

СОДЕРЖАНИЕ

Том 87, № 5, 2022

| | |
|--|-----|
| Структура и полиморфизм амилоидных и амилоидоподобных агрегатов (обзор) <i>А.Б. Матиив, Н.П. Трубицина, А.Г. Матвеевко, Ю.А. Барбитов, Г.А. Журавлева, С.А. Бондарев</i> | 587 |
| RsfS – фактор гибернации или фактор биогенеза рибосомы? (обзор) <i>Б.Ф. Фатхуллин, А.Г. Габдулхаков, М.М. Юсупов</i> | 603 |
| Рациональный дизайн одноцепочечного олигодезоксирибонуклеотида, используемого для коррекции мутаций при геномном редактировании <i>О.В. Володина, А.А. Анучина, М.И. Зайнитдинова, Н.А. Евтушенко, А.В. Лавров, С.А. Смирнихина</i> | 617 |
| Формирование наночастиц оксида железа во внутренней полости ферритин-подобного белка Dps. Исследование с помощью аномальной дисперсии рентгеновских лучей <i>Э.В. Штыкова, М.В. Петухов, А.А. Можжаев</i> | 627 |
| Полиэкстремофильные эукариоты Cyanidiales (обзор) <i>И.Н. Стадничук, И.В. Тропин</i> | 642 |
| Увеличение внеклеточной концентрации натрия как фактор регуляции экспрессии генов в эндотелии <i>Д.А. Федоров, С.В. Сидоренко, А.И. Юсипович, О.В. Букач, А.М. Горбунов, О.Д. Лопина, Е.А. Климанова</i> | 660 |
| Правила для авторов | 674 |

АНОНС

| | |
|---|-----|
| Специальный выпуск, посвященный памяти А.Д. Виноградова | 688 |
|---|-----|

CONTENTS

Vol. 87, Issue 5, 2022

| | |
|--|-----|
| Structure and Polymorphism of Amyloid and Amyloid-Like Aggregates (Review) <i>A. B. Matiiv, N. P. Trubitsina, A. G. Matveenko, Y. A. Barbitoff, G. A. Zhouravleva, and S. A. Bondarev</i> | 587 |
| Is RsfS a Factor of Hibernation or a Factor of Ribosome Biogenesis? (Review) <i>B. F. Fatkhullin, A. G. Gabdulkhakov, and M. M. Yusupov</i> | 603 |
| Rational Design of SSODN to Correct Mutations by Gene Editing <i>O. V. Volodina, A. A. Anuchina, M. I. Zainitdinova, N. A. Evtushenko, A. V. Lavrov, and S. A. Smirnikhina</i> | 617 |
| Formation of Iron Oxide Nanoparticles in Internal Cavity of Ferritin-Like Dps Protein. Investigation with Anomalous Dispersion of X-Rays <i>E. V. Shtykova, M. V. Petoukhov, and A. A. Mozhaev</i> | 627 |
| Polyextremophilic Eucaryotes Cyanidiales (Review) <i>I. N. Stadnichuk and I. V. Tropin</i> | 642 |
| Increased Extracellular Sodium Concentration as a Factor Regulating Gene Expression in Endothelium <i>D. A. Fedorov, S. V. Sidorenko, A. I. Yusipovich, O. V. Bukach, A. M. Gorbunov, O. D. Lopina, and E. A. Klimanova</i> | 660 |
| Instructions to Authors | 674 |

ANNOUNCEMENT

| | |
|---|-----|
| Special Issue Dedicated to the Memory of A. D. Vinogradov | 688 |
|---|-----|

УДК 577.112.7

СТРУКТУРА И ПОЛИМОРФИЗМ АМИЛОИДНЫХ И АМИЛОИДОПОДОБНЫХ АГРЕГАТОВ

Обзор

© 2022 А.Б. Матиив¹, Н.П. Трубицина¹, А.Г. Матвеев¹,
Ю.А. Барбитов^{1,2}, Г.А. Журавлева^{1,3}, С.А. Бондарев^{1,3*}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии,
199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: stanislavspbg@gmail.com

² Институт биоинформатики, 197342 Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, научная лаборатория биологии амилоидов,
199034 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 28.09.2021

После доработки 08.04.2022

Принята к публикации 09.04.2022

Амилоиды – это белковые агрегаты с кросс- β -структурой. Интерес к изучению амилоидов, с одной стороны, связан с их ролью в развитии ряда социально значимых нейродегенеративных заболеваний человека, а с другой – с обнаружением функциональных амилоидов, образование которых является неотъемлемой частью некоторых клеточных процессов. На сегодняшний день известно более сотни белков с амилоидными свойствами. Активные исследования структурной организации агрегатов выявляют самые разнообразные варианты конформации белков в их составе. В обзоре мы собрали примеры этого разнообразия, рассмотрев укладку белка в амилоидоподобных агрегатах. Существенная часть статьи посвящена характерным особенностям структуры этих белковых комплексов, которые определяют необычные свойства амилоидов, в том числе их взаимодействие с амилоид-специфическими красителями и стабильность. В обзоре также описаны многочисленные примеры разнообразия амилоидных агрегатов и его значения для живых организмов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кросс- β -структура, амилоиды, амилоидоподобные агрегаты, полиморфизм амилоидов.

DOI: 10.31857/S0320972522050013, **EDN:** ASQTGJ

ВВЕДЕНИЕ. КРОСС- β -СТРУКТУРА

Амилоиды – это белковые агрегаты с кросс- β -структурой, которые могут обладать рядом необычных свойств, таких как устойчивость к обработке детергентами, протеазами, а также взаимодействие с амилоид-специфическими красителями [1–4]. Согласно рекомендациям номенклатуры ISA (International Society of Amyloidosis) [1], именно наличие доказанной кросс- β -структуры является наиболее убедительным параметром, который позволяет называть белковый агрегат амилоидом. Демонстрация других перечисленных свойств позволяет

говорить только об амилоидоподобных агрегатах [1–4].

Амилоидные агрегаты имеют фибриллярную морфологию, при этом отдельные фибриллы могут включать несколько протофибрилл, которые закручены друг относительно друга [5]. В протофибриллах белковые молекулы собраны в «стопки» и формируют так называемую кросс- β -структуру. В её составе β -тяжи ориентированы перпендикулярно оси протофибриллы и расположены на характерном расстоянии друг от друга (рис. 1, а). Просвет между β -тяжами в составе одного β -слоя (β -листа) составляет 4,7–4,8 Å, при этом в протофибрилле присутствует минимум два β -слоя, расстояние между которыми порядка 10 Å (рис. 1, а). Такие повторяющиеся элементы, расположенные на фиксированных расстояниях друг от друга (4,7–4,8 и 10 Å), создают регулярную структуру. В экспериментах по дифракции электронов или рентгеновских лучей она обладает характерной картиной с двумя меридиональными и двумя экваториальными

Принятые сокращения: крио-ЭМ – метод криоэлектронной микроскопии; A β – β -амилоид; LARKS – структуры типа изогнутых β -листов, в составе которых преобладают ароматические аминокислотные остатки (от англ. low-complexity aromatic-rich kinked segments); PHF – парные спиральные филаменты; PrP – прионный белок; SF – прямые филаменты; TTR – транстиретин.

* Адресат для корреспонденции.

отражениями, которые соответствуют просветам между β -тяжами и β -листами [6].

Структурные особенности амилоидов также определяют их способность взаимодействовать с амилоид-специфическими красителями (например, тиофлавином Т и Конго красным), хотя точные данные о локализации и организации сайтов связывания этих красителей отсутствуют [6, 7]. Известно, что молекулы этих красителей в комплексе с агрегатами ориентированы

вдоль оси фибрилл [8, 9]. Две основные гипотезы сходятся на том, что красители встраиваются в бороздки вдоль амилоидных фибрилл, но отличаются с точки зрения расположения этих сайтов связывания. Согласно наиболее популярной точке зрения, эти бороздки образованы боковыми группами аминокислот (рис. 1, б, модель 1) [8]. Эта гипотеза согласуется с данными о взаимодействии тиофлавина Т с химерным белком PSAM (от англ. peptide self-assembly

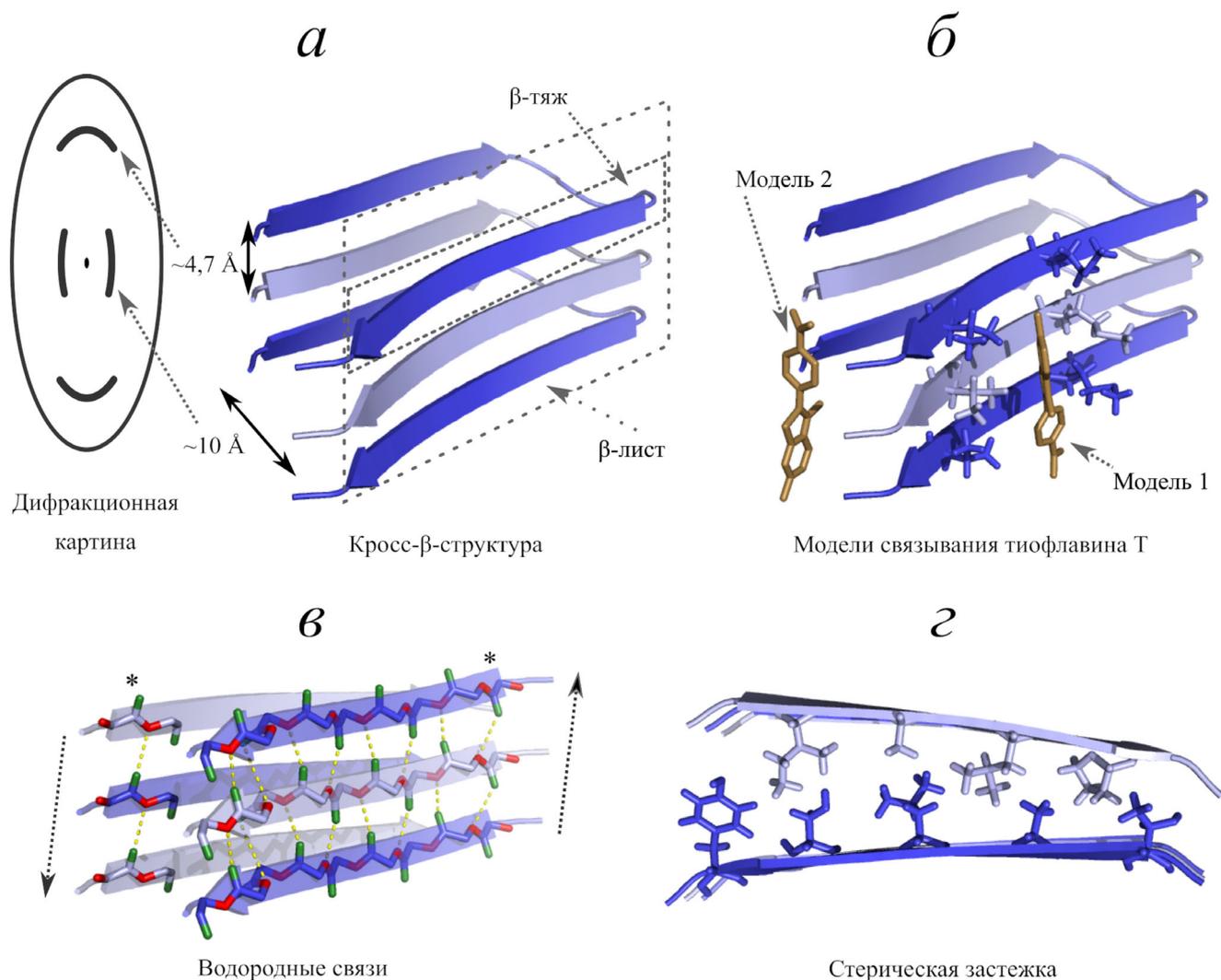


Рис. 1. Структурные основы амилоидных свойств. Расстояния между β -тяжами и β -листами в амилоидных агрегатах с кросс- β -структурой и соответствующая схема дифракционной картины (а). Цветами здесь и далее обозначены разные молекулы белка, чередующиеся в составе фибриллы. Две модели взаимодействия амилоид-специфических красителей с фибриллами на примере тиофлавина Т (б). Сайт связывания может располагаться в бороздке на стыке соседних β -листов (модель 2) либо между боковыми цепями аминокислот в составе одного β -листа (модель 1). Схема расположения водородных связей (жёлтые пунктирные линии) внутри межмолекулярных β -листов, обеспечивающих стабильность всей структуры (в). Соседние β -листы на схеме антипараллельны друг другу с точки зрения ориентации водородных связей между одинаковыми аминокислотами в пептидах, которые отмечены «*». Пунктирные стрелки обозначают условные направления β -листов. Пример плотной упаковки аминокислотных остатков внутри амилоидной структуры, наличие таких стерических застёжек между β -листами увеличивает стабильность всей структуры (г). PDB ID структур, использованных при подготовке рисунка: 2BEG (а и б) и 2M5N (в и г). Оптимальное расположение молекулы тиофлавина Т было рассчитано в программе AutoDock Vina [34]

