. Maisch GmbH», Германия)) линейным градиентом раствора Б (0,1% муравьиной кислоты (FA), 19,9% вода, 80% ацетонитрила) в А (0,1% FA) при скорости потока 440 нл/мин. Градиент: 3 $\rightarrow$ 35% Б за 55 мин; 35 $\rightarrow$ 55% Б за 5 мин; 55 $\rightarrow$ 99% Б за 1 мин. Перед каждой новой загрузкой колонку уравнивали при 3% раствора Б в А в течение 5 мин. Масс-спектрометрические данные сохраняли при автоматическом переключении между MS1 сканированием и вплоть до 5 MS/MS-сканирований (метод topN). Целевое значение для MS1-сканирования было выставлено  $3 \times 10^6$  в диапазоне 350–2000  $m/z$  с максимальным временем инжектирования ионов 50 мс и разрешением 70 000. Изолирование ионов-прекурсоров осуществляли при ширине окна 1,4  $m/z$  и фиксированной первой массе 100.0  $m/z$ . Ионы-прекурсоры фрагментировали методом высокоэнергетической диссоциации с нормализованной энергией столкновения 29 эВ. MS/MS-сканы сохраняли с разрешением 17 500 и при значении  $2 \times 10^5$  для целевых ионов с максимальным временем инъекции ионов 80 мс. Полученные масс-спектрометрические данные переданы в консорциум ProteomeXchange через репозиторий PRIDE с идентификатором массива данных PXD017965 [21].

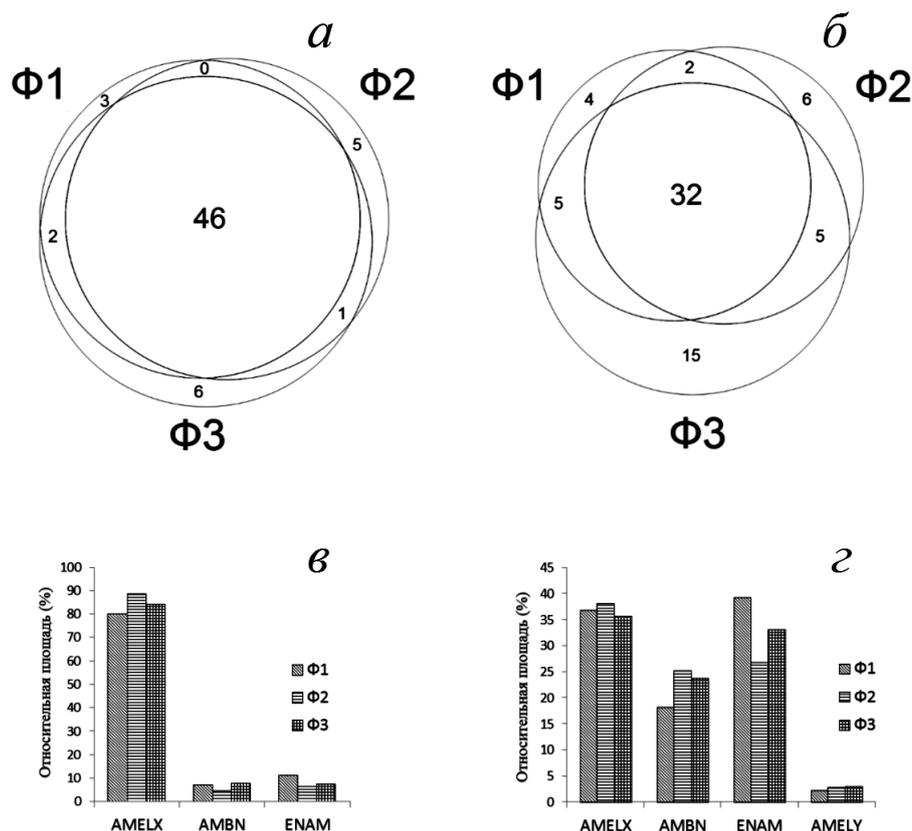
**Анализ хромато-масс-спектрометрических данных.** Анализ MS/MS-данных проводили при помощи компьютерной программы PEAKS Studio 8.0 build 20160908 [22]. Первичные структуры пептидов, генерируемые программой

PEAKS Studio, анализировали против базы данных белковых последовательностей UniProtKB/Swiss-Prot (03.2019) [6], содержащей 20 417 записей для таксона *Homo sapiens*, в которой изоформа 1 гена *AMELX* (Q99217-1) была заменена на изоформу 3 этого белка (Q99217-3), имеющую наибольшую степень гомологии с канонической изоформой белка, кодируемого геном *AMELX* (Q99218-2). Анализ проводили со следующими настройками: окисление Met, дезамидирование Asn/Gln и фосфорилирование Ser/Thr/Tyr – вариабельные модификации; специфичность протеазы не указывали. Допустимый уровень ложноположительных идентификаций (FDR) пептидов был установлен на уровне 0,01 и определялся путем корреляции массива MS/MS-данных с реверсной базой данных белковых последовательностей, которая генерировалась программой PEAKS Studio. Идентификацию пептидов осуществляли при допустимом начальном отклонении массы иона-прекурсора до 10 м.д. (миллионных долей) и допустимом отклонении массы фрагментов 0,05 Да. В финальный список идентифицированных белков включали только те из них, для которых было найдено не менее 2-х уникальных пептидов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день известно, что ген *AMELX* в результате альтернативного сплайсинга продуцирует три изоформы амелогенина, сиквенсы которых приведены в базе данных UniProtKB под идентификаторами Q99217-1, Q99217-2 и Q99217-3. Канонической аминокислотной последовательностью белка, кодируемого у человека геном *AMELX*, считается изоформа Q99217-1. Изоформа Q99217-2 отличается от канонической структуры отсутствием фрагмента 19–34, а изоформа Q99217-3 – вставкой пептида ENSHSQAINVDRTAL вместо 34-го аминокислотного остатка (E). Ген *AMELY* в результате альтернативного сплайсинга продуцирует две изоформы белка (идентификаторы UniProtKB Q99218-1 и Q99218-2). В качестве канонической структуры Y изоформы амелогенина принята последовательность Q99218-2, изоформа Q99218-1 отличается от нее отсутствием фрагмента (35–48), имеющего структуру NSHSQAINVDRIAL. Выравнивание наиболее близких друг другу аминокислотных последовательностей X (Q99217-3) и Y (Q99218-2) изоформ амелогенина приведено на рис. 1. Видно, что отличия между изоформами обусловлены заменой ~20 аминокислотных остатков, более-менее равномерно распределенных по сиквенсу белка.





**Рис. 2.** Результаты пептидомного анализа фракций  $\Phi 1$ – $\Phi 3$ , полученных от образцов 21 и 22. Распределение белков-предшественников идентифицированных пептидов во фракциях  $\Phi 1$ – $\Phi 3$ , полученных при последовательном травлении зубной эмали образцов 21 (*a*) и 22 (*b*) (цифры на диаграмме Венна означают количество идентифицированных белков-предшественников пептидов). Относительное содержание основных белков зубной эмали во фракциях  $\Phi 1$ – $\Phi 3$  образцов 21 (*в*) и 22 (*г*). По оси ординат отложена в % относительная площадь под пиками пептидов, уникальных для указанных белков во фракции, нормированная на общий ионный ток. AMELX – изоформ 3 амелогенина X изоформ; AMBN – амелобластин; ENAM – энамелин; AMELY – амелогенин Y изоформ

надлежавший современному мальчику 8,5 лет, также показал близкие результаты. Здесь необходимо отметить, что если для однозначного установления мужского пола достаточно выявить в пептидоме зубной эмали хотя бы один фрагмент, специфичный для Y изоформы амелогенина, то отсутствие таких пептидов в образце не обязательно свидетельствует о том, что этот образец принадлежал индивиду женского пола. Так, например, в образцах 5 и 9 не было выявлено ни одного фрагмента амелогенина, специфичного для Y изоформы этого белка. Однако общее количество идентифицированных пептидных фрагментов основных белков зубной эмали в этих образцах настолько мало, что фрагменты Y изоформы амелогенина, содержание которой в эмали зуба мужчин составляет ~10% от содержания ее X изоформы, могли быть не выявлены просто в силу их содержания в этих образцах ниже порога детекции. Что касается результатов пептидомного анализа постоянных зубов (образцы 16–23, табл. 2), то первое, что

бросается в глаза – количество идентифицированных в них пептидов зависит не столько от археологического возраста образцов, сколько от степени их сохранности. Так, например, в образце 16, археологический возраст которого насчитывает не менее 9,5 тыс. лет, было идентифицировано примерно столько же пептидов, сколько и в образце 20 (археологический возраст не более 1300 лет), и несколько меньше, чем в образце 23 (археологический возраст немногим более 200 лет).

В недавно вышедшей работе американских исследователей для случаев идентификации малого числа пептидных фрагментов X изоформы амелогенина и при отсутствии фрагментов Y изоформы этого белка был предложен вероятностный метод оценки достоверности определения женского пола, как функции логарифма сигнала AMELX\_HUMAN ( $p < 0,0001$ ) с использованием логистической регрессии [23]. В нашем эксперименте был предложен другой, более простой вариант. Из табл. 2 можно увидеть, что

Таблица 2. Основные белки зубной эмали, идентифицированные в образцах зубов при травлении эмали в течение 4 мин

Образцы	Амелобластин (Q9NP70)			Энамелин (Q9NRM1)			Амелогенин X (Q99217-3)			Амелогенин Y (Q99218)		
	площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты		площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты		площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты		площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты	
		всего	уникальные									
1	70,01	57	57	4,15	35	35	25,78	51	31	0,06	22	2
2	81,51	42	42	4,93	25	25	13,27	42	24	0,29	20	2
3	85,78	51	51	4,02	33	33	9,97	65	38	0,23	30	3
4	59,85	71	71	16,49	48	48	23,05	85	56	0,61	36	7
5	7,21	21	21	1,54	18	18	91,25	17	17	–	–	–
6	33,69	51	51	35,03	69	69	29,74	78	52	1,54	32	6
7	41,41	52	52	5,64	43	43	49,44	69	42	3,51	33	6
8	66,69	36	36	9,68	35	35	21,31	43	24	2,32	21	2
9	37,00	12	12	1,80	11	11	61,20	9	9	–	–	–
10	20,65	30	30	29,93	56	56	46,72	54	33	2,69	28	7
11	2,77	36	36	3,02	52	52	94,21	61	61	–	–	–
12	11,99	33	33	10,25	26	26	77,77	69	69	–	–	–
16	36,02	74	74	48,41	100	100	15,45	78	39	0,11	43	4
17	27,02	50	50	21,66	61	61	44,95	74	34	6,37	48	8
18	0,96	7	7	0,94	5	5	98,10	34	34	–	–	–
19	51,11	26	26	25,71	28	28	23,07	31	18	0,12	15	2
20	80,85	46	46	11,87	26	26	6,85	73	27	0,43	49	3
21	7,36	146	146	11,43	151	151	81,21	181	181	–	–	–
22	18,81	185	185	40,67	156	156	38,22	241	170	2,30	124	53
23	26,41	178	178	35,87	159	159	35,47	134	84	2,25	65	15

\* При расчете нормированной на общий ионный ток площади учитываются только пептиды, уникальные для данного белка.

для тех образцов зубов индивидов мужского пола, для которых было идентифицировано не менее 31-го пептидного фрагмента X изоформы амелогенина, также было идентифицировано не менее 2-х уникальных фрагментов Y изоформы этого белка. При увеличении длительности травления зубной эмали в 2,5 раза и последующего хромато-масс-спектрометрического анализа третьей части выделенных из зубной эмали пептидов количество идентифицируемых фрагментов X изоформы амелогенина превысило число 31, как минимум в 2 раза, даже в образцах молочных и плохо сохранившихся постоянных зубов (табл. 3). Вместе с этим минимальное количество уникальных для Y изоформы амелогенина пептидов, идентифицированных нами в образцах зубов индивидов мужского пола, по-

высилось от 2-х до 7-ми. В результате этих простых модификаций метода выделения пептидов из зубной эмали образцы 5 и 9, для которых в предыдущем варианте метода пробоподготовки не было идентифицировано ни одного уникального для Y изоформы амелогенина фрагмента, были однозначно определены, как принадлежащие индивидам мужского пола, а принадлежность образца 18 индивиду женского пола была подтверждена. Таким образом, при определении пола человеческих останков по результатам пептидомного анализа зубной эмали важным условием применимости этого метода является степень сохранности образца. Критерием приемлемой для использования этого метода идентификации пола степени сохранности зубной эмали мы предлагаем считать идентифика-

Таблица 3. Основные белки зубной эмали, идентифицированные в образцах зубов при травлении эмали в течение 10 мин

Образцы	Амелобластин (Q9NP70)			Энамелин (Q9NRM1)			Амелогенин X (Q99217-3)			Амелогенин Y (Q99218)		
	площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты		площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты		площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты		площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты	
		всего	уникальные									
1	25,40	342	342	3,49	135	135	66,29	124	59	4,82	79	14
2	63,14	288	288	18,47	169	169	15,30	126	55	3,09	84	13
3	10,29	102	102	7,88	67	67	78,62	56	25	3,22	40	9
4	56,49	370	370	24,56	295	295	9,29	208	108	9,66	133	33
5	57,29	183	183	22,57	128	128	19,84	100	45	0,30	65	10
6	66,29	228	227	28,51	166	166	5,12	139	73	0,07	74	9
7	54,11	430	430	34,02	368	368	6,46	224	134	5,41	124	34
8	52,51	144	144	7,23	79	79	37,25	69	26	3,02	50	7
9	65,08	316	316	19,58	167	167	10,93	122	49	4,40	91	18
10	53,85	371	370	31,79	265	265	9,23	151	63	5,13	106	18
11	20,18	327	325	8,28	205	205	71,55	175	175	–	–	–
12	10,84	416	416	9,55	320	320	79,61	273	273	–	–	–
16	42,19	410	410	32,41	325	325	22,29	244	141	3,11	152	49
17	37,82	199	199	52,22	188	188	9,63	96	52	0,32	51	7
18	6,45	35	35	5,43	39	39	88,12	78	78	–	–	–

\* При расчете нормированной на общий ионный ток площади учитываются только пептиды, уникальные для данного белка.

цию в нем не менее 30 пептидных фрагментов X изоформы амелогенина. При идентификации в образце <30 пептидных фрагментов X изоформы амелогенина и отсутствии в нем специфических фрагментов Y изоформы этого белка предлагаем считать качество образца неудовлетворительным для использования этого метода для определения пола. Еще одно важное преимущество предложенного нами метода пробоподготовки – он менее деструктивен, чем использованный американскими коллегами. Их методика требовала измельчение, т.е. полное разрушение коронки зуба [23], в то время как в ходе нашего эксперимента форма и размер коронки визуально не меняются, что сохраняет объект для последующих научных исследований. Кроме того, анализ аминокислотных последовательностей идентифицированных нами пептидов говорит о том, что использование трипсина для гидролиза пептидно-белковой материи, выделяемой из зубной эмали, явно избыточно и не позволяет идентифицировать в образцах дополнительное количество пептидов, специфичных для Y изо-

формы амелогенина. Более того, трипсин гидролизует C-концевой фрагмент Y изоформы амелогенина до коротких пептидов, которые не могут быть идентифицированы в дальнейшем тандемной масс-спектрометрией.

В работе Stewart et al. [24] авторы предложили использовать для определения пола человеческих останков пептидные фрагменты AMELX-(44–52) (SIRPPYPSY) и AMELY-(58–64) (SM<sub>ox</sub>IRPPY), выделяемые из зубной эмали в результате ее 2-х минутного травления. Наличие или отсутствие в образце пептида AMELY-(58–64) предлагалось использовать в качестве однозначного указания на пол. Авторы использовали в своей работе образцы постоянных зубов от 13 человеческих останков взрослых индивидов. Анализ полученных нами массивов масс-спектрометрических данных показал, что далеко не во всех образцах обнаруживаются эти пептиды даже на уровне экстрагированных ионных хроматограмм. В табл. S3 в Приложении приведены аминокислотные последовательности уникальных для Y изоформы амелогенина

пептидных фрагментов, которые были идентифицированы в образцах молочных зубов 1–10. При всем разнообразии структур (табл. S3 в Приложении), только две из них, а именно SM(+15.99)IRPPYS и IRPPYSS(+79.97), содержащие фосфорилированный остаток Ser66, были идентифицированы во всех 10 образцах, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных кандидатов в «маркеры» пола при разработке метода таргетного анализа продуктов травления зубной эмали для определения пола ископаемых останков человека. Интересно, что если пептид SM(+15.99)IRPPYS был идентифицирован также и в эмали постоянных зубов, то пептидные фрагменты Y изоформы амелогенина, содержащие фосфорилированный остаток Ser66, были идентифицированы нами только в молочных зубах. Можно предположить, что фосфорилирование этого остатка Ser имеет функциональное значение при формировании эмали именно в молочных зубах.

Применимость таргетного анализа этих пептидов для идентификации пола человеческих останков требует дополнительной проверки на более обширной выборке образцов.

В результате настоящей работы нами предложен простой и воспроизводимый метод пробоподготовки, хромато-масс-спектрометрического и биоинформатического анализа пептидома зубной эмали, позволяющих надежно и быстро определять пол ископаемых останков в широком диапазоне их археологического и биологического возраста, не подвергая существенному разрушению анализируемый образец. Суть предлагаемого метода заключается в травлении участка зубной эмали 1,5 М HCl в течение 10 мин, обессоливании полученных продуктов травления на SDB-RPS StageTips микроколон-

ках и анализа 1/3 части обессоленного образца методом tandemной хромато-масс-спектрометрии. При условии идентификации в образце не менее 30 пептидных фрагментов X изоформы амелогенина пол образца определяется по наличию или отсутствию в списке идентифицированных пептидов специфических пептидных фрагментов Y изоформы амелогенина. Идентифицированы 2 пептидных фрагмента Y изоформы амелогенина, одна из которых (SM(+15.99)IRPPYS) обнаружена во всех без исключения образцах мужского пола, а вторая (IRPPYSS(+79.97), содержащая фосфорилированный остаток Ser66, встречается только в эмали молочных зубов. Можно предположить, что фосфорилирование этого остатка Ser имеет функциональное значение при формировании эмали именно в зубах молочной генерации.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-29-04125 офм), а также при частичном финансировании Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 20-39-70020).