mitic), в структуре которого присутствует β -лист, имитирующий внешнюю поверхность амилоидной фибриллы [10]. Стоит отметить, что в этой модели повторяющиеся β -тяги в составе β -листа антипараллельны друг другу, что не характерно для большинства амилоидных агрегатов с известной структурой (более подробно это будет освещено далее). Согласно другой гипотезе, аналогичные сайты для связывания красителей могут быть расположены на стыке двух β -листов (рис. 1, б, модель 2) (в частности, такой способ взаимодействия был предложен для красителя Конго красный [11]). Молекулярный докинг (рис. 1, б, модель 2) свидетельствует о том, что эта гипотеза применима и для тиофлавина Т. Кроме этого, существует предположение, что молекулы красителей могут взаимодействовать с амилоидными фибриллами в местах латеральных контактов между протофибриллами [12]. В совокупности существующие экспериментальные данные не позволяют сделать однозначных выводов в пользу одной из перечисленных моделей. Для некоторых амилоидов было предположено наличие разных сайтов связывания тиофлавина Т [13, 14]. Более того, агрегаты одного и того же белка могут отличаться по способности связывать этот краситель. Так, например, агрегаты Sup35(1–61)-GFP, полученные *in vitro* с использованием лизатов дрожжей с разными вариантами приона [PSI^+], отличаются по аффинности к тиофлавиону Т [15]. Тем не менее очевидно, что именно особая структура амилоидных агрегатов даёт им возможность связывать такие красители вне зависимости от последовательности конкретного белка. Однако существуют примеры амилоидных фибрилл, не связывающих тиофлавин Т, например, агрегаты белка Sup35 *Yarrowia lipolytica* [16].

Несмотря на широкое использование амилоид-связывающих красителей, вопрос об их специфичности все ещё актуален. Например, тиофлавин Т имеет сродство к фибриллярным агрегатам PSM α 3, которые не обладают кросс- β -структурой [17]. Также флуоресценция этого красителя возрастает при связывании с дву- и однонитевой ДНК, а также РНК [18, 19]. В настоящее время тиофлавин Т используется также в качестве сенсора различных структур нуклеиновых кислот: G-триплексов и квадруплексов, гуанидин-обогащённых участков и др. [20]. Конго красный называют «золотым стандартом» для детекции амилоидов [1–4, 21], однако и для него есть примеры связывания с неамилоидными белками [22–24].

Важным свойством структуры ряда амилоидов является её повышенная стабильность по

сравнению с мономерным белком или другими видами агрегатов при различных воздействиях: нагревании, обработке детергентами или протеазами. Высокая стабильность амилоидных агрегатов основана на двух особенностях. Во-первых, это большое количество межмолекулярных водородных связей между пептидными цепями (рис. 1, в). Взаимодействия между остатками полярных аминокислот, таких как аспарагин и глутамин, дополнительно стабилизируют структуру [5]. Во-вторых, соседние β -листы в составе амилоидов тесно взаимодействуют друг с другом по всей длине благодаря «стерическим застёжкам» (steric zipper) – плотно прилегающим друг к другу поверхностям, образованным боковыми радикалами аминокислот (рис. 1, г), которые заполняют всё пространство между белковыми цепями. В результате между β -листами практически не остаётся «пустого» пространства и каких-либо молекул, в том числе воды, поэтому внутреннюю сторону β -листов в кросс- β -структуре иногда называют «сухой» [5, 25, 26]. Кроме этого, в стабилизации амилоидной структуры могут играть роль ионные взаимодействия между аминокислотными остатками с различными зарядами, расположенными «внутри» фибриллы [5].

С другой стороны, описаны примеры термолabileльных агрегатов с кросс- β -структурой (например, FUS и hnRNPA1 человека). Они принципиально отличаются организацией стерической застёжки. Такие агрегаты сформированы неупорядоченными доменами с низким аминокислотным разнообразием (low complexity domains, LC-домен), а ключевую роль в их обратной агрегации играют остатки тирозина [27].

Трёхмерная структура термолabileльных агрегатов, формируемых отдельными пептидами FUS, была независимо расшифрована в 2018 г. [28, 29]. В отличие от стерической застёжки, пептиды FUS и hnRNPA1 формируют структуры типа изогнутых β -листов, в составе которых преобладают ароматические аминокислотные остатки. Такие изогнутые структуры получили название LARKS (от англ. low-complexity aromatic-rich kinked segments). В фибриллах, сформированных LARKS, взаимодействия между листами в составе фибриллы происходят за счёт полярных остатков серина и тирозина. В то же время изгибы в таких структурах предотвращают плотные взаимодействия между цепями по всей длине, сокращая длину контактной поверхности между соседними белковыми цепями. Присутствие изгибов также позволяет иным молекулам взаимодействовать с белковыми цепями в непосредственной близости от контактной поверхности, что нехарактерно для классической структуры типа стерической застёжки.

Пептиды FUS и hnRNPA1, соответствующие LARKS, формируют амилоидные агрегаты с характерной кросс- β -структурой, которые растворяются при нагревании [29, 30]. В составе одного из таких обратимых амилоидных коров, FUS-RAC2, присутствует молекула воды, формирующая водородные связи с гидроксильными группами остатков тирозина [29]. Наличие воды непосредственно на контактной поверхности подчёркивает значительное отличие структуры фибрилл, сформированных LARKS, от классической структуры амилоидной фибриллы, контактная поверхность которой является «сухой».

LARKS обнаружены в большом количестве белков у различных организмов, причём их представленность в протеомах варьирует [28, 31]. В протеоме человека наибольшее количество LARKS в составе LC-доменов наблюдается в белках, входящих в состав немембранных органелл и способных к фазовым переходам (например, белки стресс-гранул, телец Кахалья и др.) [31]. Такие белки обычно содержат несколько LARKS (9 – в случае hnRNPA2, 11 – в случае FUS). За счёт большого количества таких сегментов эти белки способны к мультивалентным межмолекулярным взаимодействиям, критичным для формирования гидрогелей.

Стерические застёжки и LARKS являются широко известными, но не единственными структурными элементами амилоидных фибрилл. Существует также концепция, согласно которой большинство амилоидных агрегатов состоит из мотивов β -тяж–поворот– β -тяж, названных β -арками [32]. Пример стопки из β -арок

представлен на рис. 1, а. Подобные структурные элементы также часто встречаются среди β -соленоидов [33].

ПОЛИМОРФИЗМ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ

Разнообразие моделей структуры протофибрилл. Существуют три основные модели, описывающие различные варианты кросс- β -структуры (рис. 2). Примеры белков, агрегаты которых характеризуются различными типами структуры, представлены в таблице. Отличия между ними касаются ориентации β -тяжей в β -листах: они могут быть параллельными и антипараллельными. Кроме этого, в отдельную группу выделяют структуры β -соленоидов или β -спиралей: β -тяжи в них параллельны друг другу и «закручены» вокруг оси фибриллы. Благодаря этому могут образовываться не только меж-, но и внутримолекулярные β -листы. В результате в одном β -листе рядом друг с другом могут быть расположены пептиды как из одной молекулы, так и из разных. В случае параллельной и антипараллельной кросс- β -структуры все β -листы межмолекулярные (рис. 2) [5, 35].

Отдельно хотелось бы отметить, что существует целый ряд белков, которые формируют β -соленоиды сами по себе, т.е. для этого не требуется их агрегация [64]. Белок TSP бактериофага P22 является одним из таких примеров [65]. Полноразмерный белок может формировать тримеры, которые устойчивы к детергентам

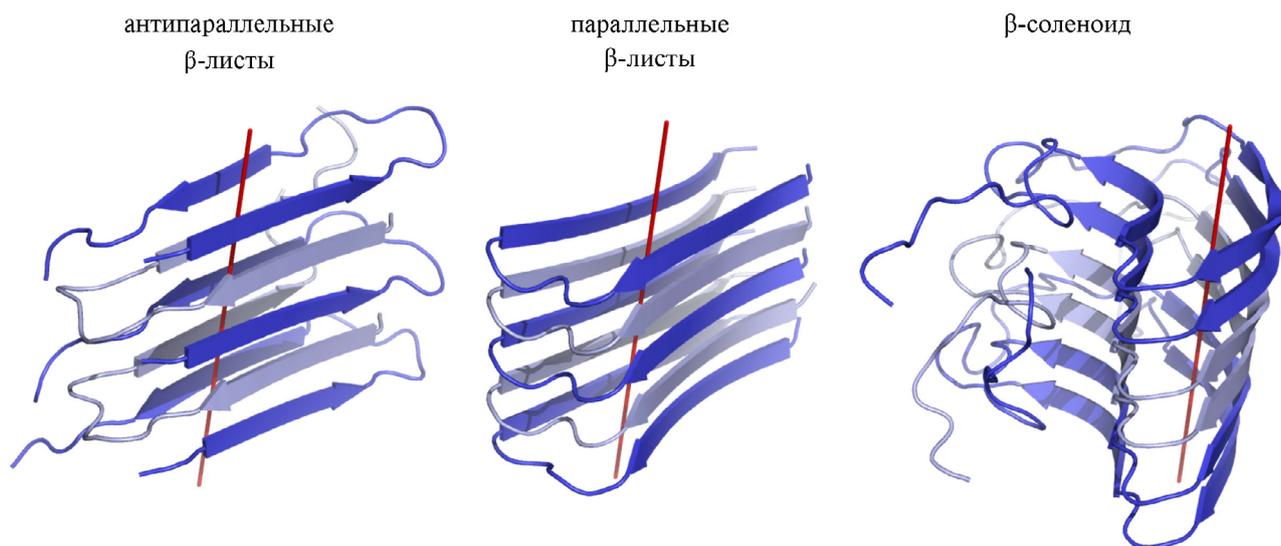


Рис. 2. Примеры моделей кросс- β -структуры амилоидов. Цветами выделены чередующиеся молекулы белка. Красной линией отмечена условная ось фибриллы. Идентификаторы структур, использованных при подготовке рисунка, в базе данных PDB ID: 2LNQ, 2BEG и 2KJ3

Примеры белков и различных типов структур

| Белок | Вариант структуры | PDB ID трёхмерной структуры (при наличии) и ссылка |
|--|--|--|
| β -амилоид (A β) | антипараллельные β -листы | 2KJ3 [36] |
| A β | параллельные β -листы | 5OQV, 2BEG [37] |
| A β | смешанная (антипараллельные и параллельные β -листы) | [38] |
| CfAFP-501 | β -соленоид | [39] |
| Прионный белок (PrP) | β -соленоид | [40] |
| PrP | параллельные β -листы | [41] |
| NET-s (218–289) | β -соленоид | 2RNM, 2KJ3 [40, 42] |
| Пектат лиаза C (118–285) | β -соленоид | 2PEC [40] |
| Tau | β -соленоид | [43] |
| Tau | параллельные β -листы | 5O3L [40] |
| Pmel17 | β -соленоид | [44] |
| TDP-43 | параллельные β -листы | [45] |
| Ure2 | параллельные β -листы | [46] |
| α -синуклеин | параллельные β -листы | 2N0A [47] |
| α -синуклеин | антипараллельные β -листы | [47] |
| CRES (Cystatin-Related Epididymal Spermatogenic) | антипараллельные β -листы | [48] |
| Кальцитонин | антипараллельные β -листы | [49] |
| Амилин | смешанная (антипараллельные и параллельные β -листы) | [50] |
| Легкая цепь иммуноглобулина | параллельные β -листы | [51] |
| Sup35 | параллельные β -листы | [52] |
| Sup35 | β -соленоид | [53] |
| Rnq1 | параллельные β -листы | [54] |
| Otb2 | параллельные β -листы | [55] |
| IAPP | параллельные β -листы | [56] |
| Хвостовой шип P22 | β -соленоид | [57] |
| CA150 | параллельные β -листы | [58] |
| β 2-микроглобулин | ядро фибриллы из β -листов | [59] |
| β 2-микроглобулин (20–41) | параллельные β -листы | [58] |
| Транстретин (TTR) | параллельные β -листы | 2M5N, 2M5K, 2M5M, 3ZPK [60] |
| SOD1(28–38) | β -штопор | 5IHW [61] |
| PSM α 3 | кросс- α -структура | 6GQC [62] |
| MAVS | состыкованные глобулярные молекулы | 3J6C [63] |

[66], а его домен Vhх, который формирует β -соленоид, способен образовывать фибриллы, окрашивающиеся Конго красным и демонстрирующие яблочно-зелёное двулучепреломление [67], что является характерным свойством амилоидных агрегатов [3].

В литературе термин «антипараллельная кросс- β -структура», к сожалению, используется в разных значениях. Наиболее популярный вариант описывает взаимную ориентацию β -тя-

жей в составе одного β -листа (рис. 2) [68]. Тем не менее этот же термин можно встретить для обозначения «направления» смежных β -слоёв, если водородные связи в них ориентированы в противоположные стороны (рис. 1, в) [5].

Кроме трёх рассмотренных примеров структурной организации амилоидов, существуют и другие модели, которые скорее характерны для амилоидоподобных агрегатов. Мы также рассматриваем их, поскольку эти фибриллы обла-

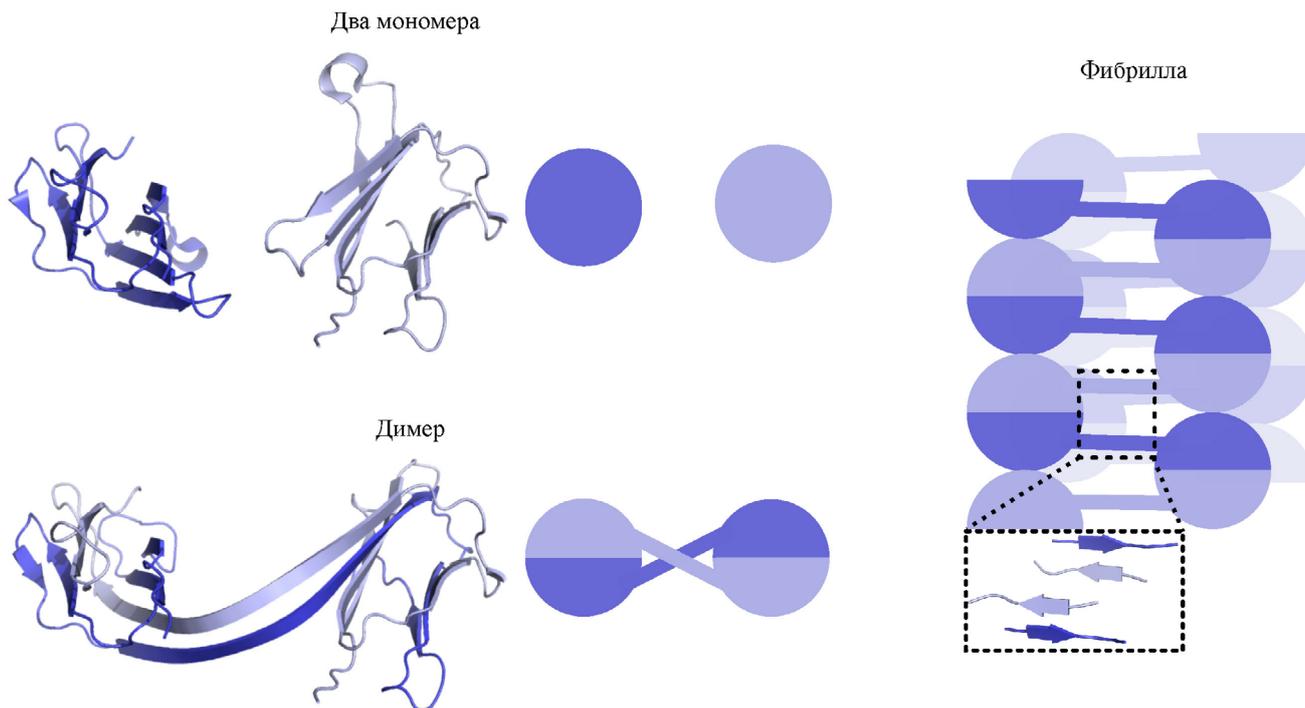


Рис. 3. Модель фибрилл β 2-микроглобулина. Цветами выделены чередующиеся молекулы белка. Идентификаторы структур, использованных при подготовке рисунка, в базе PDB ID: 1LDS, 3LOW и 3LOZ

дают некоторыми общими с амилоидами свойствами, хотя не являются ими с точки зрения традиционного определения. В частности, существует гипотеза, что мономерные β 2-микроглобулина «стыкуются» друг с другом в составе агрегата, сохраняя структуру, характерную для мономеров и димеров этого белка (рис. 3). Расшифровка этих структур показала, что при взаимодействии белки «обмениваются» фрагментами, т.е. участок одной молекулы встраивается в структуру другой и наоборот. Такой механизм взаимодействия не обязательно ограничивается двумя молекулами и может лежать в основе формирования более протяжённых фибрилл. Любопытно, что такие агрегаты полноразмерного белка демонстрируют дифракционную картину, характерную для кросс- β -структуры. Однако в данном случае высокая стабильность таких полимеров обеспечивается не водородными, а дисульфидными связями в участках «обмена» доменами [69]. Отдельно стоит отметить, что для β 2-микроглобулина было убедительно продемонстрировано взаимодействие с амилоид-специфическими красителями (тиофлавином Т и Конго красным) [70]. Аналогичная структура была предложена и для ряда других белков [35], однако споры о её роли именно в образовании амилоидных агрегатов продолжаются.

Для некоторых белковых агрегатов, обладающих рядом амилоидных свойств, экспериментально показаны принципиально другие варианты укладки белка, которые отличаются от описанной выше кросс- β -структуры. В частности, пептиды белка SOD1 формируют структуру, которая получила название β -штопора. Она образована антипараллельными β -тяжами, которые расположены под углом примерно 45° к оси фибриллы (рис. 4, а). Несмотря на то что атомарная модель была получена на агрегатах короткого пептида, компьютерные симуляции показали, что полноразмерный белок может формировать аналогичные агрегаты [61]. По другим данным для агрегатов SOD1 показаны практически все амилоидные свойства: устойчивость к протеазам, образование фибрилл, взаимодействие с тиофлавином Т [71–73].

Отдельно необходимо отметить кросс- α -структуру. Такие агрегаты обогащены α -спиралями, которые ориентированы перпендикулярно оси фибриллы. Эта структура была показана для фибриллярных агрегатов PSM α 3, которые могут связывать тиофлавин Т (рис. 4, б) [17]. Другим примером агрегатов с кросс- α -структурой стали фибриллы из пептидов аполипопротеина А-I [74], хотя для других фрагментов этого белка была показана традиционная кросс- β -структура [75]. Белок MAVS образует агрегаты с

амилоидными свойствами и большим количеством α -спиралей, но в этом случае такие фибриллы состоят из состыкованных глобулярных молекул (рис. 4, в). Формирование филаментов MAVS основано на совместном взаимодействии четырёх поверхностей каждой субъединицы. В результате образуется компактная и плотная упаковка доменов CARD в филаменты. Вероятно, благодаря сильным электростатическим взаимодействиям такие агрегаты обладают устойчивостью к детергентам [76, 77].

В этом подразделе мы представили разные модели, описывающие укладку белка в составе амилоидных и амилоидоподобных протофибрилл, и в заключение хотим также отметить, что внутри каждой из этих моделей может существовать множество разных вариантов даже для одного белка [5, 78].

Полиморфизм структуры фибрилл. Помимо рассмотренного выше многообразия вариантов организации кросс- β -структур амилоидные фибриллы также характеризуются полиморфизмом на молекулярном уровне. Во-первых, разные амилоидные структуры могут возникать в результате таких изменений в первичной аминокислотной последовательности, как точечные мутации или делеции [78, 79]. Во-вторых, полипептидные цепи с идентичной аминокислотной последовательностью могут демонстрировать

разницу в укладке белка в составе протофиламента (полиморфизм протофиламентов), включая различия в областях, образующих β -лист (сегментный полиморфизм), структуру укладки кора (полиморфизм упаковки) и наличие нековалентных кофакторов [78–80]. Сюда также можно отнести гетероамилоиды, возникающие в результате чередования мономеров с разной последовательностью, например, фибриллы RIP1/RIP3 [81]. В-третьих, к разнообразию амилоидных агрегатов могут привести отличия в составе фибрилл. Так, фибриллы могут включать одинаковые или разные протофиламенты, их количество также может варьировать. К тому же фибриллы могут отличаться расположением протофибрилл относительно друг друга (ультраструктурный полиморфизм) [80]. Наконец, структурный полиморфизм может возникать в результате различий направления поворота, шага спирали, позиции оси спирали и длины фибриллы [79].

Впервые детально наличие полиморфизма было продемонстрировано для фибрилл, выделенных посмертно из мозга пациентов с болезнью Альцгеймера, которая была гистологически подтверждена наличием большого количества белковых бляшек в лобной и височной коре [82]. Эти отложения преимущественно состояли из парных спиральных филаментов

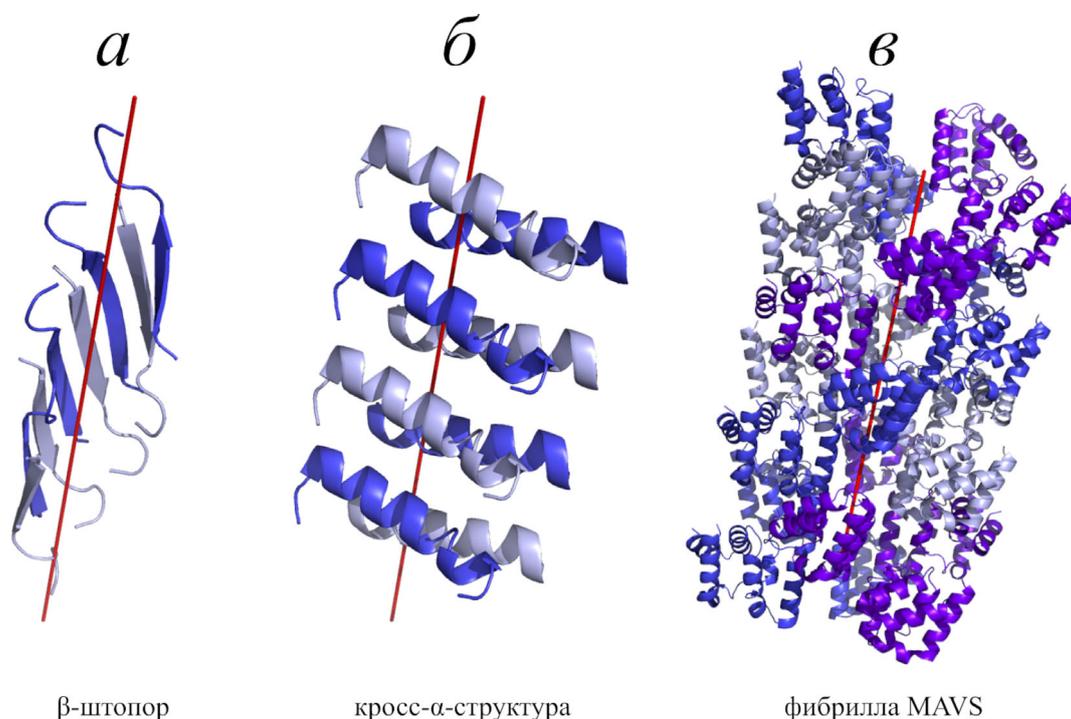


Рис. 4. Модели белковых агрегатов SOD1 (а), PSM α 3 (б) и MAVS (в), обладающих некоторыми амилоидными свойствами. Красной линией отмечена условная ось фибриллы. Цветами выделены чередующиеся молекулы белка. Идентификаторы структур, использованных при подготовке рисунка, в базе данных PDB ID: 5IIW, 6GQC и 3J6C