**Благодарности.** Авторы приносят благодарность исследовательским группам ARCHCAUCASUS (основной исследователь Svend Hansen) и PALEORIDER (основной исследователь Wolfgang Haak) за предоставление данных об идентификации пола образца 22 методами генетического анализа.

**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

- Rose, J. C., Anton, S. C., Aufderheide, A. C., Buikstra, J. E., Eisenberg, L., Gregg, J. B., Hunt, E. E., Neiburger, E. J., and Rothschild B. (1991) *Skeletal database committee recommendations*, Paleopathology association, Detroit.
- Ubelaker, D. H. (1978) *Human skeletal remains: excavation, analysis, interpretation*, Aldine Publishing Co. Inc., Chicago, IL.
- Алексеев В. П. (1966) *Остеометрия: методика антропологических исследований*, Наука, Москва.
- Daskalaki, E., Anderung, C., Humphrey, L., and Gotherstrom, A. (2011) Further developments in molecular sex assignment: a blind test of 18th and 19th century human skeletons, *J. Archaeol. Sci.*, **38**, 1326-1330, doi: 10.1016/j.jas.2011.01.009.
- Goncalves, D., Campanacho, V., and Cardoso, H. F. (2011) Reliability of the lateral angle of the internal auditory canal for sex determination of subadult skeletal remains, *J. Forensic Leg. Med.*, **18**, 121-124, doi: 10.1016/j.jflm.2011.01.008.
- Kazzazi, S. M., and Kranioti, E. F. (2017) A novel method for sex estimation using 3D computed tomography models of tooth roots: a volumetric analysis, *Arch. Oral Biol.*, **83**, 202-208, doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.07.024.
- Molleson, T., Cruse, K., and Mays, S. (1998) Some sexually dimorphic features of the human juvenile skull and their value in sex determination in immature skeletal remains, *J. Archaeol. Sci.*, **25**, 719-728, doi: 10.1006/jasc.1997.0215.
- Skoglund, P., Stora, J., Gotherstrom, A., and Jakobsson, M. (2013) Accurate sex identification of ancient human remains using DNA shotgun sequencing, *J. Archaeol. Sci.*, **40**, 4477-4482, doi: 10.1016/j.jas.2013.07.004.
- Blake, K. A. S. (2011) Differences in subadult pubic body widths and the implication for sex determination, *Am. J. Phys. Anthropol.*, **144**, 90-91.
- Khamis, M. F., Taylor, J. A., Malik, S. N., and Townsend, G. C. (2014) Odontometric sex variation in Malaysians with application to sex prediction, *Forensic Sci. Int.*, **234**, 183 e1-e7, doi: 10.1016/j.forsciint.2013.09.019.

11. Viciano, J., Aleman, I., D'Anastasio, R., Capasso, L., and Botella, M. C. (2011) Odontometric sex discrimination in the Herculaneum sample (79 AD, Naples, Italy), with application to juveniles, *Am. J. Phys. Anthropol.*, **145**, 97-106, doi: 10.1002/ajpa.21471.
12. Salido, E. C., Yen, P. H., Koprivnikar, K., Yu, L. C., and Shapiro, L. J. (1992) The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes, *Am. J. Hum. Genet.*, **50**, 303-316.
13. Wood, R. E., Higham, T. F. G., Buzilova, A., Suvorov, A., Heinemeier, J., and Olsen, J. (2013) Freshwater radiocarbon reservoir effects at the burial ground of Minino, north-west Russia, *Radiocarbon*, **55**, 163-177, doi: 10.2458/azu\_js\_rc.v55i1.16448.
14. Шнайдер С. В., Курбанов Р. Н., Алишер кызы С., Ригго, С., Шаньгина М. В., Кривошапкин А. И. (2018) Результаты предварительного изучения памятников Кайло и Куба-Сенгир (Восточный Прикаспий, Туркменистан), *Проблемы археологии, этнографии, антропологии Сибири и сопредельных территорий*, **24**, 184-189, doi: 10.17746/2658-6193.2018.24.184-189.
15. Албегова З. Х., Верещинский-Бабайлов Л. И. (2010) Раннесредневековый могильник Мамисондон. Результаты археологических исследований 2007–2008 гг. в зоне строительства водохранилища Зарамагских ГЭС, *Материалы охранных археологических исследований*, **11**, Таус, Москва, с 492.
16. De Menezes Oliveira, M. A., Torres, C. P., Gomes-Silva, J. M., Chinelatti, M. A., De Menezes, F. C., Palma-Dibb, R. G., and Borsatto, M. C. (2010) Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth, *Microsci. Res. Tech.*, **73**, 572-577.
17. Wilson, P. R., and Beynon, A. D. (1989) Mineralization differences between human deciduous and permanent enamel measured by quantitative microradiography, *Arch. Oral Biol.*, **34**, 85-88, doi: 10.1016/0003-9969(89)90130-1.
18. Бужилова А. П., Потрахов Н. Н., Потрахов Е. Н., Грязнов А. Ю. (2013) Анализ маркеров стресса методом микрофокусной рентгенографии (по антропологическим материалам эпох каменного века), *Биотехносфера*, **2**, 46-51.
19. Хохлов А. Н., Бужилова А. П. (2010) *Братские могилы эпохи Наполеоновских войн в Калининграде*, ИА РАН, Москва.
20. Stewart, N. A., Molina, G. F., Issa, J. P. M., Yates, N. A., Sosovicka, M., Vieira, A. R., Line, S. R. P., Montgomery, J., and Gerlach, R. F. (2016) The identification of peptides by nanoLC-MS/MS from human surface tooth enamel following a simple acid etch extraction, *RSC Adv.*, **6**, 61673-61679, doi: 10.1039/c6ra05120k.
21. Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D. J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., Perez, E., Uszkoreit, J., Pfeuffer, J., Sachsenberg, T., Yilmaz, S., Tiwary, S., Cox, J., Audain, E., Walzer, M., Jarnuczak, A. F., Ternent, T., Brazma, A., Vizcaíno, J. A. (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D442-D450, doi: 10.1093/nar/gky1106.
22. Ma, B., Zhang, K., Hendrie, C., Liang, C., Li, M., Doherty-Kirby, A., and Lajoie, G. (2003) PEAKS: powerful software for peptide *de novo* sequencing by tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 2337-2342, doi: 10.1002/rcm.1196.
23. Parker, G. J., Yip, J. M., Eerkens, J. W., Salemi, M., Durbin-Johnson, B., Kiesow, C., Haas, R., Buikstra, J. E., Klaus, H., Regan, L. A., Rocke, D. M., and Phinney, B. S. (2019) Sex estimation using sexually dimorphic amelogenin protein fragments in human enamel, *J. Archaeol. Sci.*, **101**, 169-180, doi: 10.1016/j.jas.2018.08.011.
24. Stewart, N. A., Gerlach, R. F., Gowland, R. L., Gron, K. J., and Montgomery, J. (2017) Sex determination of human remains from peptides in tooth enamel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 13649-13654, doi: 10.1073/pnas.1714926115.

## OPTIMIZATION OF THE METHOD OF HUMAN SEX IDENTIFICATION BY PEPTIDOMIC ANALYSIS OF TEETH ENAMEL OF DIFFERENT BIOLOGICAL GENERATION, ARCHAEOLOGICAL AGE AND TAPHONOMIC PRESERVATION OF TEETH\*

R. H. Ziganshin<sup>1\*\*</sup>, N. Ya. Berezina<sup>2</sup>, P. L. Alexandrov<sup>1</sup>, V. V. Ryabinin<sup>1</sup>, and A. P. Buzhilova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry of the Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia; E-mail: rustam.ziganshin@gmail.com*

<sup>2</sup> *Anuchin Research Institute and Museum of Anthropology of Lomonosov Moscow State University, 125009 Moscow, Russia*

Received February 17, 2020

Revised March 16, 2020

Accepted March 19, 2020

Determination of biological sex to human remains is a fundamental requirement in anthropological, archeological, and forensic anthropological studies. Sex determination based on morphological criteria is significantly limited in the cases of juvenile remains and adult skeletons in a poor state of preservation. Regular attempts have been made to use alternative techniques to resolve this issue, including analysis of tooth enamel peptides by liquid chromatography/mass spectrometry. Optimization of this method involving acid etching of tooth enamel for 10 min followed by desalting of the products of etching on SDB-RPS StageTips microcolumns and analysis of desalted sample (1/3) by liquid chromatography/mass spectrometry allowed reliable sex determination to fossil remains within a wide range of archeological and biological ages without destructing analyzed teeth. Increasing the duration of enamel etching ensured a 2 to 3-fold increase in the total number of identified peptides and, more importantly, in the number of identified fragments of amelogenin Y isoform specific for male teeth, which facilitated reliable sex determination of fossil remains. The suggested technique was tested with 8 permanent and 15 deciduous teeth of different archeological age and different degree of preservation. Two amelogenin Y-specific peptide sequences were identified. One of these peptides [SM(+15.99)IRPPYS] was found in all male-derived samples without exception; the other peptide [IRP-PYSS(+79.97)], which contained phosphorylated Ser66 residue, was found only in the enamel from deciduous teeth, which suggests that phosphorylation of Ser66 plays a role in the enamel formation in deciduous teeth.

**Keywords:** tooth enamel, sex determination, amelogenins, peptides, liquid chromatography–mass spectrometry

УДК 57.013:577.11

## МЕЛАНИН ЛИШАЙНИКОВ *Cetraria islandica* И *Pseudevernia furfuracea*: ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

© 2020 А.Е. Рассабина<sup>1</sup>, О.П. Гурьянов<sup>1</sup>, Р.П. Бекетт<sup>2</sup>, Ф.В. Минибаева<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр  
«Казанский научный центр Российской академии наук», 420111 Казань, Россия;  
электронная почта: minibayeva@kibb.knc.ru

<sup>2</sup> School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal, 3209 Scottsville, South Africa

<sup>3</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008 Казань, Россия

Поступила в редакцию 20.02.2020

После доработки 27.03.2020

Принята к публикации 30.03.2020

Лишайники, симбиотические фотосинтезирующие организмы, таллом которых образован грибом и водорослью/цианобактерией, обладают высокой стрессовой устойчивостью. Одним из компонентов эффективной защиты лишайников от действия неблагоприятных факторов среды является наличие уникальных метаболитов, в частности высокомолекулярных темных пигментов – меланинов. Химический состав и структурная организация меланинов лишайников остаются малоизученными. В настоящей работе проанализированы элементный состав, основные функциональные группы и физико-химические свойства меланина, экстрагированного из лишайников *Cetraria islandica* и *Pseudevernia furfuracea*. По соотношению C/N установлено, что данный пигмент относится к типу алломеланина. В структуре меланина выявлены функциональные группы, обеспечивающие его фотопротекторные и антиоксидантные свойства. Предполагается, что синтез меланина является одним из ключевых защитных механизмов, обеспечивающих выживание лишайников в условиях УФ-излучения.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** меланин, лишайник, ИК-спектроскопия, фотопротекторные свойства, антиоксидантная активность.

**DOI:** 10.31857/S0320972520050115

### ВВЕДЕНИЕ

Лишайники являются своеобразной группой симбиотических фотосинтезирующих организмов, таллом которых образован двумя основными организмами – грибом (микобионт) и водорослью/цианобактерией (фотобионт). Взаимодействие фотобионта и микобионта в лишайниках обуславливает образование в них разнообразных вторичных метаболитов, таких как лишайниковые кислоты (в т.ч. усниновая и гирофоровая кислоты), катехины и полисахариды (в т.ч. лихенин) и другие. Синтез вторичных метаболитов в слоевищах лишайников является сложным процессом и зависит как от таксономической принадлежности лишайнизированного гриба, так и от факторов окружающей среды [1]. Такими факторами являются высота местности, колебания температуры, сезон года, а также гиперинсоляция – действие света высокой интен-

сивности и ультрафиолетового (УФ) облучения [2]. Пигментация верхней стороны слоевища лишайников действует как первая линия защиты для предотвращения УФ-индуцированного внутриклеточного повреждения. Особую роль в защите от светового стресса играют меланины.

Меланин представляет собой высокополимерный пигмент, содержащий фенольные и индольные группы. Меланин придает черную, коричневую, красную или рыжую окраску тканям различных живых организмов, включая человека. В зависимости от наличия тех или иных промежуточных метаболитов различают следующие основные типы меланинов: эумеланин, феомеланин, 1,8-дигидрокси-нафталин (DHN)-меланин, алломеланин, нейромеланин, пиомеланин и сепия меланин [3]. Такое многообразие обеспечивается различиями в химическом строении и элементном составе. Характерной особенностью алломеланина является то, что он практически не содержит азота и поэтому представляет собой полимер простых фенолов. Эумеланин содержит связанный азот и представляет собой полимер фенольных и индольных веществ [3].

Принятые сокращения: DHN – 1,8-дигидрокси-нафталин; DPPH – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил; УФ – ультрафиолет.

\* Адресат для корреспонденции.

Известны два основных метаболических пути биосинтеза меланинов – шикиматный и ацетатно-малонатный [4]. Субстратом для синтеза эумеланина является аминокислота тирозин, которая с помощью тирозиназы превращается в L-3,4-диоксифенилаланин (L-DOPA), а затем в дофахинон (DOPA-quinone). Последующее окисление дофахинона приводит к получению различных мономеров: 5,6-дигидроксииндол-2-карбоновой кислоты (DHICA) и 5,6-дигидроксииндола (DHI). В результате полимеризации данных мономеров образуется эумеланин. Синтез алломеланина осуществляется преимущественно по ацетатно-малонатному пути, однако алломеланин содержит в своем составе мономер ацетат бензохинона, синтезированный по шикиматному пути [4, 5]. Сначала ацетил-КоА под воздействием фермента поликетидсинтазы превращается в 1,3,6,8-тетрагидроксиафталин, а затем в результате активности различных ферментов – в DHN. На данном этапе происходит полимеризация DHN-меланина и ацетат бензохинона с образованием алломеланина.

Ранее нами было проведено количественное определение меланинов *in vivo* путем измерения индекса меланизации (Browning reflectance index, BRI) таллома с использованием интегрирующей сферы и отражающего спектрометра. Было обнаружено, что лишайник *Cetraria islandica* характеризуется более высоким индексом меланизации (10,1) по сравнению с другими меланизируемыми лишайниками (4,4 – для *Lobaria pulmonaria* и 4,8 – для *Crocodia aurata*) [6]. До настоящего времени тип и физико-химические свойства меланина *C. islandica* не были изучены.

Протекторные свойства меланинов, особенно при действии на организмы света в диапазоне УФ и света высокой интенсивности, вызывают большой интерес исследователей к структуре этих полимеров [7, 8]. В настоящее время появляется информация о защитной роли меланинов в талломах лишайников при световом стрессе. Имеются сведения о том, что меланин, содержащийся в верхнем коровом слое лишайника, защищает фотобионт от разрушения при действии света высокой интенсивности [2]. Кроме того, меланины лишайников могут образовывать комплексы с различными металлами и полимерами, например хитином, который является компонентом клеточной стенки микобионта [9]. Показано, что в лишайнике *Trapelia involuta* присутствует эумеланин, который способен образовывать комплексы с ураном [10], а лишайник *Pseudephebe pubescens* способен накапливать целый ряд тяжелых металлов благодаря активным парамагнитным центрам меланина и

выживать в условиях интенсивной УФ радиации [9]. В отличие от меланинов человека [11, 12], грибов [13, 14], бактерий [15] и дрожжей [16], структура и физико-химические свойства меланинов лишайников изучены недостаточно. Морфологическая комплексность таллома лишайников, многообразие грибных и фотосинтезирующих симбионтов, переключение путей биосинтеза метаболитов в зависимости условий окружающей среды – все это обуславливает сложность изучения свойств меланинов лишайников. Настоящая работа посвящена анализу элементного состава, наличия функциональных групп, свето-поглощательной способности и антиоксидантной активности меланина лишайников *C. islandica* и *Pseudevernia furfuracea*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Выделение меланина.** В качестве объекта исследований использовали лишайники *C. islandica* и *P. furfuracea*, собранные в Айшинском лесничестве в окрестностях г. Казани и в окрестностях г. Ос, Норвегия. Таллом лишайников очищали от загрязнений и высушивали при температуре 40 °С в течение 10 мин. Навеску лишайника (4 г) измельчали в ступке до порошкообразного состояния с добавлением жидкого азота. Полученный порошок переносили в пробирку и добавляли 50 мл 2 М NaOH, pH 10,5. Растворимость в концентрированных растворах щелочей, а не в органических растворителях является одним из критериев отнесения пигментов к меланинам [17]. В предварительных экспериментах было установлено, что меланины не экстрагировались при добавлении воды, этилового спирта, ацетона и хлороформа. После 24-часовой инкубации смесь фильтровали, а затем центрифугировали («Hermle Z 36НК», Германия) при 15 000 g в течение 10 мин. Супернатант подкисляли добавлением 2 М HCl до pH 2,5, инкубировали 12 ч при комнатной температуре и затем повторно центрифугировали при 15 000 g в течение 10 мин. Полученный осадок промывали дистиллированной водой и последовательно очищали органическими растворителями (хлороформ, этилацетат и ацетон), а затем высушивали в сушильном шкафу при температуре 40 °С. Очищенный меланин представлял собой темно-коричневый порошок без посторонних включений. Выход продукта составлял ~10 % от теоретически возможного.

**Качественные реакции на меланин.** Для проведения качественных реакций был приготовлен 0,1%-ный раствор меланинов, выделенных из лишайников. К навеске меланина (0,001 г)

добавляли 1 мл дистиллированной воды и 50 мкл раствора  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Проводили три качественные реакции с добавлением к раствору меланина 10%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,5 М  $\text{KMnO}_4$  и 1%  $\text{FeCl}_3$  в соотношении 1 : 1 [18].