или PHF (от англ. paired helical filament). Их ширина варьировала от 8 до 20 нм, а шаг спирали составлял 80 нм. Другой тип агрегатов, обнаруженный в отложениях, получил название прямых филаментов или SF (от англ. straight filament). Их ширина составила около 15 нм и фактически не отличалась для разных филаментов в отличие от PHF. Описанные варианты имели общие поверхностные эпитопы, в сечении фибрилл в обоих случаях белок формировал сходные С-образные структуры, относительное расположение которых у PHF и SF различалось. Также PHF и SF могли образовывать гибридные филаменты, сочетающие обе морфологии. Таким образом, было выдвинуто предположение, что фибриллы PHF и SF отличаются расположением протофибрилл с одинаковой структурой. Дальнейшие исследования показали, что PHF и SF состоят из аномально гиперфосфорилированного белка тау [83]. Впоследствии с использованием метода криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) были получены модели PHF и SF с атомарным разрешением, которые подтвердили высказанную гипотезу. В PHF два протофиламента образуют идентичные структуры со спиральной симметрией, а поверхность раздела образована антипараллельной укладкой остатков ${}_{332}\text{P}\text{G}\text{G}\text{G}\text{Q}_{336}$. В SF два протофиламента укладываются асимметрично.

Структуры филаментов белка тау были также определены с помощью крио-ЭМ в нескольких последующих работах с использованием посмертных препаратов мозга людей с диагностированной болезнью Альцгеймера [84], болезнью Пика [85], хронической травматической энцефалопатией [86] и кортикобазальной дегенерацией [87]. Примечательно, что структуры филаментов тау для этих заболеваний отличаются между собой. Было также проведено крио-ЭМ-исследование структуры филаментов двух рекомбинантных изоформ белка тау, полученных *in vitro*, в присутствии гепарина. Оказалось, что их структура отличается от агрегатов, выделенных из мозга (в частности, уменьшенным размером складок), и для одной из изоформ представляет собой смесь из четырёх конформаций [88]. При этом показано, что амилоиды белка тау, экстрагированные из тканей, более эффективно индуцируют агрегацию мономерного белка по сравнению с препаратами, полученными *in vitro*. По всей видимости, за это отвечают конформационные различия между такими агрегатами [89].

Структуры филаментов A β , выделенных посмертно из мозга пациентов с болезнью Альцгеймера, также отличаются от структур филаментов, собранных *in vitro* из рекомбинантного

белка. Здесь стоит отметить, что филаменты A β , выделенные из мозга, состояли из A β (1–40), в то время как белки, полученные *in vitro*, состояли из A β (1–42) [90, 91]. Подробно полиморфизм фибрилл A β освещён в обзоре Lau et al. [92].

Среди амилоидных агрегатов человеческого α -синуклеина в одних случаях наблюдаются гомогенные закрученные фибриллы [93], а в других – смесь скрученных и прямых фибрилл [94]. Фибриллы α -синуклеина из разных организмов также могут отличаться между собой, что является примером полиморфизма, вызванного последовательностью белка. Например, спонтанная агрегация *in vitro* α -синуклеина человека и мыши приводит к образованию фибрилл с отличающимися морфологическими и биохимическими характеристиками: α -синуклеин человека формирует преимущественно закрученные фибриллы, в то время как фибриллы белка мыши – прямые [93]. Кроме этого, фибриллы мышинного α -синуклеина более чувствительны к обработке протеиназой K [93, 95]. Также морфология фибрилл α -синуклеина человека зависит от аминокислотных замен. Как правило, белок с заменами S87N, L100M и N122S формирует преимущественно скрученный тип фибрилл, с заменой A53T – прямой тип фибрилл, а мутантные варианты с заменами N103G, A107Y и D121G образуют как скрученные фибриллы, так и пучки прямых фибрилл [93]. Варианты α -синуклеина дикого типа могут отличаться структурой протофиламентов, их взаимным расположением и вариантом взаимодействия [79]. Например, интерфейсы двух протофиламентов могут быть образованы гидрофобными стерическими застёжками либо межмолекулярными солевыми мостиками [96].

Фрагменты белка TDP-43 способны образовывать различные агрегаты. Для сегмента SegA (аминокислотные остатки 311–360) можно выделить три типа фибриллярных структур, обозначаемые SegA-sym, SegA-asym и SegA-slow. При этом сегмент SegB (аминокислотные остатки 286–331) образует иной тип фибрилл [97]. Все варианты агрегатов SegA $_{312-346}$ имеют специфическую укладку белка. Этот фрагмент в составе фибрилл образует вытянутую β -арку, напоминающую кинжал (dagger-shape). Разнообразие агрегатов сводится к отличиям в количестве протофиламентов и в их симметрии. Фибриллы SegA-sym содержат два одинаковых протофиламента, тогда как фибриллы SegA-asym содержат два протофиламента с различными конформациями. Фибриллы SegA-slow содержат четыре протофиламента: два протофиламента, включающие по 50 остатков, окружённые двумя другими протофиламентами из 10 остатков в составе

фибриллярной структуры. SegB (с заменой A315E) образует протофибриллы с одинаковой R-образной укладкой белка в поперечном сечении, а каждая фибрилла состоит из четырёх протофиламентов [97].

При получении фибрилл β 2-микроглобулина *in vitro* в одном образце могут образовываться амилоидные агрегаты с широким спектром морфологий, характеризующихся разным количеством протофиламентов, а также отличающихся шагом спирали скрученной фибриллы [98, 99]. Наиболее часто встречающийся тип фибрилл имеет явную скрученность и сформирован двумя протофиламентами. Субъединицы в таких фибриллах имеют упорядоченное L-образное поперечное сечение [98, 99]. Детальный анализ при помощи крио-ЭМ позволяет наблюдать различные морфологии: более тонкие фибриллы, состоящие из одного протофиламента, и более толстые, сформированные четырьмя протофиламентами [99]. Кроме того, β 2-микроглобулин может образовывать фибриллы с разной структурой в зависимости от экспериментальных условий. Например, при различных концентрациях 2,2,2-трифторэтанола формируются амилоидные агрегаты со схожей «игольчатой» морфологией, различающиеся по интервалу между витками фибриллы, интенсивности флуоресценции тиофлавина T и спектрам флуоресценции триптофана даже в одинаковых растворителях, что указывает на формирование различных структур [100].

Инсулин способен формировать большой спектр морфологически различных амилоидных агрегатов. Его фибриллы могут состоять из пары протофиламентов, закручивающихся друг вокруг друга, четырёх протофиламентов в компактной фибрилле, шести протофиламентов, закрученных лент, а также плоских лент параллельных протофиламентов [101]. При низких концентрациях инсулина отмечают образование более мелких, отделённых друг от друга фибрилл, нежели при высоких концентрациях [102]. На образование различных типов фибрилл инсулина также могут влиять соли и температура инкубации [103].

Фрагменты белка PSM α 3 могут формировать агрегаты, обогащённые β -листами, но отличающиеся от «традиционной» кросс- β -структуры. Для них также показан полиморфизм структуры фибрилл [104]. Один вариант принципиально отличается отсутствием сухой поверхности между парами β -листов. Вместо этого гексамеры β -листов образуют цилиндрические каналы, идущие вдоль агрегата. Второй вариант состоит из β -листов «вне регистра». Это означает, что β -тяжи не перпендикулярны оси фиб-

риллы, а находятся под углом $\sim 50^\circ$ [104]. В обоих вариантах β -слои состоят из антипараллельных тяжей. Полноразмерный белок, в свою очередь, собирается в кросс- α -фибриллы. Мутанты полноразмерного PSM α 3 также способны образовывать различные кросс- α -фибриллы [62].

Морфологически отличные структуры были отмечены для фибрилл амилина. Так, они могут состоять из одного, двух, трёх или пяти протофиламентов [105]. Кроме того, отличаются морфологии фибрилл полноразмерного белка и его фрагментов [106]. Амилоидные агрегаты амилина, состоящие из двух протофиламентов, могут, в свою очередь, отличаться их структурой и взаимным расположением [107]. К тому же к изменению морфологических особенностей фибрилл амилина может приводить наличие аминокислотных замен [108].

Необычные структуры могут образовывать фрагменты транстиретина (TTR) *in vitro*. Фибриллы TTR образованы переплетением двух протофиламентов и могут быть представлены тремя разными вариантами, а именно: дуплетными, триплетными и квадруплетными. В поперечном сечении видно, что такие фибриллы вмещают пары из двух, трёх и четырёх взаимосвязанных протофиламентов соответственно [60]. Принципиально другая картина наблюдается для фибрилл, полученных из образцов больных с транстиретиновым амилоидозом. В этом случае фибрилла состоит из одного протофиламента, который образован N-концевым и C-концевым фрагментами транстиретина [109].

Среди фибрилл белка сыровяточного амилоида A (SAA) наблюдаются различные варианты структур как в образцах из тканей мыши, так и в препаратах, полученных *in vitro*. В первом случае фибриллы отличаются количеством протофиламентов (двух или трёх) в своём составе. Выравнивание структур белков, входящих в состав фибрилл с разной морфологией, показывает лишь небольшие конформационные различия в их укладке. В случае агрегатов *in vitro* фибриллы могут состоять из двух или четырёх протофибрилл. Фибриллы *ex vivo* и *in vitro* также отличаются между собой укладкой белка в составе протофиламентов и чувствительностью к протеолизу [110].

Большинство описанных примеров относятся к патологическим амилоидам. В связи с этим может возникнуть вопрос, почему разнообразие возможных амилоидных конформаций для одного белка гораздо больше по сравнению с глобулярными вариантами укладки. В литературе было выдвинуто предположение, что вариативность структур, наблюдаемая в амилоидных фибриллах, возникает из-за отсутствия эволю-

ционного давления, которому подвержены белки, конформация которых важна для выполнения конкретных функций [97].

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ВАРИАЦИЙ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ

Наиболее ярким примером взаимосвязи между структурой агрегатов и их биологической ролью являются прионы, которые зачастую являются инфекционными амилоидами. В случае первого описанного приона, PrP, его варианты приводят к развитию разных заболеваний, которые отличаются по зонам поражения головного мозга, скорости развития, патологической картине, возможности передачи другим видам и т.д. Важно отметить, что первичная структура белка PrP остаётся неизменной, а наблюдаемые различия определяются трёхмерной структурой агрегатов этого белка [111–114]. В то же время небольшие вариации в последовательности, связанные с аминокислотными заменами, а также вариации в посттрансляционных модификациях могут приводить к появлению новых структурных вариантов [41, 115, 116].

Похожий феномен описан и для других амилоидов, прионные свойства которых остаются под вопросом. Например, разные по форме агрегаты α -синуклеина (олигомеры, фибриллы и ленточные агрегаты) приводят к различной гистопатологической картине после инъекции в мозг животных [117]. Показано, что в случае таких синуклеинопатий, как болезнь Паркинсона, множественная системная атрофия (МСА) и деменция с тельцами Леви, структуры филаментов α -синуклеина из мозга больных людей различаются [118–121].

Фибриллы и олигомеры A β (1–40) значительно различались по токсичности в нейрональных культурах клеток. В частности, фибриллы, полученные *in vitro* без перемешивания, более токсичны, чем фибриллы, полученные при перемешивании [122]. Несмотря на полиморфную природу агрегации A β (1–40), фибриллярные структуры у конкретного пациента с болезнью Альцгеймера однородны по всей коре головного мозга и отличаются от таковых у других пациентов [91, 123]. Для агрегированного белка тау также описано существование различных конформаций, определяющих разнообразие клинических проявлений многочисленных подтипов таупатии [124].

Аналогичные примеры описаны и для прионов дрожжей: [PSI⁺], [PIN⁺] и [URE3] [125]. В этих случаях агрегаты с различными варианта-

ми структуры приводят к разным по силе изменениям клеточных процессов. Например, прион [PSI⁺] приводит к нонсенс-супрессии (распознаванию преждевременных стоп-кодонов как значащих), а его варианты отличаются эффективностью этого процесса [126, 127]. Хотя некоторые авторы выделяют множество вариантов [PSI⁺] [128], детальный анализ показывает, что основными являются два варианта, сильный и слабый, в то время как другие варианты являются более редкими [129]. Показано, что NM-домен Sup35, ответственный за образование приона [PSI⁺], в случае сильных и слабых вариантов [PSI⁺] характеризуется различной конформацией. При этом фибриллы, полученные на основе лизатов штамма с сильным [PSI⁺], более тонкие по сравнению с фибриллами из штамма со слабым [PSI⁺] [130]. Тот факт, что именно структура фибрилл определяет фенотип приона, а не наоборот, был впервые наглядно продемонстрирован с помощью метода белковой трансформации дрожжей. Фибриллы Sup35NM, полученные *in vitro* при различных температурах и отличающиеся по структуре, приводили к возникновению различных по силе фенотипа вариантов приона *in vivo* [131]. Позднее эти результаты получили независимое подтверждение [132, 133].

Значительной проблемой, обнаруженной в последние годы, является существование структурных различий между белками, полученными *in vitro* (т.е. белками, наработанными в клетках бактерий или синтезированными химически), и белками, выделенными из тканей. Например, с помощью крио-ЭМ и атомно-силовой микроскопии (АСМ) показано, что неинфекционные рекомбинантные фибриллы PrP, выделенные из клеток *Escherichia coli*, по своей структуре отличаются от инфекционных фибрилл, выделенных из мозга больных мышей [134]. Авторы объясняют эти различия гликозилированием PrP, присутствующим в его нормальном клеточном окружении и отсутствующим в клетках бактерий. Похожий феномен описан для α -синуклеина, при наработке которого в клетках бактерий значительная часть рекомбинантного белка (до 50%) может содержать замену Y136C. Мутантный белок образуется за счёт ошибок трансляции эукариотической мРНК в клетках бактерий, и, в отличие от белка дикого типа, характеризуется низкой способностью к агрегации и отсутствием амилоидных свойств [135]. Также показано, что структуры филаментов α -синуклеина из головного мозга больных МСА отличаются от структур, образованных рекомбинантными белками, выделенными из бактерий; основные отличия заключаются в протяжённых

складках протофиламентов, их асимметричной упаковке и наличии небелковых молекул между протофиламентами [121]. Аналогично, фибриллы A β (1–40), изолированные из тканей головного мозга пациентов, умерших от болезни Альцгеймера, по своей структуре отличались от тех, которые были охарактеризованы в случае химически синтезированного пептида A β (1–40) [91]. Авторы объясняют эти различия тем, что использованные условия образования фибрилл *in vitro* не совсем соответствуют условиям образования фибрилл *in vivo*. Для приона дрожжей [*PSI*⁺] также получены сходные результаты, согласно которым данные, полученные с использованием фибрилл Sup35, спонтанно образующихся *in vitro*, могут значительно отличаться от данных, полученных с вариантами приона [*PSI*⁺] *in vivo* [129].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Амилоиды являются уникальными белковыми комплексами с кросс- β -структурой и рядом необычных свойств. В рамках этой статьи мы рассмотрели возможные модели связывания тиофлавина Т и Конго красного с амилоидными комплексами, а также то, что подобное взаимодействие не всегда является специфическим. Необычная структура амилоидов объясняет по-

вышенную стабильность агрегатов по сравнению с мономерным белком при различных воздействиях. Однако существуют примеры и термоллабильных амилоидов с кросс- β -структурой, таких как FUS и hnRNPA1. Амилоиды и амилоидоподобные агрегаты характеризуются различными конформациями белков в составе протофиламентов, такими как параллельные и антипараллельные β -листы, β -соленоиды, а также другими, более редкими вариантами. Помимо многообразия вариантов кросс- β -структуры, амилоидные комплексы также характеризуются полиморфизмом на различных уровнях организации фибрилл. Дальнейшее изучение структуры амилоидов, а также систематизация данных об их разнообразии может помочь связать варианты их укладки с молекулярными механизмами развития патологий при амилоидозах.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (научный проект № 20-34-90117).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S., Merlini, G., et al. (2012) Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis, *Amyloid*, **19**, 167-170, doi: 10.3109/13506129.2012.734345.
2. Sergeeva, A. V., and Galkin, A. P. (2020) Functional amyloids of eukaryotes: criteria, classification, and biological significance, *Curr. Genet.*, **66**, 849-866, doi: 10.1007/s00294-020-01079-7.
3. Matiiv, A. B., Trubitsina, N. P., Matveenko, A. G., Barbitoff, Y. A., Zhouravleva, G. A., et al. (2020) Amyloid and amyloid-like aggregates: diversity and the term crisis, *Biochemistry. (Moscow)*, **85**, 1011-1034, doi: 10.1134/S0006297920090035.
4. Rubel, M. S., Fedotov, S. A., Grizel, A. V., Sopova, J. V., Malikova, O. A., et al. (2020) Functional mammalian amyloids and amyloid-like proteins, *Life (Basel)*, **10**, 156, doi: 10.3390/life10090156.
5. Iadanza, M. G., Jackson, M. P., Hewitt, E. W., Ranson, N. A., and Radford, S. E. (2018) A new era for understanding amyloid structures and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 755-773, doi: 10.1038/s41580-018-0060-8.
6. Groenning, M. (2010) Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status, *J. Chem. Biol.*, **3**, 1-18, doi: 10.1007/s12154-009-0027-5.
7. Howie, A. J., and Brewer, D. B. (2009) Optical properties of amyloid stained by Congo red: History and mechanisms, *Micron*, **40**, 285-301, doi: 10.1016/j.micron.2008.10.002.
8. Krebs, M. R. H., Bromley, E. H. C., and Donald, A. M. (2005) The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: Localisation and implications, *J. Struct. Biol.*, **149**, 30-37, doi: 10.1016/j.jsb.2004.08.002.
9. Howie, A. J., Brewer, D. B., Howell, D., and Jones, A. P. (2008) Physical basis of colors seen in Congo red-stained amyloid in polarized light, *Lab. Invest.*, **88**, 232-242, doi: 10.1038/labinvest.3700714.
10. Biancalana, M., Makabe, K., Koide, A., and Koide, S. (2009) Molecular mechanism of thioflavin-T binding to the surface of beta-rich peptide self-assemblies, *J. Mol. Biol.*, **385**, 1052-1063, doi: 10.1016/j.jmb.2008.11.006.
11. Kajava, A. V., Baxa, U., Wickner, R. B., and Steven, A. C. (2004) A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: the parallel superpleated β -structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7885-7890, doi: 10.1073/pnas.0402427101.
12. Groenning, M., Norrman, M., Flink, J. M., van de Weert, M., Bukrinsky, J. T., et al. (2007) Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils, *J. Struct. Biol.*, **159**, 483-497, doi: 10.1016/j.jsb.2007.06.004.
13. Kuznetsova, I. M., Sulatskaya, A. I., Uversky, V. N., and Turoverov, K. K. (2012) A new trend in the experimental methodology for the analysis of the thioflavin T binding to

- amyloid fibrils, *Mol. Neurobiol.*, **45**, 488-498, doi: 10.1007/s12035-012-8272-y.
14. Sulatskaya, A. I., Kuznetsova, I. M., Belousov, M. V., Bondarev, S. A., Zhouravleva, G. A., et al. (2016) Stoichiometry and affinity of thioflavin T binding to Sup35p amyloid fibrils, *PLoS One*, **11**, e0156314, doi: 10.1371/journal.pone.0156314.
 15. Chang, H.-Y., Lin, J.-Y., Lee, H.-C., Wang, H.-L., and King, C.-Y. (2008) Strain-specific sequences required for yeast [*PSI*⁺] prion propagation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13345-13350, doi: 10.1073/pnas.0802215105.
 16. Kabani, M., and Melki, R. (2020) The *Yarrowia lipolytica* orthologs of Sup35p assemble into thioflavin T-negative amyloid fibrils, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **529**, 533-539, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.06.024.
 17. Tayeb-Fligelman, E., Tabachnikov, O., Moshe, A., Goldshmidt-Tran, O., Sawaya, M. R., et al. (2017) The cytotoxic *Staphylococcus aureus* PSM α 3 reveals a cross- α amyloid-like fibril, *Science*, **355**, 831-833, doi: 10.1126/science.aaf4901.
 18. Parker, C. A., and Joyce, T. A. (1973) Prompt and delayed fluorescence of some DNA adsorbates, *Photochem. Photobiol.*, **18**, 467-474, doi: 10.1111/j.1751-1097.1973.tb06451.x.
 19. Cundall, R. B., Davies, A. K., Morris, P. G., and Williams, J. (1981) Factors influencing the photosensitizing properties and photoluminescence of thioflavin T, *J. Photochem.*, **17**, 369-376, doi: 10.1016/0047-2670(81)85379-8.
 20. Verma, S., Ravichandiran, V., and Ranjan, N. (2021) Beyond amyloid proteins: Thioflavin T in nucleic acid recognition, *Biochimie*, **190**, 111-123, doi: 10.1016/j.biochi.2021.06.003.
 21. Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S.-I., Merlini, G., et al. (2016) Amyloid fibril proteins and amyloidosis: Chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines, *Amyloid*, **23**, 209-213, doi: 10.1080/13506129.2016.1257986.
 22. Khurana, R., Uversky, V. N., Nielsen, L., and Fink, A. L. (2001) Is Congo red an amyloid-specific dye? *J. Biol. Chem.*, **276**, 22715-22721, doi: 10.1074/jbc.M011499200.
 23. Bousset, L., Redeker, V., Decottignies, P., Dubois, S., Le Marechal, P., et al. (2004) Structural characterization of the fibrillar form of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* prion Ure2p, *Biochemistry*, **43**, 5022-5032, doi: 10.1021/bi049828e.
 24. Yakupova, E. I., Bobyleva, L. G., Vikhlyantsev, I. M., and Bobylev, A. G. (2019) Congo red and amyloids: history and relationship, *Biosci. Rep.*, **39**, BSR20181415, doi: 10.1042/BSR20181415.
 25. Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A. Ø., Riek, C., et al. (2005) Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils, *Nature*, **435**, 773-778, doi: 10.1038/nature03680.
 26. Sawaya, M. R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M. I., Sievers, S. A., et al. (2007) Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers, *Nature*, **447**, 453-457, doi: 10.1038/nature05695.
 27. Kato, M., Han, T. W., Xie, S., Shi, K., Du, X., et al. (2012) Cell-free formation of RNA granules: Low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels, *Cell*, **149**, 753-767, doi: 10.1016/j.cell.2012.04.017.
 28. Hughes, M. P., Sawaya, M. R., Boyer, D. R., Goldschmidt, L., Rodriguez, J. A., et al. (2018) Atomic structures of low-complexity protein segments reveal kinked β sheets that assemble networks, *Science*, **359**, 698-701, doi: 10.1126/science.aan6398.
 29. Luo, F., Gui, X., Zhou, H., Gu, J., Li, Y., et al. (2018) Atomic structures of FUS LC domain segments reveal bases for reversible amyloid fibril formation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 341-346, doi: 10.1038/s41594-018-0050-8.
 30. Gui, X., Luo, F., Li, Y., Zhou, H., Qin, Z., et al. (2019) Structural basis for reversible amyloids of hnRNP1A elucidates their role in stress granule assembly, *Nat. Commun.*, **10**, 2006, doi: 10.1038/s41467-019-09902-7.
 31. Hughes, M. P., Goldschmidt, L., and Eisenberg, D. S. (2021) Prevalence and species distribution of the low-complexity, amyloid-like, reversible, kinked segment structural motif in amyloid-like fibrils, *J. Biol. Chem.*, **297**, 101194, doi: 10.1016/j.jbc.2021.101194.
 32. Kajava, A. V., Baxa, U., and Steven, A. C. (2010) Beta arcades: Recurring motifs in naturally occurring and disease-related amyloid fibrils, *FASEB J.*, **24**, 1311-1319, doi: 10.1096/fj.09-145979.
 33. Hennetin, J., Jullian, B., Steven, A. C., and Kajava, A. V. (2006) Standard conformations of beta-arches in beta-solenoid proteins, *J. Mol. Biol.*, **358**, 1094-1105, doi: 10.1016/j.jmb.2006.02.039.
 34. Trott, O., and Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.*, **31**, 455-461, doi: 10.1002/jcc.21334.
 35. Shewmaker, F., McGlinchey, R. P., and Wickner, R. B. (2011) Structural insights into functional and pathological amyloid, *J. Biol. Chem.*, **286**, 16533-16540, doi: 10.1074/jbc.R111.227108.
 36. Qiang, W., Yau, W.-M., Luo, Y., Mattson, M. P., and Tycko, R. (2012) Antiparallel β -sheet architecture in Iowa-mutant β -amyloid fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 4443-4448, doi: 10.1073/pnas.1111305109.
 37. Antzutkin, O. N., Balbach, J. J., Leapman, R. D., Rizzo, N. W., Reed, J., et al. (2000) Multiple quantum solid-state NMR indicates a parallel, not antiparallel, organization of beta-sheets in Alzheimer's beta-amyloid fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13045-13050, doi: 10.1073/pnas.230315097.
 38. Gao, Y., Guo, C., Watzlawik, J. O., Randolph, P. S., Lee, E. J., et al. (2020) Out-of-register parallel β -sheets and antiparallel β -sheets coexist in 150-kDa oligomers formed by amyloid- β (1-42), *J. Mol. Biol.*, **432**, 4388-4407, doi: 10.1016/j.jmb.2020.05.018.
 39. Linala, E. K., Davies, P. L., Doucet, D., Tyshenko, M. G., Walker, V. K., et al. (2002) A β -helical antifreeze protein isoform with increased activity, *J. Biol. Chem.*, **277**, 33349-33352, doi: 10.1074/jbc.M205575200.
 40. Flores-Fernández, J., Rathod, V., and Wille, H. (2018) Comparing the folds of prions and other pathogenic amyloids, *Pathogens*, **7**, 50, doi: 10.3390/pathogens7020050.
 41. Kraus, A., Hoyt, F., Schwartz, C. L., Hansen, B., Artikis, E., et al. (2021) High-resolution structure and strain comparison of infectious mammalian prions, *Mol. Cell*, **81**, 4540-4551.e6, doi: 10.1016/j.molcel.2021.08.011.
 42. Van Melckebeke, H., Wasmer, C., Lange, A., Ab, E., Loquet, A., et al. (2010) Atomic-resolution three-dimensional structure of HET-s(218-289) amyloid fibrils by solid-state NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 13765-13775, doi: 10.1021/ja104213j.
 43. Fitzpatrick, A. W. P., Falcon, B., He, S., Murzin, A. G., Murshudov, G., et al. (2017) Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease, *Nature*, **547**, 185-190, doi: 10.1038/nature23002.