**Элементный анализ меланина.** Элементный состав меланинов (С, N, H, S) определяли с помощью анализатора EuroEA 3028-НТ-ОМ («Eurovector SpA», Италия) путем сжигания пробы в присутствии окислителя в токе инертного газа. Содержание металлов (металлы I, II и III групп) и неметаллов (P, S и Cl) оценено при помощи рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) [10] на энергодисперсионном флуоресцентном рентгеновском спектрометре EDX-800HS2 («Shimadzu», Япония). Для проведения количественных измерений и оценки полученных данных использовали программное обеспечение Callidus 4.1.

**ИК-спектроскопия.** Основные функциональные группы были проанализированы методом ИК-спектроскопии [10] с использованием спектрофотометра IR-Affinity1 («Shimadzu», Япония) в рабочем диапазоне 400–700  $\text{см}^{-1}$ . Образец готовили методом прессования меланина с KBr. Анализ ИК-спектров меланинов осуществляли с помощью программного обеспечения OriginPro 8 и базы данных AIST:Spectral Database for Organic Compounds, SDBS.

**УФ-спектроскопия.** Спектры поглощения щелочного раствора меланина (25 мкг/мл в 0,1 М NaOH) регистрировали в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 2 мм на спектрофотометре UV-1900 («Shimadzu», Япония) в УФ и видимом диапазоне спектра (200–700 нм). На основании экспериментальных данных рассчитывали коэффициент цветности  $E_{465/665}$  [12]. Для анализа полученных данных использовалось программное обеспечение UVProbe 2.70 [17].

**Антиоксидантная активность.** Антиоксидантная активность была измерена с использованием радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида («Sigma-Aldrich», Германия) (DPPH) [19, 20]. Меланин различной концентрации (0,5–3 мг/мл) растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO), затем 10 мкл полученного раствора добавляли к 1 мл 0,004% раствора DPPH в этаноле. Образцы

тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин, после чего пурпурно-синяя окраска раствора менялась на малиновую. Поглощение раствора регистрировали спектрофотометрически («Shimadzu», Япония) при 517 нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 2 мм. В качестве стандартного соединения использовали галловую кислоту («Диаэм», Россия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Качественные реакции показали, что щелочные растворы меланинов, экстрагированных из лишайников *C. islandica* и *P. furfuracea*, обесцвечивались в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а в присутствии  $\text{KMnO}_4$  изменяли окраску с коричневой на зеленую с последующим выпадением осадка (данные не представлены). Добавление  $\text{FeCl}_3$  приводило к выпадению осадка, который растворялся в присутствии избытка  $\text{FeCl}_3$  (данные не представлены). Такое поведение исследуемых пигментов характерно для меланинов и свидетельствует о присутствии в их структуре хиноидных и фенольных компонентов [4, 21, 22].

Анализ элементного состава показал, что меланины в лишайниках *C. islandica* и *P. furfuracea* содержат в среднем 42% С, 6% Н и <2% N (табл. 1). Низкое содержание N и соотношение С/N равное 34 и 35 для *C. islandica* и *P. furfuracea* соответственно указывает на то, что данные пигменты относятся к типу алломеланин.

Нами установлено, что исследуемые меланины лишайников содержат в небольшом количестве S, K и Fe. Такие элементы, как Na и Ca, отсутствуют в меланине *C. islandica*, Al и Cu отсутствуют в меланине *P. furfuracea*. Наличие металла Zn не было обнаружено в меланинах обоих лишайников (табл. 1). Ранее [9, 17] было показано, что меланины лишайников *Umbilicaria africana*, *P. Pubescens* и *Usnea sphacelata* также имеют в своем составе данные элементы.

Результаты ИК-спектроскопии свидетельствуют о наличии разнообразных структурных групп в составе алломеланина. Так, в алломеланине, выделенном из *C. islandica*, наблюдается

**Таблица 1.** Процентное содержание С, Н, N и прочих элементов в меланинах лишайников *C. islandica* и *P. furfuracea*

Вид лишайника	Элементный состав, масс. %				Элементы, обнаруженные методом РФА, %										
	С	Н	N	С/N	Na	Al	Si	S	Cl	K	Ca	Fe	Cu	Zn	
<i>C. islandica</i>	41,0	6,5	1,3	35,2	–	2,7	2,7	1,0	85,7	1,9	0,1	4,1	2,0	–	
<i>P. furfuracea</i>	42,1	6,3	1,2	34,4	18,1	–	0,3	3,0	76,5	0,7	0,8	0,6	–	–	

заметная интенсивность пика в области  $1020\text{ см}^{-1}$  (рис. 1, *a* и *б*), который относится к валентным колебаниям (C–O–C)-групп [23, 24].

Напротив, в области  $1500\text{--}1630\text{ см}^{-1}$  наблюдается небольшая интенсивность пиков, это может быть связано с низким содержанием ароматических групп (C=C, C=N, C=O) либо с отсутствием (N–H) деформационных колебаний в алломеланине. Поглощения при  $1720\text{ см}^{-1}$  обнаружено не было, что может свидетельствовать об отсутствии свободных карбоксильных групп [23]. В области  $2340\text{--}2360\text{ см}^{-1}$  наблюдались валентные колебания (C–C) тройных связей, а в области  $2880\text{--}2940\text{ см}^{-1}$  – валентные колебания алифатических (C–H)-групп (рис. 1, *a* и *б*). В обоих образцах меланинов присутствует широкая полоса в области  $3350\text{ см}^{-1}$ , которая является характеристикой меланина, связанная с валентными колебаниями OH-групп [23, 24].

Анализ электронных спектров меланинов лишайников с помощью УФ-спектроскопии выявил плавное снижение поглощения с увеличением длины волны в области  $240\text{--}700\text{ нм}$  (рис. 2).

Одномерная характеристика УФ-видимого поглощения меланинов по параметру  $E_{465}/E_{650}$ ,

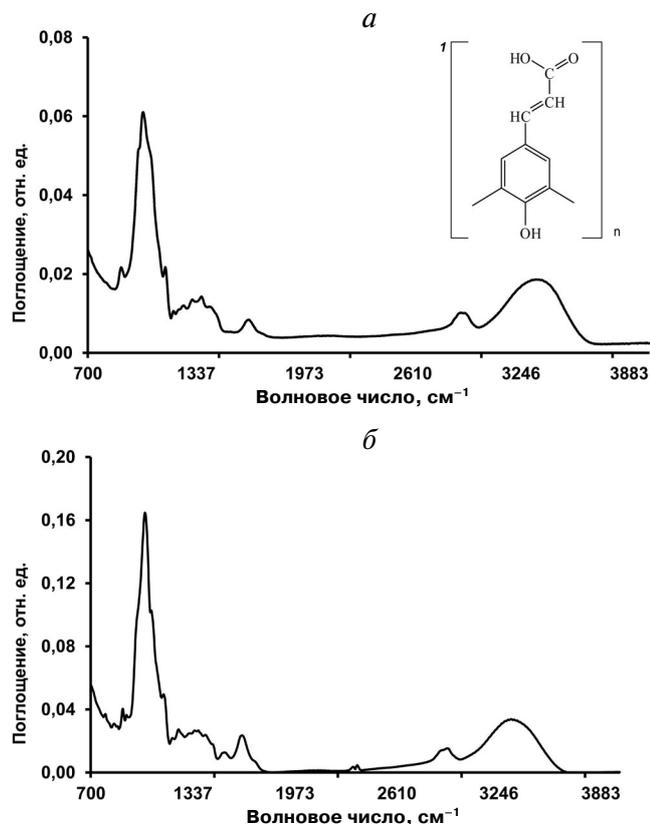


Рис. 1. ИК-спектры меланинов, выделенных из лишайников *C. islandica* (*a*) и *P. furfuracea* (*б*). Во вставке показана химическая структура мономера алломеланина (*I*)

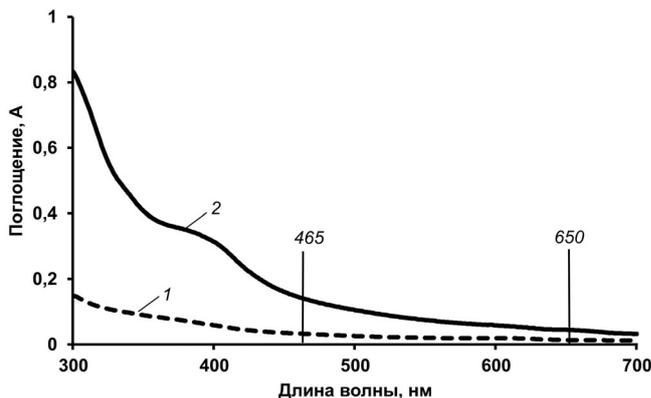


Рис. 2. УФ-спектры поглощения меланинов, выделенных из *C. islandica* (*1*) и *P. furfuracea* (*2*). Вертикальными линиями обозначены длины волн 465 и 650 нм

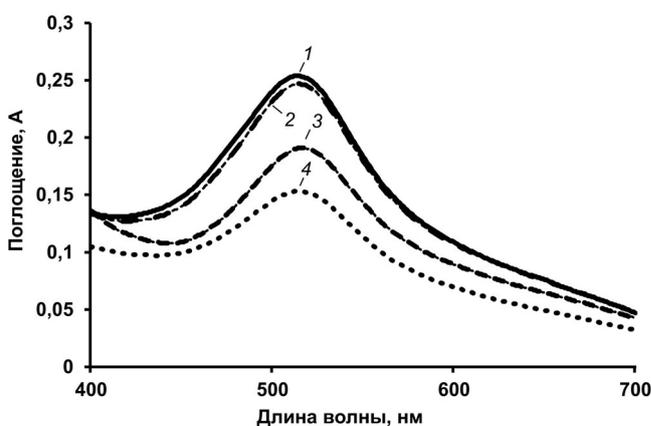


Рис. 3. Спектр поглощения спиртового раствора стабильного радикала DPPH (*1*) после 30-минутного инкубирования DPPH с меланинами, выделенными из *P. furfuracea* (*2*) и *C. islandica* (*3*), галловая кислота (*4*)

свидетельствующему о соотношении алифатических и ароматических структур [7, 21, 25], составила 3,42 – для меланина из *P. furfuracea* и 2,28 – для меланина из *C. islandica*.

Анализ антиоксидантной активности с использованием радикала DPPH показал, что коэффициент  $IC_{50}$  составил 405 и 456 мкг/мл для меланинов из *C. islandica* и *P. furfuracea* соответственно (рис 3). Для сравнения  $IC_{50}$  для аскорбиновой кислоты составил 34 мкг/мл, а для галловой кислоты 128 мкг/мл. Данные указывают на то, что меланины проявляют более низкую антиоксидантную активность по сравнению с кислотами органического происхождения.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Среди разнообразных вторичных метаболитов лишайников традиционно большое внима-

ние уделяется изучению свойств и активности уникальных соединений, в частности лишайниковых веществ, например, париедина, атранорина, гирофоровой и усниновой кислот, полисахаридов, в т.ч. лишенина [26]. Достаточно подробно исследован химический состав многих метаболитов лишайника *C. islandica* [27]. Информация о структуре, физико-химических свойствах и особенностях меланинов лишайников крайне ограничена. Известно, что меланины имеют сложную гетероатомную структуру и способны проявлять антиоксидантные, сорбционные, фотопротекторные и другие свойства [17]. В настоящей работе проанализирован элементный состав, изучены структурные группы и физико-химические свойства меланинов, экстрагированных из лишайников *C. islandica* и *P. furfuracea*. Эти физико-химические свойства способствуют проявлению защитных свойств пигмента.

На начальном этапе исследования принадлежность экстрагированных пигментов к меланинам была подтверждена с помощью качественных реакций по обесцвечиванию в присутствии  $H_2O_2$ , а также изменению окраски с коричневой на зеленую с последующим выпадением осадка в присутствии сильного окислителя  $KMnO_4$  (данные не представлены). При добавлении  $FeCl_3$  наблюдалось выпадение осадка, который растворялся в избытке  $FeCl_3$ , такие результаты предполагают наличие фенольных фрагментов в структуре полимера.

Элементный состав меланина является важным критерием, определяющим его тип, сорбционные свойства и наличие реакционных центров. Элементный состав меланина зависит от видовой принадлежности лишайника, его возраста, субстрата произрастания, условий обитания [28] и типа фотобионта. Лишайники *C. islandica* и *P. furfuracea* являются представителями напочвенных лишайников и обладают вы-

сокой сорбционной емкостью в отношении многих ионов металлов. Меланины могут легко связывать потенциально токсичные металлы в лишайниках, благодаря наличию карбоксильных и гидроксильных функциональных групп [29]. Металлы проникают через коровый слой [30]. Данный слой, образующий внешний каркас лишайника, состоит из хитин-глюкан-меланинового комплекса. Жесткий каркас формируется благодаря взаимодействию хитин-меланинового комплекса микобионта с Ca и Si [31, 32]. Это объясняет наличие Ca и Si в составе меланинов (табл. 1). Накопление в меланине таких элементов, как Al, Fe, Cu и S (табл. 1), может быть связано со степенью загрязнения воздуха [9, 30]. Соотношение C/N определяет тип синтезируемого меланина. Так, в алломеланинах из *C. islandica* и *P. furfuracea* соотношение C/N составило 34 и 35 соответственно (табл. 1).

Синтез меланинов – сложный многостадийный процесс, проходящий по разнообразным путям (см. Введение). Алломеланин синтезируется по ацетатно-малонатному пути и образуется в результате полимеризации простых фенолов [7]. Анализ характеристических полос поглощения ИК-спектров меланинов, выделенных из лишайников *C. islandica* и *P. furfuracea*, подтвердил наличие ароматических групп в составе алломеланинов. С помощью базы данных AIST: Spectral Database for Organic Compounds (SDBS) было выявлено, что колебательные полосы определенных групп атомов меланинов обоих лишайников имеют приблизительно одинаковые частоты (табл. 2) и мало зависят от характера окружающих их групп. Данные указывают на незначительное содержание алифатических фрагментов и повышенное содержание ароматических групп. Значение пиков ИК-спектров меланинов, выделенных из лишайников *C. islandica* и *P. furfuracea*, близко к таковым для алломеланина гриба чаги *Inonotus obliquus* [17].

Таблица 2. Области поглощения колебаний некоторых связей ИК-спектров меланина

Волновые числа, $cm^{-1}$	Функциональные группы
900	внеплоскостные деформационные колебания (C–H)-групп
1020–1040	валентные колебания C–O-групп; симметричные валентные колебания (C–O–C)-групп
1150–1250	плоскостные деформационные колебания OH-(C=C, C=N, C=O)-групп
1300–1380	плоскостные деформационные колебания OH-групп
1525	валентные колебания C=C ароматического кольца
2340–2360	валентные колебания (C–C) тройных связей
2880–2940	валентное колебание алифатических $CH_2$ -, $CH_3$ -групп
3325	валентные колебания фенольных OH-групп

Меланины обладают фотопротекторными свойствами [7]. Значительное снижение поглощения в диапазоне 230–650 нм свидетельствует о том, что алломеланины лишайников поглощают световое излучение как в УФ, так и в видимой областях спектра (рис. 2). Поглощение света меланином обеспечивает защиту кортекса лишайника от УФ-индуцированного стресса и позволяет находиться под облучением продолжительное время. В частности показано, что пигментированные грибы *Cryomyces antarcticus* и *Cryomyces minteri* проявляют высокую устойчивость к УФ-облучению (280–360 нм), выдерживая его в течение нескольких часов, тогда как непигментированные дрожжевые клетки *Saccharomyces pastorianus* погибают через 30 мин облучения [7].

Меланины являются активными акцепторами и донорами электронов и обладают антиоксидантной активностью [33]. В настоящей работе была выявлена антиоксидантная активность меланинов, выделенных из лишайников *C. islandica* и *P. furfuracea*, по восстановлению радикала DPPH (рис. 3). Можно полагать, что антиоксидантная активность алломеланинов лишайников обусловлена их фенольной природой и наличием в структуре алифатических фрагментов. Фенольные соединения в ходе окислительных процессов образуют феноксильные радикалы, которые обладают меньшей реакционной активностью, чем другие кислородные радикалы, и способны прерывать цепной механизм окисления [32, 33]. Таким образом, меланины вносят вклад в защиту таллома лишайников от окислительного стресса, индуцированного в том числе воздействием светового стресса.

В настоящей работе впервые в лишайниках *C. islandica* и *P. furfuracea* идентифицирован тип меланина как алломеланин. Обнаруженные в структуре меланина функциональные группы, в том числе ОН-группы, обеспечивают его фотопротекторные и антиоксидантные свойства. Анализ физико-химических свойств исследованных меланинов позволяет полагать, что синтез меланина является одним из ключевых защитных механизмов, обеспечивающих выживание лишайников в условиях УФ-излучения.

**Финансирование.** Работа проводилась в рамках выполнения государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН (экстракция, элементный анализ, антиоксидантная активность), частично при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00198, спектральный анализ) и частично Программы Повышения Конкурентоспособности КФУ (анализ химического стандарта).

**Благодарности.** Авторы благодарны профессору Кнут Солхаг (Университет Наук о Жизни, Ос, Норвегия) за помощь в сборе лишайников, а также В.М. Бабаеву и Д.А. Файзуллину (ФИЦ КазНЦ РАН) за методическую помощь в проведении экспериментов.

**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

1. Бязров Л. Г. (2016) Вторичные метаболиты лишайников грибов как фармацевтический потенциал, *Успехи медицинской микологии*, **16**, 249–254.
2. Nybakken, L., Solhaug, K. A., Bilger, W., and Gauslaa, Y. (2004) The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats, *Oecologia*, **140**, 211–216, doi: 10.1007/s00442-004-1583-6.
3. Plonka, P. M., and Grabacka, M. (2006) Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects, *Acta Biochim. Pol.*, **53**, 429–443, doi: 10.18388/abp.2006.3314.
4. Wong, H. J., Mohamad-Fauzi, N., Rizman-Idid, M., Convey, P., and Alias, S. A. (2018) Protective mechanisms and responses of micro-fungi towards ultraviolet-induced cellular damage, *Polar Science*, **20**, 19–34, doi: 10.1016/j.polar.2018.10.001.
5. Bell, A. A., and Wheeler, M. H. (1986) Biosynthesis and functions of fungal melanins, *Phytopathology*, **24**, 411–451, doi: 10.1146/annurev.py.24.090186.002211.
6. Beckett, R. P., Solhaug, K. A., Gauslaa, Y., and Minibayeva, F. V. (2019) Improved photoprotection in melanized lichens is a result of fungal solar radiation screening rather than photobiont acclimation, *Lichenologist*, **51**, 483–491, doi: 10.1017/S0024282919000276.
7. Гесслер Н. Н., Егорова А. С., Белозерская Т. А. (2014) Меланиновые пигменты грибов в экстремальных условиях существования, *Прикладная биохимия и микробиология*, **50**, 125–134.
8. Тюкавкина Н. А., Зурабян С. Э., Белобородов В. Л. (2008) *Органическая химия: учебник для вузов*, Дрофа, Москва.
9. Багманян И. А., Мямин В. Е., Гигиняк Ю. Г., Бородин О. И., Курченко В. П. (2004) Биохимическая фармакология грибов-меланинов, *Успехи медицинской микологии*, **3**, 156–158.
10. Purvis, O. W., Bailey, E. H., McLean, J., and Kasama, T. (2004) Uranium biosorption by the lichen *Trapelia involuta* at a uranium mine, *Geomicrobiol. J.*, **21**, 159–167, doi: 10.1080/01490450490275398.
11. Schroeder, R. L., Double, K. L., and Gerber, J. P. (2015) Using *Sepia melanin* as a PD model to describe the binding characteristics of neuromelanin, *J. Chem. Neuroanat.*, **64–65**, 20–32, doi: 10.1016/j.jchemneu.2015.02.001.
12. Wakamatsu, K., Fujikawa, K., Zucca, F. A., Zecca, L., and Ito, S. (2003) The structure of neuromelanin as studied by chemical degradative methods, *J. Neurochem.*, **86**, 1015–1023, doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01917.x.

13. Eisenman, H. C., and Casadevall, A. (2012) Synthesis and assembly of fungal melanin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 931-940, doi: 10.1007/s00253-011-3777-2.
14. Babitskaya, V. G., Scherba, V. V., Ikonnikova, N. V., Bisko, N. A., and Mitropolskaya, N. Y. (2002) Melanin complex from medicinal mushroom *Inonotus obliquus*, *Int. J. Med. Mushrooms*, **4**, 139-145.
15. Tarangini, K., and Mishra, S. (2013) Production, characterization and analysis of melanin from isolated marine *Pseudomonas* sp. using vegetable waste, *Res. J. Eng. Sci.*, **2**, 40-46.
16. Таширев А. Б., Романовская В. А., Рокитко П. В., Матвеева Н. А., Шилин С. О., Таширева А. А. (2012) Синтез меланиновых пигментов антарктическими чёрными дрожжами, *Микробиол. Журн.*, **74**, 2-8.
17. Сушинская Н. В., Курченко В. П. (2006) Меланины трутовых грибов, *Труды БГУ*, **1**, 147-158.
18. Агаджанян А. Е., Асагурян Р. А., Амбарцумян А., Саргисян Л. Б., Овсепян А. С., Варданян А. А., Сагриян А. С. (2011) Микробиологическое получение водорастворимого меланина и изучение его физико-химических свойств, *Прикладная биохимия и микробиология*, **47**, 551-557.
19. Manivasagan, P., Venkatesan, J., Senthilkumar, K., Sivakumar, K., and Kim, S. K. (2013) Isolation and characterization of biologically active melanin from *Actinobolus* sp. MA-32, *Int. J. Biol. Macromol.*, **58**, 263-274, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.041.
20. Wang, L. F., and Rhim, J. W. (2019) Isolation and characterization of melanin from black garlic and sepia ink, *LWT*, **99**, 17-23, doi: 10.1016/j.lwt.2018.09.033.
21. Chen, J., Wang, C., Shu, C., Zhu, M., and Zhou, E. (2015) Isolation and characterization of a melanin from *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight, *Eur. J. Plant. Pathol.*, **142**, 281-290, doi: 10.1007/s10658-015-0612-0.
22. Сильверштейн Р., Вебстер Ф., Кимл Д. (2012) *Спектрометрическая идентификация органических соединений*, Бином, Москва.
23. Harki, E., Talou, T., and Dargent, R. (1997) Purification, characterization and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum* Vitt., *Food Chemistry*, **58**, 69-73, doi: 10.1016/S0308-8146(96)00215-4.
24. Mbonyirivuze, A., Mwakikunga, B., Dhlamini, S. M., and Maaza, M. (2015) Fourier transform infrared spectroscopy for *Sepia melanin*, *Phys. Mater. Chem.*, **3**, 25-29, doi: 10.12691/pmc-3-2-2.
25. Solhaug, K. A., and Gauslaa, Y. (2001) Fungal melanins as a sun screen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria*, *Oecologia*, **126**, 462-471, doi: 10.1007/s004420000541.
26. Подтероб А. П. (2008) Химический состав лишайников и их медицинское применение, *Хим. Фарм. Журн.*, **42**, 32-38.
27. Книга О. П., Тихонова Г. А., Хижан Е. И., Николаевский А. Н. (2011) Действие фенольных антиоксидантов при окислении веществ в модельных водно-липидных системах, *Бутлеровские сообщения*, **27**, 57-62.
28. Блинова К. Ф., Борисова Н. А., Гортинский Г. Б. (1990) *Ботанико-фармакогностический словарь*, Высшая школа, Москва.
29. Mafole, T. C., Solhaug, K. A., Minibayeva, F. V., and Beckett, R. P. (2019) Occurrence and possible roles of melanic pigments in lichenized ascomycetes, *Fungal Biol. Rev.*, **33**, 159-165, doi: 10.1016/j.fbr.2018.10.002.
30. Курченко В. П., Багманян И. А., Мямин В. Е., Бородин О. И., Гигиняк Ю. Г. (2016) Тяжелые металлы в кустистых лишайниках как индикатор атмосферного переноса загрязняющих веществ в Антарктиде, *Труды БГУ*, **11**, 351-355.
31. Скрябин К. Г., Вихорева Г. А., Варламов В. П. (2002) *Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение*, Наука, Москва.
32. Красногорская Н. Н., Клеттер Е. А., Сулейманова Р. Р., Журавлева С. Е. (2012) Анализ содержания тяжелых металлов и соединений серы в лишайниках *Parmelia sulcata* в условиях городской среды, *Современные проблемы науки и образования*, **2**, 30-39.
33. Grossi, G. F., Durante, M., Gvalanella, G., Pugliese, M., and Mosse, I. (1998) Effects of melanin on high-LET radiation response of human epithelial cells, *Radiat. Environ. Biophys.*, **37**, 63-67, doi: 10.1007/s004110050094.

## MELANIN OF LICHENS *Cetraria islandica* AND *Pseudevernia furfuracea*: STRUCTURAL FEATURES AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES

A. E. Rassabina<sup>1</sup>, O. P. Gurjanov<sup>1</sup>, R. P. Beckett<sup>2</sup>, and F. V. Minibayeva<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 420111 Kazan, Russia; E-mail: minibayeva@kibb.knc.ru

<sup>2</sup> School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal, 3209, Scottsville, South Africa

<sup>3</sup> Kazan (Volga region) Federal University, 420008 Kazan, Russia

Received February 20, 2020

Revised March 27, 2020

Accepted March 30, 2020

Lichens are symbiotic photosynthesizing organisms with thalli formed by fungi and algae/cyanobacteria that possess high stress tolerance. One of the factors contributing to the lichen protection from harsh environmental conditions is the presence of unique metabolites, including high-molecular-weight dark pigments melanins. The chemical composition and structure of lichen melanins remain poorly studied. We analyzed the elemental composition, the main functional groups, and the physicochemical properties of melanin extracted from *Cetraria islandica* and *Pseudevernia furfuracea* lichens. Based on the C/N ratio, this pigment is allomelanin. We also identified functional groups that provide photoprotective and antioxidant properties of melanin. Melanin synthesis might be an essential defense mechanism contributing to the survival of lichens under exposure to UV radiation.

**Keywords:** melanin, lichen, IR spectroscopy, photoprotection, antioxidant activity

УДК 577.124

## ДВА ГЛИКОЗИЛ-1-ФОСФАТНЫХ ПОЛИМЕРА И ТЕЙХУЛОЗОНОВАЯ КИСЛОТА ИЗ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *Glutamicibacter protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>†</sup>

© 2020 А.С. Шашков<sup>1</sup>, Е.М. Тульская<sup>2</sup>, Л.В. Дорофеева<sup>3</sup>,  
Л.И. Евтушенко<sup>3</sup>, Н.В. Потехина<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН, 119991 Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: potekhina56@mail.ru

<sup>3</sup> Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
имени Г.К. Скрыбина РАН, 142290 Пущино Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 20.03.2020

После доработки 03.04.2020

Принята к публикации 03.04.2020

В клеточной стенке *Glutamicibacter protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>†</sup> (ранее *Arthrobacter protophormiae*) обнаружены два гликозил-1-фосфатных полимера: с моногликозил-1-фосфатом, -6)- $\alpha$ -D-Glcp-(1-P-, и дигликозил-1-фосфатом, -6)- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1-P-, в повторяющемся звене. Структуры полимеров описаны впервые для прокариот. Тейхулозоновая кислота, третий найденный полимер, с остатками 3-дезоксид-Д-глицеро-Д-галакто-нон-2-улопиранозоновой кислоты (Kdp) и  $\beta$ -D-глюкопиранозы в основной цепи,  $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Kdp-(2 $\rightarrow$ ), ранее была обнаружена у ряда актинобактерий. Структуры гликополимеров установлены на основании результатов химического исследования и анализа одномерных спектров ЯМР на ядрах <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C и <sup>31</sup>P с использованием двумерных гомоядерных <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC, <sup>1</sup>H,<sup>31</sup>P HMBC методик.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** *Glutamicibacter*, клеточная стенка, гликозил-1-фосфатный полимер, Kdp-тейхулозоновая кислота.

DOI: 10.31857/S0320972520050127

### ВВЕДЕНИЕ

Новые данные о составе и химических структурах полимеров клеточных стенок у ранее не исследованных групп бактерий расширяют представления о многообразии органического мира и биосинтетическом потенциале микроорганизмов. Сведения о составе и структуре гликополимеров клеточной стенки представляют интерес для ряда областей фундаментальной и прикладной науки, в том числе систематики

микроорганизмов. Для ряда изученных групп актинобактерий показано, что гликополимеры и их структурные компоненты могут служить химическими маркерами видов (групп видов) или таксонов более высокого ранга [1–5].

*Glutamicibacter protophormiae* (семейство Microsoccaceae) является типовым видом недавно описанного рода *Glutamicibacter*, который включает ряд видов, входивших ранее в род *Arthrobacter* (группа «*Arthrobacter protophormiae*»), а также видов, описанных позднее [6–8]. Род предложен на основе филогенетической обособленности видов группы «*Arthrobacter protophormiae*» и их отличий от *Arthrobacter sensu stricto* по хемотаксономическим признакам, в первую очередь по типу пептидогликана клеточной стенки и составу изопреноидных хинонов дыхательной цепи [6]. Виды *Glutamicibacter* содержат пептидогликан A4 $\alpha$ -типа (лизин в тетрапептидной цепи и дипептид Ala–Glu в межпептидном мостике) [6, 9]. Другие гликополимеры клеточной стенки у представителей *Glutamicibacter*, за исключением *G. nicotianae* ATCC 15236 [10] и *G. uraxydans* ВКМ Ас-1979<sup>†</sup> [11], ранее не изучали.

Принятые сокращения: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов; COSY – корреляционная спектроскопия; HMBC – гетероядерная корреляция <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C через несколько связей; HSQC – протон-детектированная гетероядерная одноквантовая корреляция; J (KCCB) – константа спин-спинового взаимодействия; Kdp – 3-дезоксид-Д-глицеро-Д-галакто-нон-2-улопиранозоновая кислота; ROESY – двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; TOCSY – тотальная корреляционная спектроскопия; TSP – натриевая соль 3-(триметилсилил)-2,2,3,3-тетрадейтеропропионовой кислоты;  $\delta_C$ ,  $\delta_H$ ,  $\delta_P$  – значения химических сдвигов атомов <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H и <sup>31</sup>P соответственно.

\* Адресат для корреспонденции.

В настоящей работе представлены результаты исследования структур гликополимеров клеточной стенки у *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>Т</sup> – типового штамма типового вида рода *Glutamicibacter*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штамм *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>Т</sup> из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скребины РАН ([www.vkm.ru](http://www.vkm.ru)). Для получения биомассы штамм выращивали аэробно на пептонно-дрожжевой среде при температуре 28 °С до середины логарифмической фазы роста. Клетки отделяли центрифугированием и промывали 0,95% NaCl [2].

Клеточную стенку получали из разрушенных на ультразвуковом дезинтеграторе UP100H («Hielscher», Германия, 30 kHz, 3–5 × 10 мин в ледяной воде) клеток методом дифференциального центрифугирования [2].

Углеводсодержащие полимеры экстрагировали из клеточной стенки 10%-ной ТХУ [2] при 4 °С, 0,1 М цитратным буфером pH 4,0 [12] или 0,05 М Na-глициновым буфером, pH 8,8 [13] с получением трех различных препаратов, обозначенных для дальнейших исследований как препарат 1, 2 и 3 соответственно.

Кислотный гидролиз клеточной стенки и выделенных из нее препаратов (2 М HCl, 100 °С, 3 ч), нисходящая хроматография и электрофорез на бумаге, реактивы для проявления сахаров и фосфатсодержащих соединений и продуктов их кислотной деградации описаны ранее [2].

Абсолютная D-конфигурация моносахаридов была установлена методом ГЖХ ацетилированных гликозидов с (+)-октан-2-олом согласно опубликованным процедурам [2].

ЯМР-спектры снимали на спектрометре Avance 600 («Bruker», Германия) для растворов препаратов в дейтерированной воде при температуре 308 К. Для отсчета химических сдвигов использовали внутренние стандарты натриевой соли 3-(триметилсилил)-2,2,3,3-тетрадейтеро-пропионовой кислоты (TSP) ( $\delta_H$  0,0 и  $\delta_C$  –1,6) и внешний стандарт – 80% фосфорная кислота ( $\delta_P$  0,0). Двумерные ЯМР-эксперименты выполняли с использованием стандартного математического обеспечения («Bruker Optik GmbH», Германия). Время смешивания 150 мс и время спин-лока 250 мс были выбраны для экспериментов по двумерной спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат (ROESY) и тотальной корреляционной

спектроскопии (TOCSY) соответственно. Двумерные  $^1H$ ,  $^{13}C$  и  $^1H$ ,  $^{31}P$  эксперименты по гетероядерной корреляции через несколько связей (НМВС) были оптимизированы для константы спин-спиновой взаимодействия (КССВ) 5 Гц.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В кислотном гидролизате клеточной стенки *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>Т</sup> были обнаружены галактоза, глюкоза, манноза, арабиноза, глюкозы и галактозамин, глицерин, а также незначительное количество моно- и бисфосфата глицерина.

Продукты кислотной деградации трех препаратов, выделенных из клеточной стенки разными методами экстракции, отличались по соотношению сахаров и не содержали фосфорных эфиров глицерина. Эти данные могли указывать на отсутствие тейхоевых кислот и наличие других углеводсодержащих полимеров.

Структуры полимеров устанавливали на основе анализа одномерных спектров ЯМР на ядрах  $^1H$ ,  $^{13}C$  и  $^{31}P$  с использованием двумерных гомоядерных  $^1H$ ,  $^1H$  методик корреляционной спектроскопии (COSY), TOCSY, ROESY и гетероядерных методик –  $^1H$ ,  $^{13}C$  HSQC, HSQC-TOCSY, НМВС и  $^1H$ ,  $^{31}P$  НМВС.

В спектре ЯМР  $^{13}C$  препарата 1, полученного экстракцией ТХУ, в области резонанса аномерных атомов углерода наблюдали сигналы различной интенсивности, часть из которых, судя по величине их химических сдвигов ( $\delta_C$  92,1; 93,5; 96,4 и 97,7 м.д.), принадлежала сахарным остаткам со свободной гидроксильной группой при C-1 (рис. 1; таблица). Три сигнала принадлежали аномерным атомам углерода при гликозидных связях  $\delta_C$  98,4; 98,2 и 102,9 м.д.  $^{13}C$  АРТ (тест на присоединенные протоны) спектр выявил также сигнал четвертичного аномерного атома углерода при  $\delta_C$  96,4 м.д.

В спектре ЯМР  $^1H$  в области резонанса протонов при аномерных атомах углерода (рис. 2, вверху; таблица) были видны дублеты с КССВ, характерные для пираноз с  $\alpha$ -глюко- и  $\alpha$ -галакто-конфигурацией ( $\delta_H$  5,22; 5,20; 4,95 м.д.;  $^3J_{H-1, H-2}$  3,5 Гц) и с  $\beta$ -глюко- и  $\beta$ -галакто-конфигурацией ( $\delta_H$  4,72; 4,64; 4,56 м.д.;  $^3J_{H-1, H-2}$  8 Гц).

В сильном поле (рис. 3, таблица) имелись сигналы, характерные для протонов при C-3 альдулозоновых кислот ( $\delta_H$  2,27, дд,  $J$  5 и 13 Гц и  $\delta_H$  1,83, т,  $J$  13 Гц).

Спектр ЯМР  $^{31}P$  препарата содержал два уширенный сигнал при  $\delta_P$  –1,0 и –1,4 м.д.