44. Louros, N. N., Baltoumas, F. A., Hamodrakas, S. J., and Iconomidou, V. A. (2016) A β -solenoid model of the Pmel17 repeat domain: Insights to the formation of functional amyloid fibrils, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **30**, 153-164, doi: 10.1007/s10822-015-9892-x.
45. Liu, W., Li, C., Shan, J., Wang, Y., and Chen, G. (2021) Insights into the aggregation mechanism of RNA recognition motif domains in TDP-43: a theoretical exploration, *R. Soc. Open Sci.*, **8**, 210160, doi: 10.1098/rsos.210160.
46. Baxa, U., Wickner, R. B., Steven, A. C., Anderson, D. E., Marekov, L. N., et al. (2007) Characterization of beta-sheet structure in Ure2p1-89 yeast prion fibrils by solid-state nuclear magnetic resonance, *Biochemistry*, **46**, 13149-13162, doi: 10.1021/bi700826b.
47. Camino, J. D., Gracia, P., Chen, S. W., Sot, J., de la Arada, I., et al. (2020) The extent of protein hydration dictates the preference for heterogeneous or homogeneous nucleation generating either parallel or antiparallel β -sheet α -synuclein aggregates, *Chem. Sci.*, **11**, 11902-11914, doi: 10.1039/D0SC05297C.
48. Do, H. Q., Hewetson, A., Myers, C., Khan, N. H., Hastert, M. C., et al. (2019) The functional mammalian CRES (Cystatin-Related Epididymal Spermatogenic) amyloid is antiparallel β -sheet rich and forms a metastable oligomer during assembly, *Sci. Rep.*, **9**, 9210, doi: 10.1038/s41598-019-45545-w.
49. Rigoldi, F., Metrangolo, P., Redaelli, A., and Gautieri, A. (2017) Nanostructure and stability of calcitonin amyloids, *J. Biol. Chem.*, **292**, 7348-7357, doi: 10.1074/jbc.M116.770271.
50. Khatun, S., Singh, A., Pawar, N., and Gupta, A. N. (2019) Aggregation of amylin: spectroscopic investigation, *Int. J. Biol. Macromol.*, **133**, 1242-1248, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.167.
51. Lecoq, L., Wiegand, T., Rodriguez-Alvarez, F. J., Cadalbert, R., Herrera, G. A., et al. (2019) A substantial structural conversion of the native monomer leads to in-register parallel amyloid fibril formation in Light-chain amyloidosis, *Chembiochem*, **20**, 1027-1031, doi: 10.1002/cbic.201800732.
52. Son, M., and Wickner, R. B. (2018) Nonsense-mediated mRNA decay factors cure most $[PSI^+]$ prion variants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E1184-E1193, doi: 10.1073/pnas.1717495115.
53. Kishimoto, A., Hasegawa, K., Suzuki, H., Taguchi, H., Namba, K., et al. (2004) β -helix is a likely core structure of yeast prion Sup35 amyloid fibers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 739-745, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.01.117.
54. Wickner, R. B., Dyda, F., and Tycko, R. (2008) Amyloid of Rnq1p, the basis of the $[PIN^+]$ prion, has a parallel in-register beta-sheet structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 2403-2408, doi: 10.1073/pnas.0712032105.
55. Cervantes, S. A., Bajakian, T. H., Soria, M. A., Falk, A. S., Service, R. J., et al. (2016) Identification and structural characterization of the N-terminal amyloid core of Orb2 isoform A, *Sci. Rep.*, **6**, 38265, doi: 10.1038/srep38265.
56. Jayasinghe, S. A., and Langen, R. (2004) Identifying structural features of fibrillar islet amyloid polypeptide using site-directed spin labeling, *J. Biol. Chem.*, **279**, 48420-48425, doi: 10.1074/jbc.M406853200.
57. Reich, L., Becker, M., Seckler, R., and Weikl, T. R. (2009) *In vivo* folding efficiencies for mutants of the P22 tailspike β -helix protein correlate with predicted stability changes, *Biophys. Chem.*, **141**, 186-192, doi: 10.1016/j.bpc.2009.01.015.
58. Maji, S. K., Wang, L., Greenwald, J., and Riek, R. (2009) Structure-activity relationship of amyloid fibrils, *FEBS Lett.*, **583**, 2610-2617, doi: 10.1016/j.febslet.2009.07.003.
59. Hoshino, M., Katou, H., Hagihara, Y., Hasegawa, K., Naiki, H., and Goto, Y. (2002) Mapping the core of the β 2-microglobulin amyloid fibril by H/D exchange, *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 332-336, doi: 10.1038/nsb792.
60. Fitzpatrick, A. W. P., Debelouchina, G. T., Bayro, M. J., Clare, D. K., Caporini, M. A., et al. (2013) Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 5468-5473, doi: 10.1073/pnas.1219476110.
61. Sangwan, S., Zhao, A., Adams, K. L., Jayson, C. K., Sawaya, M. R., et al. (2017) Atomic structure of a toxic, oligomeric segment of SOD1 linked to amyotrophic lateral sclerosis (ALS), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 8770-8775, doi: 10.1073/pnas.1705091114.
62. Tayeb-Fligelman, E., Salinas, N., Tabachnikov, O., and Landau, M. (2020) *Staphylococcus aureus* PSM α 3 cross- α fibril polymorphism and determinants of cytotoxicity, *Structure*, **28**, 301-313.e6, doi: 10.1016/j.str.2019.12.006.
63. Xu, H., He, X., Zheng, H., Huang, L. J., Hou, F., et al. (2014) Structural basis for the prion-like MAVS filaments in antiviral innate immunity, *Elife*, **3**, e01489, doi: 10.7554/eLife.01489.
64. Kajava, A. V., and Steven, A. C. (2006) Beta-rolls, beta-helices, and other beta-solenoid proteins, *Adv. Protein Chem.*, **73**, 55-96, doi: 10.1016/S0065-3233(06)73003-0.
65. Steinbacher, S., Seckler, R., Miller, S., Steipe, B., Huber, R., et al. (1994) Crystal structure of P22 tailspike protein: interdigitated subunits in a thermostable trimer, *Science*, **265**, 383-386, doi: 10.1126/science.8023158.
66. Simkovsky, R., and King, J. (2006) An elongated spine of buried core residues necessary for *in vivo* folding of the parallel beta-helix of P22 tailspike adhesin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3575-3580, doi: 10.1073/pnas.0509087103.
67. Schuler, B., Rachel, R., and Seckler, R. (1999) Formation of fibrous aggregates from a non-native intermediate: the isolated P22 tailspike beta-helix domain, *J. Biol. Chem.*, **274**, 18589-18596, doi: 10.1074/jbc.274.26.18589.
68. Tycko, R., and Wickner, R. B. (2013) Molecular structures of amyloid and prion fibrils: consensus versus controversy, *Acc. Chem. Res.*, **46**, 1487-1496, doi: 10.1021/ar300282r.
69. Liu, C., Sawaya, M. R., and Eisenberg, D. (2011) β -microglobulin forms three-dimensional domain-swapped amyloid fibrils with disulfide linkages, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 49-55, doi: 10.1038/nsmb.1948.
70. McParland, V. J., Kad, N. M., Kalverda, A. P., Brown, A., Kirwin-Jones, P., et al. (2000) Partially unfolded states of beta(2)-microglobulin and amyloid formation *in vitro*, *Biochemistry*, **39**, 8735-8746, doi: 10.1021/bi000276j.
71. Mateju, D., Franzmann, T. M., Patel, A., Kopach, A., Boczek, E. E., et al. (2017) An aberrant phase transition of stress granules triggered by misfolded protein and prevented by chaperone function, *EMBO J.*, **36**, 1669-1687, doi: 10.15252/embj.201695957.
72. Ida, M., Ando, M., Adachi, M., Tanaka, A., Machida, K., et al. (2016) Structural basis of Cu, Zn-superoxide dismutase amyloid fibril formation involves interaction of multiple peptide core regions, *J. Biochem.*, **159**, 247-260, doi: 10.1093/jb/mvv091.
73. Baumer, K. M., Koone, J. C., and Shaw, B. F. (2020) Kinetic variability in seeded formation of ALS-linked sod1 fibrils across multiple generations, *ACS Chem. Neurosci.*, **11**, 304-313, doi: 10.1021/acscchemneuro.9b00464.