Сигналы в одномерных спектрах ЯМР были отнесены при использовании двумерных методик  $^1H$ ,  $^1H$  COSY, TOCSY, ROESY;  $^1H$ ,  $^{13}C$  HSQC,

Химические сдвиги в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$  ЯМР гликополимеров и их фрагментов из клеточной стенки *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>†</sup>

Остаток	Химические сдвиги ЯМР $^{13}\text{C}$ ( $\delta_{\text{C}}$ TSP $-1,6$ ) и $^1\text{H}$ ( $\delta_{\text{H}}$ TSP $0,0$ )								
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3 (H-3e,3a)	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6, H-6'	C-7 H-7	C-8 H-8	C-9 H-9
Полимер I									
$\rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ (GaN)	98,7 4,55	51,1 <sup>c</sup> 4,21	68,8 3,96	69,4 4,05	70,9 4,14	65,8 <sup>a</sup> 4,04, 4,00			
$\rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1-P- (GN)	95,1 <sup>a</sup> 5,47	55,0 <sup>c</sup> 3,96	72,0 3,79	70,6 3,93	73,2 3,99	66,7 4,08, 3,69			
Дисахариды из полимера I									
$\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ (GaN')	98,4 4,95	51,1 4,18	68,9 3,96	69,7 4,01	72,2 4,00	62,4 3,77, 3,75			
$\rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-GlcpNAc (GN $\alpha$ )	92,1 5,20	55,3 3,88	72,0 3,76	71,0 3,60	71,6 3,98	66,8 4,02, 3,67			
$\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ (GaN'')	98,2 4,95	51,0 4,21	69,0 3,96	69,7 4,01	72,2 4,00	62,4 3,77, 3,75			
$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -D-GlcpNAc (GN $\beta$ )	96,4 4,72	57,9 3,68	75,2 3,53	70,7 3,59	75,6 3,59	66,7 3,97, 3,74			
Полимер II									
$\rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-Glcp-(1-P- (GI)	96,6 <sup>b</sup> 5,53	72,6 3,60	73,6 3,77	70,0 3,58	73,0 3,94	65,5 <sup>b</sup> 4,20, 4,14			
Полимер III (Kdn-полимер)									
$\rightarrow 8$ )- $\alpha$ -Kdn-(2 $\rightarrow$ (K $\alpha$ )	174,2	101,3	40,2 2,63, 1,65	70,0 3,56	70,9 3,45	75,2 3,73	69,1 4,44	85,7 3,95	61,5 4,23, 3,75
$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ (Glc)	103,9 4,64	74,0 3,36	75,9 3,51	69,5 3,58	74,7 3,54	63,1 3,96, 3,64			
Kdn-гликозид <sup>d</sup> из полимера III									
$\beta$ -Kdn (K $\beta$ )	174,3	96,4	40,1 2,27, 1,83	70,1 3,97	71,6 3,55	72,8 4,04	67,9 4,06	79,5 3,97	62,6 3,87, 3,75
$\beta$ -D-Glcp-(1 (Glc')	102,9 4,56	74,3 3,32	77,0 3,42	71,3 3,36	77,1 3,48	62,1 3,94, 3,65			

<sup>31</sup>P при  $\delta_{\text{P}}$  <sup>a</sup>  $-1,4$ ; <sup>b</sup>  $-1,0$  м.д.; <sup>c</sup>  $\text{CH}_3\text{CON}$  при  $\delta_{\text{C}}$  23,3, 23,4 и 176,8, 175,9 и  $\delta_{\text{H}}$  2,07 м.д.

<sup>d</sup> Продукт полного автогидролиза Kdn-полимера с повторяющимся звеном  $\rightarrow 6$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow 8$ )- $\alpha$ -Kdn-(2 $\rightarrow$ .

HSQC-TOCSY, HMBC и  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  HMBC. Анализ двумерных спектров выявил наличие в препарате 1 остатков  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкопиранозы-6-фосфата и дисахаридов-6-фосфата,  $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcpNAc и  $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-GlcpNAc со свободной гидроксильной группой. Было предположено, что низкомолекулярные фосфатсодержащие соединения являются продуктами гидролиза гликозил-1-фосфатных полимеров, неустойчивых в кислой среде (в условиях выделения 10% ТХУ, pH < 1). В связи с этим была проведена экстракция полимеров из клеточной стенки с использованием цитратного буфера при pH 4,0 (препарат 2), что привело к выделению довольно больших олигосахаридов с фосфодиэфирными связями и установлению структур двух гликозил-1-фосфатных полимеров: **-6)- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1-P-** (полимер I), **-6)-  $\alpha$ -D-Glcp-(1-P-** (полимер II).

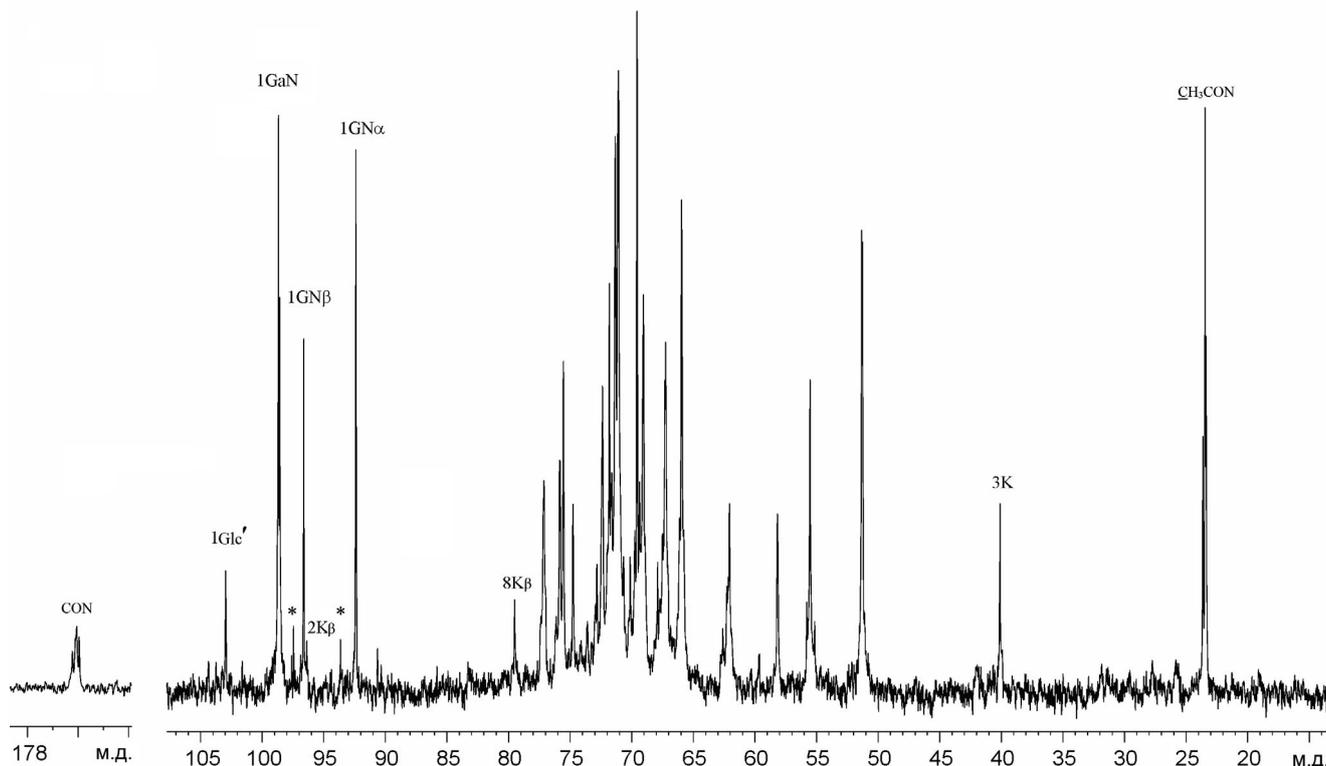
Абсолютная конфигурация моносахаридных остатков в полимерах была определена как D (см. раздел «Материалы и методы»).

Помимо фосфатсодержащих низкомолекулярных соединений в препарате 1 по одномерным и двумерным спектрам ЯМР был также идентифицирован дисахарид состава  $\beta$ -D-Glcp-

(1 $\rightarrow$ 8)- $\beta$ -Kdn (таблица), ошибочно принятый ранее за повторяющееся звено  $\beta$ -2,4-связанного полимера Kdn [14]. Последние наши исследования [13, 15] показали, что при выбранных нами условиях выделения (экстракция 10% ТХУ, pH < 1) нативный  $\alpha$ -Kdn-содержащий полимер подвергается автогидролизу и почти полностью деградирует. Следы полимера, где Kdn имеет  $\alpha$ -конфигурацию гликозидной связи, обнаруживаются в спектре  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC препарата 1 (рис. 3). Также ранее было показано, что изначальный Kdn-полимер, полученный в более мягких условиях выделения (экстракция Na-глициновым буфером, pH 8,8), сохраняет внутримономерные связи [13, 15]. Исследование препарата 3 выявило наличие в нем линейного Kdn-содержащего полимера, а его структура соответствовала таковой, описанной ранее в работе [15]:  **$\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Kdn-(2** (полимер III).

В клеточной стенке *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>T</sup> обнаружены моно-, дигликозил-1-фосфатные полимеры и Kdn-тейхулозоновая кислота.

Гликозил-1-фосфатные полимеры ранее были описаны у ряда актинобактерий [13, 16, 17]. Структура идентифицированного в настоящей работе дигликозил-1-фосфатного полимера с

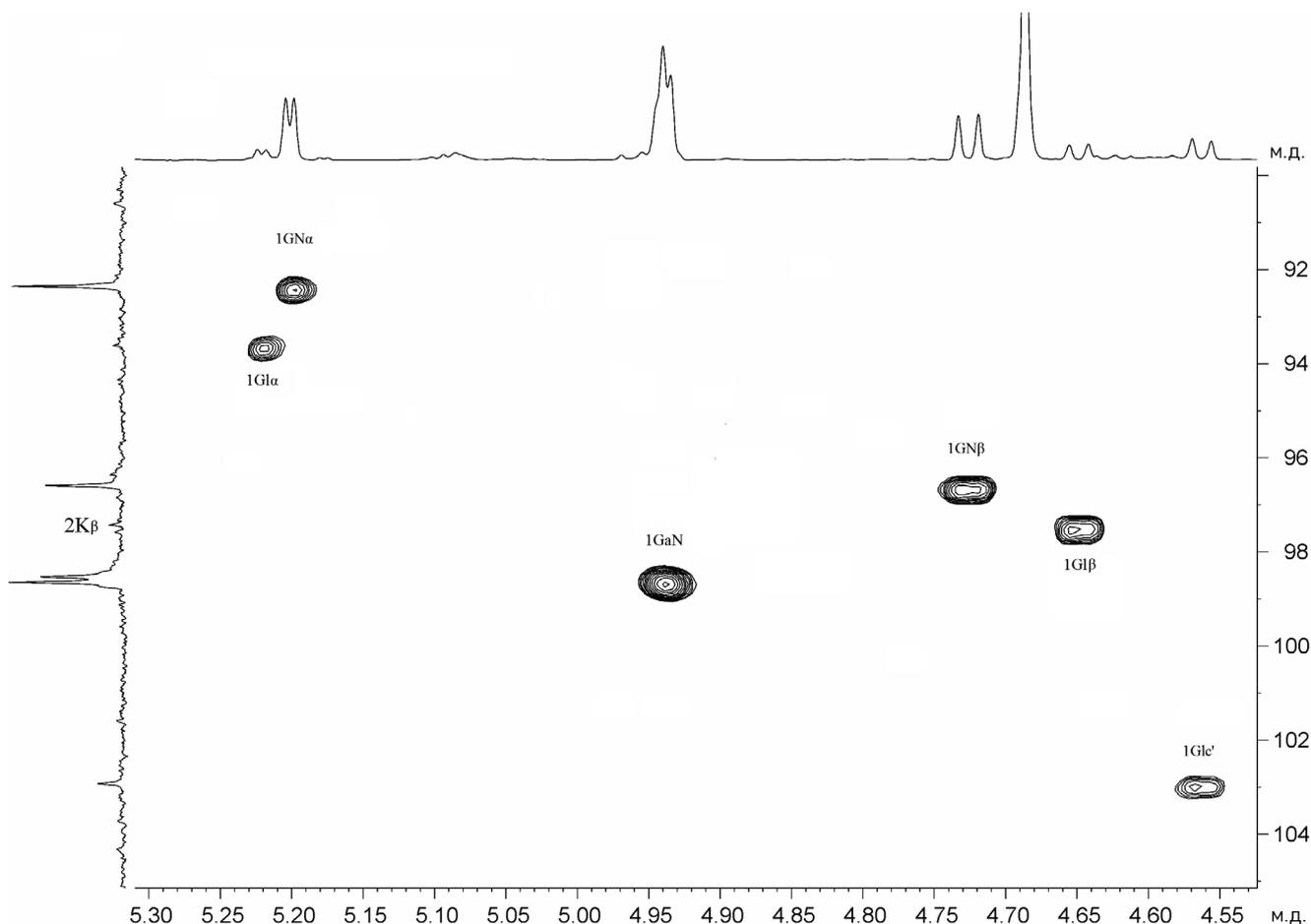


**Рис. 1.** Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  гликополимеров и их фрагментов (препарат 1) из клеточной стенки *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>T</sup>. Обозначения приведены в соответствии с таблицей. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных как в таблице. Звездочками обозначены аномерные атомы углерода в остатках глюкозы (Gla и Glb) на восстанавливающем конце полимера II

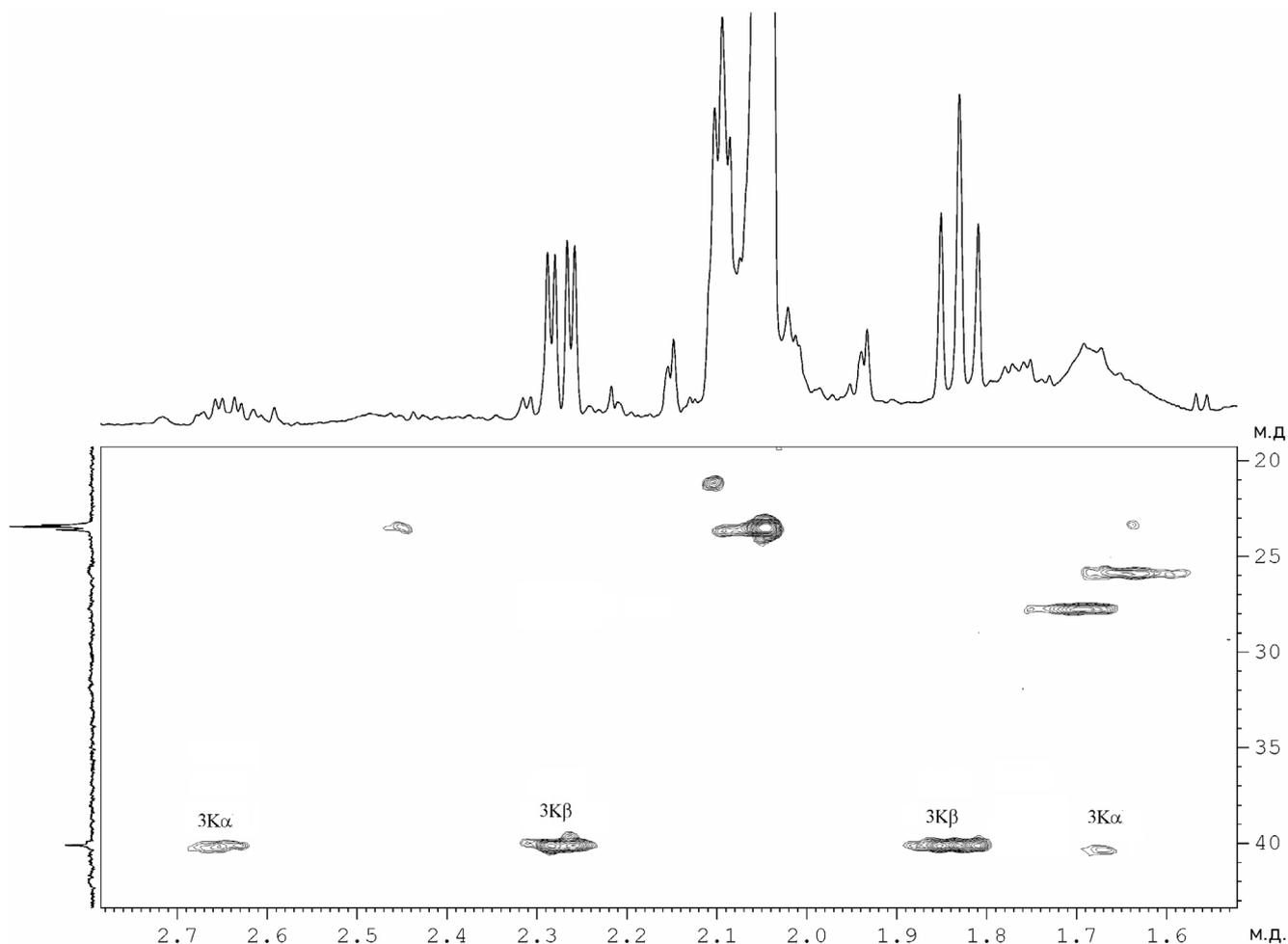
повторяющимся звеном  $-6)-\alpha-D-GalpNAc-(1\rightarrow6)-\alpha-D-GlcpNAc-(1-P-$  обнаружена впервые. Также впервые идентифицирован моногликозил-1-фосфатный полимер, состоящий из фосфодиэфирносвязанных остатков  $\alpha$ -глюкопиранозы,  $-6)-\alpha-D-Glcp-(1-P-$ . Исследованные ранее полимеры, содержащие один углеводный остаток в повторяющемся звене, были построены из остатков N-ацетилированных производных моносахаридов:  $-6)-ManpNAc-(1-P-$ ,  $-4)-GlcpNAc-(1-P-$  (*Bacillus pumilus*) [18, 19],  $-6)-GlcpNAc-(1-P-$  (*Micrococcus* spp.) [20] и  $-6)-\alpha-D-GalpNAc-(1-P-$  (*Arthrobacter* spp.) [13].

Тейхулозоновая кислота *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>T</sup> имела уже известную, описанную для ряда актинобактерий структуру,  $\rightarrow6)-\beta-D-Glcp-(1\rightarrow8)-\alpha-Kdn-(2\rightarrow$  [15, 21], однако для рода *Glutamicibacter* она так же, как и данный класс гликополимеров в целом, обнаружена впервые.