74. Lazar, K. L., Miller-Auer, H., Getz, G. S., Orgel, J. P. R. O., and Meredith, S. C. (2005) Helix-turn-helix peptides that form alpha-helical fibrils: turn sequences drive fibril structure, *Biochemistry*, **44**, 12681-12689, doi: 10.1021/bi0509705.
75. Sunde, M., Serpell, L. C., Bartlam, M., Fraser, P. E., Pepys, M. B., et al. (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction, *J. Mol. Biol.*, **273**, 729-739, doi: 10.1006/jmbi.1997.1348.
76. Wu, B., Peisley, A., Tetrault, D., Li, Z., Egelman, E. H., et al. (2014) Molecular imprinting as a signal-activation mechanism of the viral RNA sensor RIG-I, *Mol. Cell*, **55**, 511-523, doi: 10.1016/j.molcel.2014.06.010.
77. Xu, H., He, X., Zheng, H., Huang, L. J., Hou, F., et al. (2015) Correction: Structural basis for the prion-like MAVS filaments in antiviral innate immunity, *Elife*, **4**, e07546, doi: 10.7554/eLife.07546.
78. Gallardo, R., Ranson, N. A., and Radford, S. E. (2020) Amyloid structures: much more than just a cross- β fold, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **60**, 7-16, doi: 10.1016/j.sbi.2019.09.001.
79. Lutter, L., Aubrey, L. D., and Xue, W.-F. (2021) On the structural diversity and individuality of polymorphic amyloid protein assemblies, *J. Mol. Biol.*, **433**, 167124, doi: 10.1016/j.jmb.2021.167124.
80. Zielinski, M., Röder, C., and Schröder, G. F. (2021) Challenges in sample preparation and structure determination of amyloids by Cryo-EM, *J. Biol. Chem.*, **297**, 100938, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100938.
81. Li, J., McQuade, T., Siemer, A. B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., et al. (2012) The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis, *Cell*, **150**, 339-350, doi: 10.1016/j.cell.2012.06.019.
82. Crowther, R. A. (1991) Straight and paired helical filaments in Alzheimer's disease have a common structural unit, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2288-2292, doi: 10.1073/pnas.88.6.2288.
83. Lee, V. M., Goedert, M., and Trojanowski, J. Q. (2001) Neurodegenerative tauopathies, *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 1121-1159, doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.1121.
84. Falcon, B., Zhang, W., Schweighauser, M., Murzin, A. G., Vidal, R., et al. (2018) Tau filaments from multiple cases of sporadic and inherited Alzheimer's disease adopt a common fold, *Acta Neuropathol.*, **136**, 699-708, doi: 10.1007/s00401-018-1914-z.
85. Falcon, B., Zhang, W., Murzin, A. G., Murshudov, G., Garringer, H. J., et al. (2018) Structures of filaments from Pick's disease reveal a novel tau protein fold, *Nature*, **561**, 137-140, doi: 10.1038/s41586-018-0454-y.
86. Falcon, B., Zivanov, J., Zhang, W., Murzin, A. G., Garringer, H. J., et al. (2019) Novel tau filament fold in chronic traumatic encephalopathy encloses hydrophobic molecules, *Nature*, **568**, 420-423, doi: 10.1038/s41586-019-1026-5.
87. Zhang, W., Tarutani, A., Newell, K. L., Murzin, A. G., Matsubara, T., et al. (2020) Novel tau filament fold in corticobasal degeneration, *Nature*, **580**, 283-287, doi: 10.1038/s41586-020-2043-0.
88. Zhang, W., Falcon, B., Murzin, A. G., Fan, J., Crowther, R. A., et al. (2019) Heparin-induced tau filaments are polymorphic and differ from those in Alzheimer's and Pick's diseases, *Elife*, **8**, e43584, doi: 10.7554/eLife.43584.
89. Eisenberg, D., and Jucker, M. (2012) The amyloid state of proteins in human diseases, *Cell*, **148**, 1188-1203, doi: 10.1016/j.cell.2012.02.022.
90. Gremer, L., Schölzel, D., Schenk, C., Reinartz, E., Labahn, J., et al. (2017) Fibril structure of amyloid- β (1-42) by cryo-electron microscopy, *Science*, **358**, 116-119, doi: 10.1126/science.aao2825.
91. Kollmer, M., Close, W., Funk, L., Rasmussen, J., Bsoul, A., et al. (2019) Cryo-EM structure and polymorphism of A β amyloid fibrils purified from Alzheimer's brain tissue, *Nat. Commun.*, **10**, 4760, doi: 10.1038/s41467-019-12683-8.
92. Lau, H. H. C., Ingelsson, M., and Watts, J. C. (2021) The existence of A β strains and their potential for driving phenotypic heterogeneity in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol.*, **142**, 17-39, doi: 10.1007/s00401-020-02201-2.
93. Tanaka, G., Yamanaka, T., Furukawa, Y., Kajimura, N., Mitsuoka, K., et al. (2019) Sequence- and seed-structure-dependent polymorphic fibrils of alpha-synuclein, *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.*, **1865**, 1410-1420, doi: 10.1016/j.bbadis.2019.02.013.
94. Li, B., Ge, P., Murray, K. A., Sheth, P., Zhang, M., et al. (2018) Cryo-EM of full-length α -synuclein reveals fibril polymorphs with a common structural kernel, *Nat. Commun.*, **9**, 3609, doi: 10.1038/s41467-018-05971-2.
95. Luk, K. C., Covell, D. J., Kehm, V. M., Zhang, B., Song, I. Y., et al. (2016) Molecular and biological compatibility with host alpha-synuclein influences fibril pathogenicity, *Cell Rep.*, **16**, 3373-3387, doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.053.
96. Guerrero-Ferreira, R., Taylor, N. M., Arteni, A.-A., Kumari, P., Mona, D., et al. (2019) Two new polymorphic structures of human full-length alpha-synuclein fibrils solved by cryo-electron microscopy, *Elife*, **8**, e48907, doi: 10.7554/eLife.48907.
97. Cao, Q., Boyer, D. R., Sawaya, M. R., Ge, P., and Eisenberg, D. S. (2019) Cryo-EM structures of four polymorphic TDP-43 amyloid cores, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 619-627, doi: 10.1038/s41594-019-0248-4.
98. White, H. E., Hodgkinson, J. L., Jahn, T. R., Cohen-Krausz, S., Gosal, W. S., et al. (2009) Globular tetramers of beta(2)-microglobulin assemble into elaborate amyloid fibrils, *J. Mol. Biol.*, **389**, 48-57, doi: 10.1016/j.jmb.2009.03.066.
99. Iadanza, M. G., Silvers, R., Boardman, J., Smith, H. I., Karamanos, T. K., et al. (2018) The structure of a β 2-microglobulin fibril suggests a molecular basis for its amyloid polymorphism, *Nat. Commun.*, **9**, 4517, doi: 10.1038/s41467-018-06761-6.
100. Chatani, E., Yagi, H., Naiki, H., and Goto, Y. (2012) Polymorphism of β 2-microglobulin amyloid fibrils manifested by ultrasonication-enhanced fibril formation in trifluoroethanol, *J. Biol. Chem.*, **287**, 22827-22837, doi: 10.1074/jbc.M111.333310.
101. Groenning, M., Frokjaer, S., and Vestergaard, B. (2009) Formation mechanism of insulin fibrils and structural aspects of the insulin fibrillation process, *Curr. Prot. Pept. Sci.*, **10**, 509-528, doi: 10.2174/138920309789352038.
102. Sakalauskas, A., Ziaunys, M., and Smirnovas, V. (2019) Concentration-dependent polymorphism of insulin amyloid fibrils, *PeerJ*, **7**, e8208, doi: 10.7717/peerj.8208.
103. Ishigaki, M., Morimoto, K., Chatani, E., and Ozaki, Y. (2020) Exploration of insulin amyloid polymorphism using raman spectroscopy and imaging, *Biophys. J.*, **118**, 2997-3007, doi: 10.1016/j.bpj.2020.04.031.
104. Salinas, N., Colletier, J.-P., Moshe, A., and Landau, M. (2018) Extreme amyloid polymorphism in *Staphylococcus aureus* virulent PSM α peptides, *Nat. Commun.*, **9**, 3512, doi: 10.1038/s41467-018-05490-0.

105. Goldsbury, C. S., Cooper, G. J., Goldie, K. N., Müller, S. A., Saafi, E. L., et al. (1997) Polymorphic fibrillar assembly of human amylin, *J. Struct. Biol.*, **119**, 17-27, doi: 10.1006/jsbi.1997.3858.
106. Goldsbury, C., Goldie, K., Pellaud, J., Seelig, J., Frey, P., et al. (2000) Amyloid fibril formation from full-length and fragments of amylin, *J. Struct. Biol.*, **130**, 352-362, doi: 10.1006/jsbi.2000.4268.
107. Röder, C., Kupreichyk, T., Gremer, L., Schäfer, L. U., Pothula, K. R., et al. (2020) Cryo-EM structure of islet amyloid polypeptide fibrils reveals similarities with amyloid- β fibrils, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 660-667, doi: 10.1038/s41594-020-0442-4.
108. Gallardo, R., Iadanza, M. G., Xu, Y., Heath, G. R., Foster, R., et al. (2020) Fibril structures of diabetes-related amylin variants reveal a basis for surface-templated assembly, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 1048-1056, doi: 10.1038/s41594-020-0496-3.
109. Schmidt, M., Wiese, S., Adak, V., Engler, J., Agarwal, S., et al. (2019) Cryo-EM structure of a transthyretin-derived amyloid fibril from a patient with hereditary ATTR amyloidosis, *Nat. Commun.*, **10**, 5008, doi: 10.1038/s41467-019-13038-z.
110. Bansal, A., Schmidt, M., Rennegarbe, M., Haupt, C., Liberta, F., et al. (2021) AA amyloid fibrils from diseased tissue are structurally different from *in vitro* formed SAA fibrils, *Nat. Commun.*, **12**, 1013, doi: 10.1038/s41467-021-21129-z.
111. Baskakov, I. V., Katorcha, E., and Makarava, N. (2018) Prion strain-specific structure and pathology: a view from the perspective of glycobiology, *Viruses*, **10**, 723, doi: 10.3390/v10120723.
112. Vörberg, I. M. (2019) All the same? The secret life of prion strains within their target cells, *Viruses*, **11**, 334, doi: 10.3390/v11040334.
113. Bartz, J. C. (2016) Prion strain diversity, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **6**, a024349, doi: 10.1101/cshperspect.a024349.
114. Carta, M., and Aguzzi, A. (2021) Molecular foundations of prion strain diversity, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **72**, 22-31, doi: 10.1016/j.conb.2021.07.010.
115. Glynn, C., Sawaya, M. R., Ge, P., Gallagher-Jones, M., Short, C. W., et al. (2020) Cryo-EM structure of a human prion fibril with a hydrophobic, protease-resistant core, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 417-423, doi: 10.1038/s41594-020-0403-y.
116. Cortez, L. M., Nemani, S. K., Duque Velásquez, C., Sriraman, A., Wang, Y., et al. (2021) Asymmetric-flow field-flow fractionation of prions reveals a strain-specific continuum of quaternary structures with protease resistance developing at a hydrodynamic radius of 15 nm, *PLoS Pathog.*, **17**, e1009703, doi: 10.1371/journal.ppat.1009703.
117. Peelaerts, W., Bousset, L., Van der Perren, A., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., et al. (2015) α -synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration, *Nature*, **522**, 340-344, doi: 10.1038/nature14547.
118. Van der Perren, A., Gelders, G., Fenyi, A., Bousset, L., Brito, F., et al. (2020) The structural differences between patient-derived α -synuclein strains dictate characteristics of Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies, *Acta Neuropathol.*, **139**, 977-1000, doi: 10.1007/s00401-020-02157-3.
119. Schweighauser, M., Shi, Y., Tarutani, A., Kametani, F., Murzin, A. G., et al. (2020) Structures of α -synuclein filaments from multiple system atrophy, *Nature*, **585**, 464-469, doi: 10.1038/s41586-020-2317-6.
120. Shahnavaz, M., Mukherjee, A., Pritzkow, S., Mendez, N., Rabadia, P., et al. (2020) Discriminating α -synuclein strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy, *Nature*, **578**, 273-277, doi: 10.1038/s41586-020-1984-7.
121. Lövestam, S., Schweighauser, M., Matsubara, T., Murayama, S., Tomita, T., et al. (2021) Seeded assembly *in vitro* does not replicate the structures of α -synuclein filaments from multiple system atrophy, *FEBS Open Bio*, **11**, 999-1013, doi: 10.1002/22111-5463.13110.
122. Petkova, A. T., Leapman, R. D., Guo, Z., Yau, W.-M., Mattson, M. P., et al. (2005) Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils, *Science*, **307**, 262-265, doi: 10.1126/science.1105850.
123. Ghosh, U., Thurber, K. R., Yau, W.-M., and Tycko, R. (2021) Molecular structure of a prevalent amyloid- β fibril polymorph from Alzheimer's disease brain tissue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2023089118, doi: 10.1073/pnas.2023089118.
124. Kang, S.-G., Eskandari-Sedighi, G., Hromadkova, L., Safar, J. G., and Westaway, D. (2020) Cellular biology of tau diversity and pathogenic conformers, *Front. Neurol.*, **11**, 590199, doi: 10.3389/fneur.2020.590199.
125. Liebman, S. W., and Chernoff, Y. O. (2012) Prions in yeast, *Genetics*, **191**, 1041-1072, doi: 10.1534/genetics.111.137760.
126. Derkatch, I. L., Bradley, M. E., Zhou, P., and Liebman, S. W. (1999) The *PNM2* mutation in the prion protein domain of SUP35 has distinct effects on different variants of the [*PSI⁺*] prion in yeast, *Curr. Genet.*, **35**, 59-67, doi: 10.1007/s002940050433.
127. King, C. Y. (2001) Supporting the structural basis of prion strains: induction and identification of [PSI] variants, *J. Mol. Biol.*, **307**, 1247-1260, doi: 10.1006/jmbi.2001.4542.
128. Huang, Y.-W., and King, C.-Y. (2020) A complete catalog of wild-type Sup35 prion variants and their protein-only propagation, *Curr. Genet.*, **66**, 97-122, doi: 10.1007/s00294-019-01003-8.
129. Dergalev, A. A., Alexandrov, A. I., Ivannikov, R. I., Ter-Avanesyan, M. D., and Kushnirov, V. V. (2019) Yeast Sup35 prion structure: two types, four parts, many variants, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2633, doi: 10.3390/ijms20112633.
130. Ghosh, R., Dong, J., Wall, J., and Frederick, K. K. (2018) Amyloid fibrils embodying distinctive yeast prion phenotypes exhibit diverse morphologies, *FEMS Yeast Res.*, **18**, foy059, doi: 10.1093/femsyr/foy059.
131. Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R., and Weissman, J. S. (2004) Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences, *Nature*, **428**, 323-328, doi: 10.1038/nature02392.
132. King, C.-Y., Wang, H.-L., and Chang, H.-Y. (2006) Transformation of yeast by infectious prion particles, *Methods*, **39**, 68-71, doi: 10.1016/j.ymeth.2006.04.003.
133. Krishnan, R., and Lindquist, S. L. (2005) Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity, *Nature*, **435**, 765-772, doi: 10.1038/nature03679.
134. Terry, C., Harniman, R. L., Sells, J., Wenborn, A., Joiner, S., et al. (2019) Structural features distinguishing infectious *ex vivo* mammalian prions from non-infectious fibrillar assemblies generated *in vitro*, *Sci. Rep.*, **9**, 376, doi: 10.1038/s41598-018-36700-w.
135. Barinova, K. V., Kuravsky, M. L., Arutyunyan, A. M., Serebryakova, M. V., Schmalhausen, E. V., et al. (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.