В клеточной стенке другого представителя рода – *G. uratoxydans* ВКМ Ас-1979<sup>T</sup>, изученного ранее, были выявлены гликополимеры иной структуры: две тейхоевые кислоты, относящиеся к разным типам, и гликозилфосфатный полимер с шестью моносахаридными остатками в повторяющемся звене [11]. Тейхоевые кислоты (структуры полностью не установлены) также были обнаружены у *G. nicotianae* ATCC 15236 [10]. Хотя три вышеупомянутых штамма различаются по составу и структуре стеночных гликополимеров, они имеют и общее свойство – в их клеточной стенке присутствуют фосфатсодержащие полимеры. Следует отметить, что представители другого рода, *Paenarthrobacter*, также относившиеся ранее к *Arthrobacter* [2], содержат в клеточной стенке только бесфосфатные полисахариды (неопубликованные данные авторов).



**Рис. 2.** Слабопольная часть  $^1H, ^{13}C$  HSQC-спектра гликополимеров и их фрагментов (препарат 1) из клеточной стенки *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>T</sup>. Соответствующие части  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР-спектров приведены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Обозначения приведены в соответствии с таблицей. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных как в таблице



**Рис. 3.** Сильнопольная часть  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC-спектра гликополимеров и их фрагментов (препарат 1) из клеточной стенки *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>Т</sup>. Соответствующие части  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектров приведены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Обозначения приведены в соответствии с таблицей. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных как в таблице

Полученные в настоящей работе и опубликованные ранее данные о наборе и структурах гликополимеров у трех представителей рода *Glutamicibacter*, а также сведения о сахарах и полиолах их клеточных стенок (галактоза, глюкоза, глюкозамин, галактозамин, глицерин) позволяют более полно охарактеризовать род и его виды и могут быть использованы в таксономической практике для дифференциации таксонов видового и родового рангов на фенотипическом уровне.

**Финансирование.** Работа выполнялась в рамках программы исследований № ЦИТИС: АА-АА-А16-116021660068-1, запланированных в МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедрой микробиологии на 2016–2022 гг.

**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

1. Takeuchi, M., and Yokota, A. (1989) Cell-wall polysaccharides in coryneform bacteria, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **35**, 233-252.
2. Potekhina, N. V., Streshinskaya, G. M., Tul'skaya, E. M., and Shashkov, A. S. (2011) *Methods in Microbiology*, vol. 38 (Rainey, F. A., and Oren, A., eds), chapter 6, Academic Press, Elsevier, pp. 131-164.
3. Evtushenko, L. I., and Ariskina, E. V. (2015) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Whitman, W. B., eds), 1-18.
4. Takeuchi, M., Yokota, A., and Misaki, A. (1990) Comparative structures of the cell-wall polysaccharides of four species of the genus *Microbacterium*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **36**, 255-271.

5. Shashkov, A. S., Tul'skaya, E. M., Streshinskaya, G. M., Dmitrenok, A. S., Potekhina, N. V., Senchenkova, S. N., Piskunkova, N. F., Dorofeeva, L. V., and Evtushenko, L. I. (2020) Rhamnomannans and teichuronic acid from cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603<sup>T</sup>, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 369-377.
6. Busse, H. J. (2016) Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter* sensu lato, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **66**, 9-378.
7. Feng, W. W., Wang, T. T., Bai, J. L., Ding, P., Xing, K., Jiang, J. H., Peng, X., and Qin, S. (2017) *Glutamicibacter halophytocola* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of a coastal halophyte, *Limonium sinense*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **67**, 1120-1125.
8. Busse, H. J., and Schumann, P. (2019) Reclassification of *Arthrobacter endophyticus* (Wang et al. 2015) as *Glutamicibacter endophyticus* comb. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **69**, 1057-1059.
9. Schleifer, K. H., and Kandler, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications, *Bacteriol. Rev.*, **36**, 407-477.
10. Fiedler, F., and Schäffler, M. J. (1987) Teichoic acids in cell wall of strains of "nicotianae" group of *Arthrobacter* a chemotaxonomic marker, *System. Appl. Microbiol.*, **9**, 16-21.
11. Potekhina, N. V., Shashkov, A. S., Senchenkova, S. N., Dorofeeva, L. V., and Evtushenko, L. I., (2012) Structure of hexasaccharide 1-phosphate polymer from *Arthrobacter uratoxydans* VKM Ac-1979<sup>T</sup> cell wall, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1294-1302.
12. Pavlik, J. G., and Rogers, H. J. (1973) Selective extraction of polymers from cell walls of gram-positive bacteria, *Biochem. J.*, **131**, 619-621.
13. Potekhina, N. V., Arbatsky, N. P., Shashkov, A. S., Dmitrenok, A. S., Senchenkova, S. N., Dorofeeva, L. V., and Evtushenko, L. I. (2017) Novel teichulosonic acid and glycosyl 1-phosphate polymers from the cell walls of *Arthrobacter* sp., strains VKM Ac-2549 and VKM Ac-2550, phylogenetically close to *Arthrobacter crystallopoietes*, *Carbohydr. Res.*, **451**, 36-41.
14. Shashkov, A. S., Kosmachevskaya, L. N., Streshinskaya, G. M., Evtushenko, L. I., Bueva, O. V., Denisenko, V. A., Naumova, I. B., and Stackebrandt, E. (2002) A polymer with a backbone of 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosonic acid, a teichuronic acid, and a  $\beta$ -glucosylated ribitol teichoic acid in the cell wall of plant pathogenic *Streptomyces* sp. VKM Ac-2124, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 6020-6025.
15. Shashkov, A. S., Potekhina, N. V., Senchenkova, S. N., and Evtushenko, L. I. (2016) Teichoic, teichulosonic and teichuronic acids in the cell wall of *Brevibacterium aurantiacum* VKM Ac-2111<sup>T</sup>, *Carbohydr. Res.*, **421**, 17-24.
16. Shashkov, A. S., Ostash, B. E., Fedorenko, V. A., Streshinskaya, G. M., Tul'skaya, E. M., Senchenkova, S. N., Baryshnikova, L. M., and Evtushenko, L. I. (2012) Novel teichulosonic acid from cell wall of *Streptomyces coelicolor* M145, *Carbohydr. Res.*, **359**, 70-75.
17. Potekhina, N. V., Shashkov, A. S., Streshinskaya, G. M., Senchenkova, S. N., and Evtushenko, L. I. (2005) Anionic polymers of the cell wall of *Brevibacterium linens* VKM Ac-2159, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 1046-1054.
18. Vann, W. F., Liu, T. Y., and Robbins, J. B. (1976) *Bacillus pumilus* polysaccharide cross-reactive with meningococcal group A polysaccharide, *Infect. Immunol.*, **13**, 1654-1662.
19. Kojima, N., Iida, J., Araki, Y., and Ito, E. (1985) Structural studies on the linkage unit between poly(N-acetylglucosamine 1-phosphate) and peptidoglycan in cell walls of *Bacillus pumilus* AHU 1650, *Eur. J. Biochem.*, **149**, 331-336.
20. Nikolaev, A. V., Botvinko, I. V., and Ross, A. J. (2007) Natural phosphoglycans containing glycosyl phosphate units: structural diversity and chemical synthesis, *Carbohydr. Res.*, **342**, 297-344.
21. Shashkov, A. S., Streshinskaya, G. M., Tul'skaya, E. M., Senchenkova, S. N., Baryshnikova, L. M., Dmitrenok, A. S., Ostash, B. E., and Fedorenko, V. A. (2016) Cell wall glycopolymers of *Streptomyces albus*, *Streptomyces albido-flavus* and *Streptomyces pathocidini*, *Antonie van Leeuwenhoek*, **109**, 923-936.

## TWO GLYCOSYL 1-PHOSPHATE POLYMERS AND TEICHULOSONIC ACID FROM *Glutamicibacter protophormiae* VKM Ac-2104<sup>T</sup> CELL WALL

A. S. Shashkov<sup>1</sup>, E. M. Tul'skaya<sup>2</sup>, L. V. Dorofeeva<sup>3</sup>, L. I. Evtushenko<sup>3</sup>, and N. V. Potekhina<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia; E-mail: potekhina56@mail.ru

<sup>3</sup> All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

Received March 20, 2020

Revised April 3, 2020

Accepted April 3, 2020

Two glycosyl 1-phosphate polymers containing monoglycosyl 1-phosphate,  $\beta$ -D-Glcp-(1-P-, and diglycosyl 1-phosphate,  $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1-P-, in the repeating unit were identified in the cell wall of *Glutamicibacter protophormiae* VKM Ac-2104<sup>T</sup> (formerly, *Arthrobacter protophormiae*). The structures of these polymers were described for the first time in prokaryotes. Teichulosonic acid, the third identified polymer, with 3-deoxy-D-glycero- $\alpha$ -D-galacto-non-2-ulopyranosonic acid (Kdn) and  $\beta$ -D-glucopyranose residues in the main chain,  $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Kdn-(2 $\rightarrow$ ), has been previously detected in a number of actinobacteria. The structures of these glycopolymers were established based on the results of chemical analysis and one-dimensional <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy using two-dimensional homonuclear (<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H COZY, TOCSY, ROESY) and heteronuclear (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC, and <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P HMBC) techniques.

**Keywords:** *Glutamicibacter*, cell wall, glycosyl 1-phosphate polymer, Kdn-containing teichulosonic acid

УДК 577.23

## ТРАНСПЛАНТАЦИЯ МИТОХОНДРИЙ: КРИТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

© 2020 Б.В. Черняк

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119234 Москва, Россия; электронная почта: bchernyak1@gmail.com

Поступила в редакцию 01.04.2020

После доработки 01.04.2020

Принята к публикации 03.04.2020

«Митохондриальной трансплантацией» называют процедуру введения изолированных митохондрий в поврежденную область сердца или иного органа. Накоплено значительное количество данных о терапевтическом действии «митохондриальной трансплантации» при ишемическом поражении сердца у животных. В 2017 г. проведены первые попытки применения этой процедуры в клинике. Авторы метода предполагают, что экзогенные митохондрии проникают в кардиомиоциты, сохраняя функциональную активность, и компенсируют нарушения энергетических функций эндогенных митохондрий. Эта гипотеза противоречит известному факту потери митохондриальных функций в присутствии высоких концентраций ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , которые характерны для внеклеточной среды. В обзоре критически рассмотрены возможные механизмы терапевтического действия «митохондриальной трансплантации».

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** изолированные митохондрии, перенос в кардиомиоциты, ишемия, реперфузия, критический обзор.

DOI: 10.31857/S0320972520050139

### ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

Эта история началась в далеком 2009 г., когда была опубликована первая работа о терапевтическом действии выделенных митохондрий при введении в ишемизированное сердце кролика [1]. Работа была проведена в весьма уважаемом американском госпитале (Beth Israel Deaconess Medical Center), аффилированном с Медицинской Школой Гарвардского университета (Harvard Medical School) под руководством доктора Джеймса Д. МакКалли (James D. McCully). Этот исследователь имел к тому времени уже более чем 25-летний опыт исследований в области молекулярной кардиологии (<http://www.childrenshospital.org/research/researchers/m/james-mccully>), а журнал, в котором была опубликована работа, относился к числу наиболее уважаемых изданий по физиологии. Несмотря на все вышесказанное и на сенсационное, по сути, содержание, эта работа не вызвала какого-либо резонанса. Она оказалась лишь первой в цепи публикаций, которая протянулась более чем на 10 лет, вплоть до сегодняшнего дня.

McCully et al. [1] выделяли митохондрии из сердца кролика и вводили их в поврежденную при локальной ишемии область изолированного и перфузированного по Лангендорфу сердца перед реперфузией. Такая процедура, названная позднее «митохондриальной трансплантацией», ослабляла снижение основных функциональ-

ных показателей сердца, уменьшала размер области инфаркта и уровень биохимических маркеров повреждения миокарда. Авторы показали, что митохондрии, подвергшиеся замораживанию и оттаиванию, уже не давали защитного эффекта. В этой работе, в отличие от всех последующих, было показано, что введенные митохондрии остаются в межклеточном пространстве и не проникают в кардиомиоциты. Отдельные компоненты митохондрий, включая АТФ и ДНК + РНК, не вызывали какого-либо эффекта, так что механизм защитного действия митохондриальной трансплантации остался не выясненным. Авторы обнаружили, что введение митохондрий снижает уровень окислительного повреждения (измеренный по накоплению продуктов перекисного окисления липидов) в области поражения. Был ли этот «антиоксидантный» эффект первичным или он возникал как результат иного защитного действия митохондрий, осталось не ясно.

В следующей работе, вышедшей лишь через 4 года, McCully et al. [2] показали эффективность митохондриальной трансплантации в модели ишемии/реперфузии сердца кролика *in vivo*. Митохондрии на этот раз выделяли из скелетной (большой грудной) мышцы того же кролика. Введение митохондрий в поврежденную область миокарда после 30 мин локальной ишемии вызывало уменьшение области инфаркта, наблюдавшееся через 2 ч реперфузии и через

4 недели восстановления животных. Серийная эхокардиография показала, что сердце у кролика, получившего инъекцию митохондрий, начало нормально сокращаться уже через 10 мин после начала реперфузии, тогда как в контроле (введение среды для суспендирования митохондрий) гипокинезия в ишемизированной области сохранялась в течение 4 недель.

В этой работе авторы представили доказательства того, что введенные митохондрии проникают в кардиомиоциты. В частности, с помощью флуоресцентной микроскопии фиксированных срезов миокарда они показали, что выделенные митохондрии, окрашенные Митотрекером красным (CMXRos), через 2 ч после введения обнаруживались внутри клеток (как кардиомиоцитов, так и немышечных клеток). Для подтверждения этих наблюдений в сердце кролика были введены митохондрии, выделенные из клеток человека (линия HeLa), что позволило выявить их локализацию с помощью специфических антител.

### ЭКСПЕРИМЕНТЫ *in vitro*

В дополнение к опытам на кроликах McCully et al. исследовали проникновение митохондрий, выделенных из клеток HeLa в изолированные неонатальные (2 дня) кардиомиоциты крысы [2]. Электронно-трансмиссионная микроскопия с использованием меченных золотом антител подтвердила наличие человеческих митохондрий в цитоплазме кардиомиоцитов. Никакой ко-локализации человеческих митохондрий с аутофагосомами и лизосомами в кардиомиоцитах не наблюдалось.

В этой же модели было показано, что совместная инкубация кардиомиоцитов и митохондрий из печени крысы в течение 4 ч вызывала двукратное повышение скорости дыхания клеток. Через 8 ч культивации скорость дыхания снижалась до исходной. Надо отметить, что этот важный опыт имел несколько особенностей. Измерения скорости дыхания проводились в аппарате Seahorse («Seahorse Bioscience», США), где клетки прикреплены к подложке, а концентрация кислорода измеряется в очень малом объеме среды над клетками. Авторы использовали в этих опытах среду, содержащую субстраты дыхания (глутамат, малат и сукцинат), АДФ и 0, 5мМ EGTA (хелатора  $Ca^{2+}$ ), так что дыхание митохондрий, сорбированных на подложке или на поверхности клеток, вполне могло обеспечить наблюдаемый эффект. Полученные результаты позволили авторам предположить, что «митохондриальная трансплантация» восста-

навливает энергетику клеток, поврежденных при ишемии/реперфузии. Это предположение повторялось в дальнейшем во всех многочисленных работах McCully et al., но более надежных данных, подтверждающих эту гипотезу, пока не представлено.

Интересно, что эксперименты с кардиомиоцитами *in vitro* остаются пока единственными из опытов группы McCully, которые были хотя бы частично воспроизведены в других лабораториях. В 2014 г. в работе Kitani et al. [3] наблюдалось проникновение митохондрий в трансформированные кардиомиоциты из эмбрионального сердца крысы (линия H9c2) и в те же клетки, лишенные митохондриальной ДНК (так называемые  $\rho^0$ -клетки). В экспериментах с  $\rho^0$ -клетками введение изолированных митохондрий приводило к повышению скорости дыхания клеток и их выживаемости. В работе, вышедшей в марте 2020 г. [4], клетки H9c2 культивировали с митохондриями, выделенными из тех же клеток или из клеток крысиной линии L6. В обеих работах, в отличие от экспериментов McCully et al. [2], митохондрии добавляли в стандартную среду культивации клеток (DMEM), которая содержала  $>1$  мМ  $Ca^{2+}$ . Та же среда с добавлением пирувата и глутамина была использована для измерения дыхания в аппарате Seahorse. В этих условиях, как мы подробнее обсудим ниже, дыхание внеклеточных митохондрий было невозможно. В обеих работах введение митохондрий вызывало повышение как базовой скорости дыхания клеток, так и максимальной скорости, измеренной в присутствии разбавителя FCCP.

### КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

Лаборатория McCully продолжала интенсивные исследования «митохондриальной трансплантации» в моделях ишемии сердца. В частности, было показано защитное действие митохондрий в модели ишемии на свиньях [5], а также при введении в кровоток через коронарные артерии [6]. Наконец, в 2017 г. детский кардиохирург Ситарам М. Емани (Sitaram M. Emani) совместно с McCully et al. использовали «митохондриальную трансплантацию» для лечения младенцев с ишемическими поражениями сердца [7]. Процедура была проведена на пациентах в возрасте от 2 дней до 2 лет, которые были подключены к аппарату экстракорпоральной мембранной оксигенации (ЭКМО). Аппарат ЭКМО не лечит пациента, но дает время необходимое для лечения. Процедура эта применяется только в самых тяжелых случаях и в педиатрической практике ее применение дольше, чем

на протяжении 72 ч, сопровождается летальностью более 60% [8]. Из пяти пациентов, получивших «митохондриальную трансплантацию», трое успешно перенесли 30–50 ч ЭКМО и оставались в живых на протяжении нескольких месяцев. Погибли младенцы, которые получили «митохондриальную трансплантацию» в возрасте 4 и 6 дней, причем у одного из них наблюдалось значительное улучшение сердечной функции. Коллеги прокомментировали эти достижения со сдержанным оптимизмом [9], а Нью Йорк Таймс опубликовала статью [10], полную душераздирающих деталей. Проведенные процедуры были зарегистрированы в официальном реестре клинических испытаний [11], но последние изменения в реестр были внесены в 2018 г., и графа «Результаты» пока осталась пустой.

### СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ

Лаборатория McCully продолжает исследования на животных. В частности, они показали, что «митохондриальная трансплантация» помогает, даже если проводится до возникновения ишемии [12], а также после периода реперфузии [13]. Кроме того, «митохондриальная трансплантация» оказалась эффективна при ишемическом повреждении скелетных мышц [14] и легких [15]. Последователи McCully успешно использовали «митохондриальную трансплантацию» в модели легочной гипертензии [16, 17], в различных моделях нейробиологических нарушений (см. обзор [18]), нейродегенеративных заболеваний [19], и даже в моделях депрессии [20] и шизофрении [21]. Несмотря на длинную историю и широкий охват этих исследований, вопрос о возможных механизмах терапевтического действия «митохондриальной трансплантации» остается открытым.

### ВОПРОСЫ

Вопросы относительно механизмов, обеспечивающих терапевтическое действие «митохондриальной трансплантации», несомненно, возникли немедленно после первых сообщений McCully et al., но были сформулированы и опубликованы лишь в 2018 г. [22] после появления публикаций о клинических испытаниях. Согласно гипотезе McCully et al., митохондрии сохраняют функциональную активность во внеклеточной среде и, проникая в клетки, восстанавливают в них нарушенную продукцию АТФ. В случае введения митохондрий в кровоток приходится предположить, что интактные

митохондрии, прежде чем попасть в кардиомиоцит, преодолевают еще и эндотелиальный барьер.

Всякому, кто работал с изолированными митохондриями хорошо известно, что в среде, содержащей ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , митохондрии быстро и необратимо теряют способность к синтезу АТФ и дыханию на NAD-зависимых субстратах. Это связано с тем, что дышащие митохондрии имеют высокий мембранный потенциал (минус в матриксе) и переносчик ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , белок MCU. Достаточно микромолярных концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  в среде, чтобы его накопление в митохондриях привело к многократному повышению проницаемости внутренней мембраны для молекул с молекулярной массой до ~1600 кДа. Это явление, получившее название «permeability transition», связано с открытием в мембране гигантских неселективных пор («permeability transition pore, РТР», см. обзор [23]). Для поддержания осмотического баланса в среды инкубации митохондрий добавляют соли или сахара (сахарозу, маннит), но после открытия пор их концентрации между средой и матриксом выравниваются, и митохондрии сильно набухают. При этом сначала разрушается внешняя мембрана (она имеет намного меньшую площадь, чем внутренняя, которая образует складки, так называемые кристы), а затем и внутренняя. При этом не только падает мембранный потенциал, но из матрикса вымывается NAD/NADH, что делает невозможным окисление таких субстратов, как пируват и малат. Даже если во внеклеточной среде, благодаря присутствию белков и полисахаридов, не произойдет полномасштабного набухания митохондрий, открытие пор приведет к необратимому нарушению митохондриальных функций. Существуют многочисленные механизмы, регулирующие открытие пор, но при концентрации ~1,8 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (характерной для крови) ни один из них не способен предотвратить это открытие [23].

Можно представить себе лишь две возможности для митохондрий выжить в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ : можно заблокировать переносчик  $\text{Ca}^{2+}$  или полностью ликвидировать разность потенциалов на мембране. Возможность реализации этих сценариев в крови или в межклеточной среде может быть проверено экспериментально. Первый шаг на этом пути в марте 2020 г. [24] сделали те же авторы, которые впервые сформулировали вопросы к методике McCully et al. [22]. Они показали, что в стандартной солевой среде (140 мМ  $\text{Na}^+$ , 5 мМ  $\text{K}^+$  и 1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ ), имитирующей состав крови, митохондрии из скелетных мышц быстро и необратимо теряли способность окислять пируват и малат, а также синтезировать АТФ. Эти свойства митохондрий сохраня-

лись, если переносчик  $\text{Ca}^{2+}$  был заблокирован. К сожалению, эксперимент с сывороткой крови авторы не поставили, так что призрачные возможности для спасения митохондрий еще остаются.

Второй сложный для гипотезы McCully вопрос состоит в том, как митохондрии, проникшие в клетки, сохраняют свою целостность. McCully et al. исследовали этот вопрос и пришли к выводу, что перенос митохондрий происходит благодаря эндоцитозу [25]. К этому же заключению пришли авторы, которые исследовали проникновение митохондрий в клетки глиомы [26]. Имеются так же указания в пользу макропиноцитоза [3], но в обоих случаях не ясно, как интактные митохондрии попадают в цитоплазму. Не следует путать «митохондриальную трансплантацию» с явлениями межклеточного переноса митохондрий. Предполагается, что такой перенос может происходить при кратковременном слиянии клеток экзосом, содержащих митохондрии, или с помощью мембранных нанотрубок. Как бы то ни было, сохранение целостности митохондрий при межклеточном переносе не представляется неразрешимой задачей.

Для доказательства интактности экзогенных митохондрий, проникших в клетки сердца *in vivo*, McCully et al. использовали митохондрии, нагруженные комплексами железа [5]. Эти комплексы удавалось обнаружить в сердце свиньи через 4 недели после введения митохондрий. Эти данные, однако, нельзя рассматривать как свидетельства интактности митохондрий. Так, известно, что макрофаги могут удерживать подобные комплексы железа в составе фагосом на протяжении недель после введения в сердце стволовых клеток, нагруженных этими комплексами [27]. Более убедительные данные о сохранении функций митохондрий после переноса в клетки были получены *in vitro* [2–4], но переносить их на систему *in vivo* можно лишь с большой осторожностью. Наконец, количество экзогенных митохондрий, которые удавалось обнаружить в кардиомиоцитах после «митохондриальной трансплантации» *in vivo* [2] было значительно меньше, чем в опытах *in vitro* [2–4]. Очень трудно представить, как единичные митохондрии могут компенсировать нарушения энергетики кардиомиоцитов, вызванные повреждением эндогенных митохондрий.

Интересная возможность объяснения терапевтического действия «митохондриальной трансплантации» связана с переносом митохондриальной ДНК. Митохондрии в этом случае могут играть лишь роль контейнеров. Возможность переноса ДНК экзогенных митохондрий

клетки была обнаружена задолго до работ McCully et al. и получила название «митохондриальная трансформация» [28]. Транскрипционная активность и возможность репликации экзогенной ДНК в этих работах не изучалась. Возможность транскрипции экзогенной митохондриальной ДНК была показана на клетках-цибридах, несущих в митохондриальной ДНК мутацию A3243G (которая соответствует митохондриальному заболеванию MELAS-синдром [29]), а также в клетках пациентов с двумя различными мутациями в генах субъединиц Комплекса I [30]. Нельзя исключить, что «митохондриальная трансформация» определяет терапевтическое действие экзогенных митохондрий в некоторых моделях из перечисленных выше. Однако в случае кардиопротекции, описанной McCully et al. [1, 2, 6], улучшение сердечных функций наблюдали уже через 10 мин после введения митохондрий, что позволяет исключить эффект переноса ДНК.

Наконец, еще одна версия состоит в том, что введение митохондрий (даже аутологическое) может приводить к локальному иммунному ответу в области поражения. Известно, что система врожденного иммунитета распознает митохондрии и их компоненты, так же как вторжение патогенов [31]. McCully et al. не обнаружили маркеров воспаления и заметного сдвига в уровне провоспалительных цитокинов в крови кроликов после «митохондриальной трансплантации» [3]. Более того, они не обнаружили иммунного ответа при интраперитонеальном введении митохондрий мышам [31]. Тем не менее нельзя исключить быстрого локального ответа в области введения митохондрий. Этот ответ должен включать привлечение в поврежденную область нейтрофилов и макрофагов, а также выброс широкого спектра цитокинов, которые могли бы стимулировать локальные регенеративные процессы. Эта гипотеза, как нам кажется, нуждается в экспериментальной проверке.

Многочисленные публикации, посвященные применению «митохондриальной трансплантации» в различных моделях, а также сообщения о применении этого подхода в клинике требуют, как нам кажется, всестороннего детального обсуждения. Все результаты, касающиеся кардиопротекторного действия «митохондриальной трансплантации» получены до сих пор в одной единственной лаборатории. Данные о клинических испытаниях крайне ограничены, и их условия принципиально отличаются от экспериментов на животных. В клинике введение митохондрий проводили через несколько (до 15) дней после ишемии в то время, как на

животных этот интервал составлял 2 ч [13]. Предположение о том, что терапевтическое действие «митохондриальной трансплантации» связано с проникновением интактных экзогенных митохондрий в клетки и с восстановлением продукции АТФ, сталкивается с крайне труднопреодолимыми возражениями. Прежде всего, очень трудно представить себе сохранение функциональности митохондрий в средах с высоким содержанием  $\text{Ca}^{2+}$ . Кроме того, невозможно объяснить, как очень малое количество митохондрий, проникших в клетку способно компенсировать нарушения в работе многочисленных эндогенных митохондрий. Альтернативные механизмы действия «митохондриальной трансплантации» исследованы совершенно недостаточно. Возникающие вопросы во многом напоминают проблемы, связанные с несравненно более масштабными исследованиями

действия стволовых клеток. Применительно к кардиопротекции возможные механизмы их действия остаются темой острых дискуссий [32, 33].

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-00-00088).

**Благодарности.** Автор благодарен Р.А. Зиновкину (НИИФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ) за полезное обсуждение работы.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McCully, J. D., Cowan, D. B., Pacak, C. A., Toumpoulis, I. K., Dayalan, H., and Levitsky, S. (2009) Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **296**, H94-H105.
2. Masuzawa, A., Black, K. M., Pacak, C. A., Ericsson, M., Barnett, R. J., Drumm, C., Seth, P., Bloch, D. B., Levitsky, S., Cowan, D. B., and McCully, J. D. (2013) Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **304**, H966-H982.
3. Kitani, T., Kami, D., Matoba, S., and Gojo, S. (2014) Internalization of isolated functional mitochondria: involvement of micropinocytosis, *J. Cell. Mol. Med.*, **18**, 1694-1703.
4. Ali Pour, P., Kenney, M. C., and Kheradvar, A. (2020) Bioenergetics consequences of mitochondrial transplantation in cardiomyocytes, *J. Am. Heart Assoc.*, **9**, e014501.
5. Kaza, A. K., Wamala, I., Friehs, I., Kuebler, J. D., Rathod, R. H., Berra, I., Ericsson, M., Yao, R., Thedsanamoorthy, J. K., Zurakowski, D., Levitsky, S., Del Nido, P. J., Cowan, D. B., and McCully, J. D. (2017) Myocardial rescue with autologous mitochondrial transplantation in a porcine model of ischemia/reperfusion, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **153**, 934-943.
6. Cowan, D. B., Yao, R., Akurathi, V., Snay, E. R., Thedsanamoorthy, J. K., Zurakowski, D., Ericsson, M., Friehs, I., Wu, Y., Levitsky, S., Del Nido, P. J., Packard, A. B., and McCully, J. D. (2016) Intracoronary delivery of mitochondria to the ischemic heart for cardioprotection, *PLoS One*, **11**, e0160889.
7. Emani, S. M., Piekarski, B. L., Harrild, D., Del Nido, P. J., and McCully, J. D. (2017) Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **154**, 286-289.
8. Nasr, V. G., Faraoni, D., DiNardo, J. A., and Thiagarajan, R. R. (2016) Association of hospital structure and complications with mortality after pediatric extracorporeal membrane oxygenation, *Pediatr. Crit. Care Med.*, **17**, 684-691.
9. Hammel, J. M. (2017) Mitochondrial autotransplantation: a "shot" in the dark? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **154**, 290.
10. Kolata, G. (2018) *Dying organs restored to life in novel experiments*, The New York Times, URL: <https://www.nytimes.com/2018/07/10/health/mitochondria-transplant-heart-attack.html>.
11. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02851758>.
12. Guariento, A., Blitzer, D., Doulamis, I., Shin, B., Moskowitsova, K., Orfany, A., Ramirez-Barbieri, G., Staffa, S. J., Zurakowski, D., Del Nido, P. J., and McCully, J. D. (2019) Preischemic autologous mitochondrial transplantation by intracoronary injection for myocardial protection, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, doi: 10.1016/j.jtcvs.2019.06.111, (in press).
13. Blitzer, D., Guariento, A., Doulamis, I. P., Shin, B., Moskowitsova, K., Barbieri, G. R., Orfany, A., Del Nido, P. J., and McCully, J. D. (2020) Delayed transplantation of autologous mitochondria for cardioprotection in a porcine model, *Ann. Thorac. Surg.*, **109**, 711-719.
14. Orfany, A., Arriola, C. G., Doulamis, I. P., Guariento, A., Ramirez-Barbieri, G., Moskowitsova, K., Shin, B., Blitzer, D., Rogers, C., Del Nido, P. J., and McCully, J. D. (2020) Mitochondrial transplantation ameliorates acute limb ischemia, *J. Vasc. Surg.*, **71**, 1014-1026.
15. Moskowitsova, K., Orfany, A., Liu, K., Ramirez-Barbieri, G., Thedsanamoorthy, J. K., Yao, R., Guariento, A., Doulamis, I. P., Blitzer, D., Shin, B., Snay, E. R., Inkster, J. A. H., Iken, K., Packard, A. B., Cowan, D. B., Visner, G. A., Del Nido, P. J., and McCully, J. D. (2020) Mitochondrial transplantation enhances murine lung viability and recovery after ischemia-reperfusion injury, *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.*, **318**, L78-L88, doi: 10.1152/ajplung.00221.2019.
16. Zhou, J., Zhang, J., Lu, Y., Huang, S., Xiao, R., Zeng, X., Zhang, X., Li, J., Wang, T., Li, T., Zhu, L., and Hu, Q. (2016) Mitochondrial transplantation attenuates hypoxic pulmonary vasoconstriction, *Oncotarget*, **7**, 31284-31298, doi: 10.18632/oncotarget.8893.
17. Zhu, L., Zhang, J., Zhou, J., Lu, Y., Huang, S., Xiao, R., Yu, X., Zeng, X., Liu, B., Liu, F., Sun, M., Dai, M., Hao, Q., Li, J., Wang, T., Li, T., and Hu, Q. (2016) Mitochondrial transplantation attenuates hypoxic pulmonary hypertension, *Oncotarget*, **7**, 48925-48940.
18. Nakamura, Y., Park, J. H., and Hayakawa, K. (2020) Therapeutic use of extracellular mitochondria in CNS injury and disease, *Exp. Neurol.*, **324**, 113114.

19. Chang, J. C., Wu, S. L., Liu, K. H., Chen, Y. H., Chuang, C. S., Cheng, F. C., Su, H. L., Wei, Y. H., Kuo, S. J., and Liu, C. S. (2016) Allogeneic/xenogeneic transplantation of peptide-labeled mitochondria in Parkinson's disease: restoration of mitochondria functions and attenuation of 6- hydroxydopamine-induced neurotoxicity, *Transl. Res.*, **170**, 40-56.
20. Wang, Y., Ni, J., Gao, C., Xie, L., Zhai, L., Cui, G., and Yin, X. (2019) Mitochondrial transplantation attenuates lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, **93**, 240-249.
21. Robicsek, O., Ene, H. M., Karry, R., Ytzhaki, O., Asor, E., McPhie, D., Cohen, B. M., Ben-Yehuda, R., Weiner, I., and Ben-Shachar, D. (2018) Isolated mitochondria transfer improves neuronal differentiation of schizophrenia-derived induced pluripotent stem cells and rescues deficits in a rat model of the disorder, *Schizophr. Bull.*, **44**, 432-442.
22. Bertero, E., Maack, C., and O'Rourke, B. (2018) Mitochondrial transplantation in humans: "magical" cure or cause for concern? *J. Clin. Invest.*, **128**, 5191-5194.
23. Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M., and Lippe, G. (2015) The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology, *Physiol. Rev.*, **95**, 1111-1155.
24. Bertero, E., O'Rourke, B., and Maack, C. (2020) Mitochondria do not survive calcium overload during transplantation, *Circ. Res.*, **126**, 784-786.
25. Pacak, C. A., Preble, J. M., Kondo, H., Seibel, P., Levitsky, S., Del Nido, P. J., Cowan, D. B., and McCully, J. D. (2015) Actin-dependent mitochondrial internalization in cardiomyocytes: evidence for rescue of mitochondrial function, *Biol. Open*, **4**, 622-666.
26. Sun, C., Liu, X., Wang, B., Wang, Z., Liu, Y., Di, C., Si, J., Li, H., Wu, Q., Xu, D., Li, J., Li, G., Wang, Y., Wang, F., and Zhang, H. (2019) Endocytosis-mediated mitochondrial transplantation: transferring normal human astrocytic mitochondria into glioma cells rescues aerobic respiration and enhances radiosensitivity, *Theranostics*, **9**, 3595-3607.
27. Terrovitis, J., Stuber, M., Youssef, A., Preece, S., Leppo, M., Kizana, E., Schär, M., Gerstenblith, G., Weiss, R. G., Marbán, E., and Abraham, M. R. (2008) Magnetic resonance imaging overestimates ferumoxide-labeled stem cell survival after transplantation in the heart, *Circulation*, **117**, 1555-1562.
28. Clark, M. A., and Shay, J. W. (1982) Mitochondrial transformation of mammalian cells, *Nature* **295**, 605-607.
29. Chang, J. C., Hoel, F., Liu, K. H., Wei, Y. H., Cheng, F. C., Kuo, S. J., Tronstad, K. J., and Liu, C. S. (2017) Peptide-mediated delivery of donor mitochondria improves mitochondrial function and cell viability in human cybrid cell with the MELAS A3243G mutation, *Sci. Rep.*, **7**, 10710.
30. Kesner, E. E., Saada-Reich, A., and Lorberboum-Galski, H. (2016) Characteristics of mitochondrial transformation into human cells, *Sci. Rep.*, **6**, 26057.
31. Ramirez-Barbieri, G., Moskowitsova, K., Shin, B., Blitzer, D., Orfany, A., Guariento, A., Iken, K., Friehs, I., Zurakowski, D., Del Nido, P. J., and McCully, J. D. (2019) Alloreactivity and allorecognition of syngeneic and allogeneic mitochondria, *Mitochondrion*, **46**, 103-115.
32. Golpanian, S., Wolf, A., Hatzistergos, K. E., and Hare, J. M. (2016) Rebuilding the damaged heart: mesenchymal stem cells, cell-based therapy, and engineered heart tissue, *Physiol. Rev.*, **96**, 1127-1168.
33. Liu, Z., Mikrani, R., Zubair, H. M., Taleb, A., Naveed, M., Baig, M. M. F. A., Zhang, Q., Li, C., Habib, M., Cui, X., Sembatya, K. R., Lei, H., and Zhou, X. (2020) Systemic and local delivery of mesenchymal stem cells for heart renovation: challenges and innovations, *Eur. J. Pharmacol.*, **876**, 173049.

## MITOCHONDRIAL TRANSPLANTATION: A CRITICAL ANALYSIS

B. V. Chernyak

Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,  
119234 Moscow, Russia; E-mail: bchernyak1@gmail.com

Received April 01, 2020

Revised April 01, 2020

Accepted April 03, 2020

"Mitochondrial transplantation" refers to a procedure for introducing isolated mitochondria into a damaged area of a heart or other organ. A considerable amount of data has been accumulated on the therapeutic effects of "mitochondrial transplantation" in animals with ischemic heart damage. In 2017, the first attempts were made to apply this procedure in a clinic. The authors of the method suggest that exogenous mitochondria penetrate into cardiomyocytes, retaining functional activity, and compensate for impaired energy output of endogenous mitochondria. This hypothesis contradicts the well-known fact of loss of mitochondrial functions in the presence of high concentrations of Ca<sup>2+</sup>, which are characteristic of the extracellular medium. This review critically considers the possible mechanisms of the therapeutic effect of "mitochondrial transplantation".

**Keywords:** isolated mitochondria, transfer to cardiomyocytes, ischemia, reperfusion, critical review

## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Ежемесячный международный журнал «Биохимия»/*Biochemistry (Moscow)*, учредителем которого является Российская академия наук, издается и распространяется одновременно на русском и английском языках.

Журнал «Биохимия» публикует работы по всем разделам биохимии, а также концептуально важные работы по биохимическим аспектам смежных областей (молекулярной биологии, биоорганической химии, микробиологии, иммунологии, физиологии, нейробиологии, биомедицинских наук и др.), направленные на понимание молекулярных и клеточных основ биологических процессов. Тематика журнала также охватывает новые экспериментальные методики в области биохимии, теоретические достижения, имеющие значение для биохимии, обзоры современных биохимических тем исследования и мини-обзоры. **Журнал не рассматривает** чисто феноменологические работы, которые описывают изменения биохимических параметров или маркеров биологических процессов **без связи с механизмами**, вызвавшими эти изменения или являющимися следствием таких изменений, а также работы по клонированию и экспрессии (в том числе в трансгенных животных и растениях) индивидуальных генов и материалы по анализу геномных полиморфизмов.

К публикации принимаются законченные оригинальные работы, содержащие новые экспериментальные результаты; методические работы, включающие описание новых методов биохимических исследований; материалы теоретического характера с изложением новых принципов, подходов для решения тех или иных биохимических задач.

Раздел «**Краткие сообщения**» публикует короткие экспериментальные статьи заявочного, приоритетного характера, требующие скорейшей публикации. В сопроводительном письме в редакцию авторам следует мотивировать необходимость ускоренного прохождения материала. Срок публикации таких сообщений 3–4 месяца.

Журнал печатает заказанные редколлегией (или предлагаемые авторами и одобренные редколлегией) **обзоры** по наиболее актуальным проблемам биохимии и смежных наук. К обзорным статьям предъявляются следующие требования: 1) у авторов должны быть **свои работы** по теме обзора; 2) список цитированной литературы должен включать **работы**, опубликованные по данной теме в течение последние 5 лет; 3) обзор не должен быть пересказом или цитирова-

нием фрагментов ранее опубликованных работ, в нем должен быть критический разбор цитируемых материалов и своя концепция, свое видение проблемы, побудившее авторов написать данный обзор. Редакция и рецензенты строго следят за плагиатом!

Раздел «**Дискуссии**» предоставляет авторам возможность опубликовать комментарии, критические замечания и иные соображения по поводу напечатанных ранее на страницах журнала работ, выступить с новой гипотезой. Раздел носит полемический характер и печатает ответные реплики затронутых в публикациях сторон.

Редакция принимает на рассмотрение рукописи, присланные по электронной почте в форме присоединенных файлов (attachment) на адреса редакции [editorial@biochemistrymoscow.com](mailto:editorial@biochemistrymoscow.com) или [ozrina@bio.chem.msu.ru](mailto:ozrina@bio.chem.msu.ru).

Материал статьи – текст, включая резюме на русском и английском языках, список литературы, рисунки с подписями и таблицы – оформляется единым файлом; каждый рисунок дополнительно оформляется отдельным файлом. Если пересылаемый материал велик по объему, следует использовать программы для архивирования.

Все страницы рукописи, в том числе содержащие список литературы, таблицы и подписи к ним, следует пронумеровать; номера строк также следует пронумеровать.

На отдельной странице прилагаются сведения об авторах с указанием адресов, контактных телефонов, факса и электронной почты, а также указывается автор, ответственный за переписку с редакцией и работу с корректурой.

Одновременно с русским желателен представить аутентичный английский вариант рукописи.

При подаче рукописи авторам следует прислать в редакцию **сопроводительное письмо**, в котором надо указать, что: (1) представленный материал (или его части) не был ранее нигде опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях; (2) авторы ознакомились с этическими нормами, предписанными международными соглашениями о публикациях научных статей, и соблюдают их; (3) авторами представлена информация о потенциальных конфликтах интересов; (4) авторы ознакомились с правилами проведения исследований с участием человека и/или животных и соблюдают их; (5) каждый соавтор сообщает о своем согласии на авторство в статье

(см. соответствующие Положения на сайтах журнала и на порталах издательств Springer и Pleiades).

Текст статьи должен быть изложен по возможности сжато и тщательно отредактирован, но без ущерба для ее понимания и воспроизведения результатов.

Рукопись должна быть построена следующим образом: 1) индекс УДК; 2) заглавие; 3) инициалы и фамилии авторов; 4) полные названия учреждений, индекс, город и электронная почта (аффилиация); 5) резюме на русском языке; 6) ключевые слова; 7) краткое заглавие статьи (колонтитул); 8) текст статьи, включающий список цитированной литературы, таблицы, подписи к рисункам; 9) резюме на английском языке (с переводом названия статьи, фамилий авторов, аффилиации и ключевых слов).

При использовании нестандартных сокращений должен быть добавлен раздел *Принятые сокращения*.

*Текст статьи* следует разбить на разделы: 1) Введение, 2) Методы исследования, 3) Результаты исследования, 4) Обсуждение результатов (объединенный раздел «Результаты и их обсуждение» допускается в тех случаях, когда обсуждение невелико по объему), 5) Список литературы; 6) Резюме на английском языке.

Во *введении* кратко излагается история вопроса с обязательным рассмотрением работ, в которых аналогичные или близкие исследования уже проводились, и формулируется цель исследования.

Основное требование к изложению *методов исследования* состоит в том, чтобы процедуры были описаны максимально кратко, но по описанию можно было воспроизвести эксперименты; сюда же должны быть включены использованные в работе материалы, реактивы и приборы с указанием фирмы и страны-производителя, например: глицерин («Sigma-Aldrich», США), электронный микроскоп JEM 100C («JEOL», Япония). Только новые методы следует детально описывать; на ранее опубликованные и общеизвестные достаточно сослаться в списке литературы, указав автора и/или название метода (например, концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [7]). Если метод известен не слишком широко, желательно изложить его принцип и указать автора. **Не допускаются** ссылки на методы по типу «нуклеазу измеряли методом [7]» или «по [7]» (ссылка не может быть самостоятельным членом предложения).

*Результаты исследования* обычно представлены рисунками и таблицами; те эксперименты, которые не нуждаются в документации, описываются в тексте. В этом разделе не следует приводить обсуждение результатов, можно ограничиться объяснением причинно-следственных связей между описываемыми экспериментами.

Раздел «*Обсуждение результатов*» должен содержать интерпретацию результатов (но не их повторение) и сравнение с ранее опубликованными результатами. Желательно основные результаты иллюстрировать простой и наглядной схемой.

В случае необходимости рукопись завершается *заключением*, которое отделяется от раздела «Обсуждение результатов» отбивкой.

В связи с участием журнала в международном Комитете по этике публикаций (Committee on Publication Ethics – COPE) авторам следует внести в конце статьи несколько фраз, демонстрирующих приверженность международным этическим стандартам. Ниже приведены образцы представления соответствующих разделов в заключительной части статьи.

1) Если работа выполнена при поддержке какой-либо организации, в разделе «Финансирование» следует указать, каким фондом и грантом поддержано данное исследование и каждая часть работы в отдельности, если источники финансирования разные. Следует приводить полные названия институтов и организаций-спонсоров.

2) В разделе «Благодарности» по желанию авторов сообщается информация о любой помощи в проведении работы и подготовке статьи: о полезных обсуждениях и дискуссиях, благодарности коллегам; о предоставлении материалов, научных данных, компьютерного оборудования, приборов; о проведении исследований в центрах коллективного пользования; о помощи в технической подготовке текста. Приветствуется описание роли каждого из авторов публикации.

3) В разделе «Конфликт интересов» авторы заявляют о наличии или отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере. Данный раздел является обязательным.

4) Обязательным является также раздел «Соблюдение этических норм». Если исследования проводились на животных, то в данном разделе указывается: «Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций».

Если исследования проводились с участием людей, то в разделе «Соблюдение этических норм» указывается: «Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие».

Если в статьях не содержится описания исследований с участием людей или использова-

нием животных и выполненных кем-либо из авторов, в разделе «Соблюдение этических норм» указывается: «Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов».

5) Если статья содержит персональную информацию об участниках исследования, то необходимо включить следующее положение в раздел «Информированное согласие»: «От всех участников, чья персональная информация содержится в этой статье, получено дополнительное письменное добровольное согласие».

Список цитируемой литературы должен быть максимально кратким (не более 100 ссылок), но содержащим ссылки на все принципиально важные последние публикации по данному вопросу.

Список литературы печатается как отдельный раздел рукописи с указанием фамилий и инициалов всех авторов, названия цитируемой статьи и выходных данных. Кроме этого, желательно дать DOI статьи. Ниже приводятся примеры ссылок на журналы, книги, сборники, диссертации.

1. Beltrami, C., Besnier, M., Shantikumar, S., Shearn, A. I. U., Rajakaruna, C., Laftah, A., Sessa, F., Spinetti, G., Petretto, E., Angelini, G. D., and Emanuelli, C. (2017) Human pericardial fluid contains exosomes enriched with cardiovascular-expressed microRNAs and promotes therapeutic angiogenesis, *Mol. Ther.*, **25**, 679–693, doi: 10.1016/j.yjthe.2016.12.022.
2. Sloan-Dennison, S., and Schultz, Z. D. (2018) Label-free plasmonic nanostar probes to illuminate *in vitro* membrane receptor recognition, *Chem. Sci.*, **10**, 1807–1815, doi: 10.1039/c8sc05035j.
3. Анисимов В. Н. (2008) *Молекулярные и физиологические механизмы старения*, Наука, СПб.
4. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
5. Tanphaichitr, V. (2001) in *Handbook of vitamins* (Rucker, R., and Suttie, J., eds), Marcell Dekker, N.Y., pp. 275–316.
6. Гендролис А. А., Серебрянников Н. В., Гандель В. Г. (1978) В кн. Простагландины (под ред. Ажгихина И. С.), Медицина, Москва, с. 332–347.
7. Гандельман О. А. (1992) *Кинетика и механизм биолюминесцентного окисления люциферина светляков*. Дис. канд. хим. наук, МГУ, Москва.
8. Rosenkranz, A. A., Slastnikova, T. A., Durymanov, M. O., and Sobolev, A. S. (2013) Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor, *Biochemistry (Moscow)*, **11**, 1228–1237, doi: 10.1134/S0006297913110035.

В конце статьи дается резюме на английском языке, являющееся аутентичным переводом заглавия статьи, инициалов и фамилий авторов в английской транскрипции, названий учреждений с индексами, названиями городов и адресами электронной почты, текста аннотации и ключевых слов.

Объем экспериментальной статьи, включая список литературы, таблицы, рисунки (3 рисун-

ка считаются за 1 страницу) и подписи к ним, резюме на английском языке, не должен превышать 20 машинописных страниц, количество рисунков — не более 8; краткое сообщение — не более 12 страниц (включая не более 4 рисунков и/или таблиц); мини-обзор — не более 16 страниц (включая не более 5 рисунков); обзор — не более 35 страниц (включая не более 8 рисунков); сообщения в разделе «Дискуссии» — до 4 страниц.

Текстовые файлы следует представлять в формате Microsoft Word (версия 6.0 и более поздние), шрифты для основного текста — Times New Roman и Symbol, размер букв 12, полтора интервала, в одну колонку без выравнивания по правому краю, без переноса слов, с полями 3 см с левой стороны, на странице — не более 30 строк.

Таблицы следует приводить в тех случаях, когда данные не могут быть приведены в тексте.

Каждая таблица оформляется на отдельной странице и имеет свой заголовок. Колонки в таблице должны быть озаглавлены, с указанием через запятую размерности приводимых величин. Необходимо стремиться к максимальной краткости заголовков колонок, не давать величин, легко выводимых из имеющихся (например, разность или проценты). Повторение одних и тех же данных в тексте, в таблицах или на рисунках не допускается.

Таблицы принимаются только в формате Word (doc, docx). Если таблицы содержат графические вставки, эти вставки следует прислать в виде отдельных графических файлов высокого качества.

Рисунки с подрисовочными подписями следует располагать в тексте по месту ссылки на каждый рисунок. Кроме того, рисунки должны быть представлены в виде отдельных файлов, удовлетворяющих следующим требованиям:

— для схем и графиков без полутоновых вставок: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в черно-белом режиме (Line-art, Black-and-White, Bitmap). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg;

— для полутоновых рисунков или графиков с полутоновыми вставками: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в полутоновом черно-белом режиме (градации серого — Grayscale). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg;

— для цветных рисунков: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в цветном режиме CMYK (для цветной печати), RGB (для цветных рисунков в электронной версии). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg.

— независимо от типа графики, рисунок должен обладать высоким реальным разрешением: не

ниже 300 dpi для полутоновых иллюстраций; не ниже 600 dpi для штриховых и смешанных (полутоновых/штриховых) иллюстраций. Пикселизация изображений в форматах растровой графики не должна быть грубой. Линии рисунков должны быть толщиной не менее 3 пунктов (point). Следует избегать чрезмерно мелких обозначений (букв, цифр, значков и т.д.). Пикселизированные (растровые) рисунки не следует вставлять в документ Word или переводить в формат PDF, так как это ухудшает их качество;

- рисунки должны иметь размеры, соответствующие их информативности. Размер рисунка на одну колонку не должен быть менее 8 см; на две колонки – менее 17 см. Рисунки не должны быть чрезмерно крупными;

- векторные иллюстрации не должны содержать точечных закрасок, таких как «Noise», «Black&white noise», «Top noise». Для векторной графики все использованные шрифты должны быть включены в файл;

- шрифты внутри рисунков выбираются из гарнитуры Arial размером 9 пунктов;

- следует избегать сканирования рисунков из книг и других печатных изданий, так как такие файлы дают низкое качество при печати и имеют неоправданно большой размер.

**Несоблюдение правил** подготовки графического материала приводит к необходимости переработки рисунков авторами и задержке публикации рукописи.

**Дополнительные материалы к статьям.** Для более полного описания исследования к статье могут прилагаться дополнительные материалы (аудио- и видеофайлы, презентации, дополнительные таблицы, рисунки и пр.) при условии, что автор является правообладателем прилагаемых материалов. Дополнительные материалы публикуются только в электронной версии журнала на сайте: <http://link.springer.com>, а также на сайте журнала: <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>. При наличии дополнительных материалов в тексте необходимо разместить ссылку на Приложение к статье.

Все **физические величины** рекомендуется приводить в международной системе СИ.

Поступившей в редакцию правильно оформленной рукописи присваивается регистрационный номер и фиксируется дата поступления, о чем редакция информирует авторов по электронной почте. **Рукописи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам без рассмотрения.**

**Рецензирование.** При подаче рукописи авторы могут указать двух потенциальных рецензентов (ФИО, адрес электронной почты) из числа специ-

алистов в данной области исследований, а также тех, чье участие в рецензировании нежелательно.

Все рукописи рассматривает Ответственный ученый секретарь (Executive Editor-in-Chief) и направляет Ответственному Редактору по соответствующей конкретной области исследований; он, в свою очередь, указывает двух-трех специалистов для рецензирования рукописи. Список Ответственных Редакторов и членов редколлегии размещен на сайтах журнала, а также на порталах Pleiades и Springer.

Рукопись, получившая высшую оценку двух независимых рецензентов, печатается со специальной пометкой **«Ускоренная публикация»** (срок публикации – 3–4 месяца).

В случае необходимости рукопись направляется авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, после чего она повторно рецензируется, и редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости рукописи для публикации.

В журнале принято «одностороннее слепое рецензирование» (single blind review), т.е. авторам недоступны имена рецензентов, и редакция строго соблюдает конфиденциальность рецензентов. Все редакционные письма авторам идут за подписью Ответственного ученого секретаря журнала.

Через месяц после сдачи очередного выпуска журнала в печать редакция рассылает авторам по электронной почте корректуру статьи в виде PDF-файла и инструкцию по работе с ней. **На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц.**

Каждый выпуск журнала готовится одновременно на русском и английском языках. Перевод статей осуществляет группа высококвалифицированных переводчиков-биохимиков. В ходе работы у переводчиков часто возникает необходимость связаться с авторами и устранить неточности в русском тексте статьи. Согласованные с авторами исправления вносятся и в русский, и в английский тексты на стадии корректуры.

Авторы, достаточно хорошо владеющие профессиональным английским языком, представляют в редакцию свой **аутентичный** перевод статьи.

Переводы редактируются английской редакцией журнала, подготовленный текст направляется авторам для корректировки.

После выхода журнала в свет редакция рассылает авторам отписки русского и английского вариантов статей в виде PDF-файлов.

(С полным текстом Правил для авторов можно ознакомиться на сайте журнала: <https://www.biochemistrymoscow.com>.)