STRUCTURE AND POLYMORPHISM OF AMYLOID AND AMYLOID-LIKE AGGREGATES

Review

**A. B. Matiiv¹, N. P. Trubitsina¹, A. G. Matveenko¹,
Y. A. Barbitoff^{1,2}, G. A. Zhouravleva^{1,3}, and S. A. Bondarev^{1,3*}**

¹ *Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg State University,
199034 Saint Petersburg, Russia; E-mail: stanislavspbg@gmail.com*

² *Bioinformatics Institute, 197342 Saint Petersburg, Russia*

³ *Laboratory of Amyloid Biology, Saint Petersburg State University, 199034 Saint Petersburg, Russia*

Amyloids are protein aggregates with a cross- β structure. Interest in the study of amyloids, on the one hand, is associated with their role in the development of a number of socially significant neurodegenerative diseases in humans, and on the other hand, with the discovery of functional amyloids, the formation of which is an integral part of some cellular processes. To date, more than a hundred proteins with amyloid or amyloid-like properties are known. Active studies of the structural organization of aggregates reveal a wide variety of protein conformations in their composition. In the review, we collected examples of this diversity, also considering protein conformation in amyloid-like aggregates. An important part of the article is devoted to the characteristic features of the structure of these protein complexes, which determine the unusual properties of amyloids, including their interaction with amyloid-specific dyes and stability. The review also describes numerous examples of the diversity of amyloid aggregates and its significance for living organisms.

Keywords: cross- β structure, amyloids, amyloid-like aggregates, amyloid polymorphisms

RsfS – ФАКТОР ГИБЕРНАЦИИ ИЛИ ФАКТОР БИОГЕНЕЗА РИБОСОМЫ?

Обзор

© 2022 Б.Ф. Фатхуллин^{1,2*}, А.Г. Габдулхаков¹, М.М. Юсупов^{2,3}

¹ Институт белка РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: morgenstern100@mail.ru

² Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC),
67400 Илькириш-Граффенштаден, Франция

³ Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»,
Лаборатория структурного анализа биомолекул, 420111 Казань, Россия

Поступила в редакцию 31.12.2021

После доработки 20.04.2022

Принята к публикации 20.04.2022

Появление структур бактериальных, архейных и эукариотических рибосом, полученных методами кристаллографии и криоэлектронной микроскопии, послужило толчком к исследованию внутриклеточных регуляторных белков, влияющих на различные этапы трансляции. Среди них присутствуют факторы гибернации рибосом, которые стали активно изучаться в последнее десятилетие. Они участвуют в регуляции процесса биосинтеза белка в стрессовых для организма условиях. Основные задачи гибернационных факторов – снизить энергетические затраты на биосинтез белка и сохранить от деградации имеющиеся функциональные рибосомы, тем самым увеличив выживаемость клеток в неблагоприятных условиях. Несмотря на широкий интерес к данной теме, опубликовано всего несколько работ, посвящённых исследованию фактора RsfS (Ribosome silencing factor S). Согласно результатам этих работ, фактор RsfS принято относить к группе факторов гибернации. Однако последняя работа в области структурных исследований созревания 50S-субъединицы рибосомы демонстрирует наличие у RsfS признаков, присущих факторам биогенеза, например, ассоциированность с незрелой рибосомной субъединицей, как и у его митохондриального ортолога MALSU1. В данном обзоре мы обобщили имеющуюся информацию по фактору RsfS, его функциям и структурным особенностям, а также провели сравнительный анализ фактора с митохондриальным ортологом MALSU1, для того чтобы попытаться ответить на возникающий вопрос: «RsfS – фактор гибернации или фактор биогенеза рибосомы?» Данный обзор может послужить толчком для исследования молекулярных механизмов, в которых задействован фактор RsfS и которые на сегодняшний день остаются полностью неизвестными.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибосома, фактор биогенеза рибосомы, фактор гибернации, RsfS.

DOI: 10.31857/S0320972522050025, **EDN:** ASSKBQ

ВВЕДЕНИЕ

Рибосома – рибонуклеопротеидный комплекс, отвечающий во всех живых организмах за синтез белков и трансляцию генетического кода. У бактерий рибосома (70S) состоит из большой и малой субъединиц. Малая 30S-субъединица, содержащая 16S рибосомную РНК

(рРНК) и около 20 рибосомных белков, связывает мРНК и обеспечивает опосредованное кодон-антикодонное взаимодействие. Большая 50S-субъединица, состоящая из 23S- и 5S-рРНК и более 30 рибосомных белков, содержит каталитический сайт пептидилтрансферазы [1]. Трансляция – это четырёхэтапный процесс, состоящий из стадий инициации, роста полипептидной цепи, терминации и рециклинга рибосом. Каждый из этих этапов катализируется соответствующими трансляционными факторами: инициации, элонгации, терминации и рециклинга [2]. Одним из способов регуляции экспрессии генов является биогенез самого трансляционного аппарата [3]. Биогенез рибосомы – сложный многоступенчатый процесс, включающий в себя синтез и созревание рРНК, синтез, модификацию и фолдинг рибосомных

Принятые сокращения: крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; GTPBP – ГТФ-связывающий белок (GTP Binding Protein); HPF – фактор гибернации рибосомы (Hibernation Promoting Factor); MALSU1 – фактор митохондриальной сборки большой субъединицы рибосомы 1 (Mitochondrial Assembly of ribosomal Large Subunit 1); mt-ACP – митохондриальный белок-носитель ацильного остатка (mitochondrial Acyl Carrier Protein); RsfS – фактор сайленсинга рибосомы S (Ribosome silencing factor S).

* Адресат для корреспонденции.

белков и последовательную сборку рибосомных субъединиц [4]. Данный процесс жёстко контролируется широким спектром факторов биогенеза, среди которых транскрипционные факторы, эндорибонуклеазы, рРНК-хеликазы, молекулярные шапероны, ферменты, модифицирующие рРНК и белок, и факторы сборки рибосом [5]. Биогенез рибосом, а, следовательно, и количество готовых для трансляции рибосомных субъединиц напрямую зависит от стрессовых условий, клеточного цикла и от доступности для клетки питательных веществ [6, 7]. Клетки бактерий могут длительное время находиться в стационарной фазе роста, повышая свою устойчивость к воздействию со стороны окружающей среды [8]. Так как биосинтез белка является одним из самых энергозатратных процессов в бактериальной клетке (в *Escherichia coli* на это расходуется до 40% всего энергооборота), то функционирование аппарата трансляции должно строго регулироваться [3]. Контроль обеспечивается механизмами гибернции рибосом, которые запускаются индуцированными стрессом белками (стресс-факторами) – гибернционными факторами (рис. 1). Набор этих факторов в разных штаммах и видах различен [8–11]. К факторам гибернции относят HPF (Hibernation Promoting Factor), фактор, модулирующий рибосому (RMF, Ribosome Modulation Factor), фактор, ассоциированный с рибосомой ингибитор A (RaiA, Ribosome-associated inhibitor A) и энергозависимый регулятор трансляции A (EttA, Energy-dependent translational throttle A) [12]. В отличие от факторов биогенеза, ассоциированных с незрелыми рибосомами на этапе биогенеза, факторы гибернции нацелены на контроль уровня трансляции путём блокирования зрелых, готовых к трансляции, рибосом в неактивном состоянии. Именно к факторам гибернции принято относить и фактор сайленсинга рибосомы S (RsfS, ribosome silencing factor S) – однодоменный белок с молекулярной массой 13–15 кДа, ранее известный как YbeB [13–15]. На сегодняшний день в литературе имеется всего несколько работ, посвящённых фактору RsfS, наиболее значимыми результатами которых являются определение влияния делеции гена *rsfS* на рост культуры клеток *E. coli*, определение структуры гомодимера RsfS из *Mycobacterium tuberculosis*, структуры гетеродимера uL14 с RsfS и комплекса RsfS с 50S-субъединицей рибосомы из *Staphylococcus aureus*. Эти работы были выполнены в рамках концепции фактор RsfS – стресс-фактор, что согласовывалось с получаемыми результатами. Однако последняя работа, посвящённая исследованию созревания 50S-субъединицы рибосомы из

E. coli, продемонстрировала возможность участия фактора RsfS, как фактора биогенеза рибосомы, что не соответствует концепции гибернционного фактора. Данный факт дополнительно подтверждается наличием структурных и функциональных аналогий между RsfS и фактором биогенеза митохондриальной рибосомы MALSU1 (Mitochondrial Assembly of ribosomal Large Subunit 1 или фактор митохондриальной сборки большой субъединицы рибосомы 1).

В данном обзоре мы попытались разобраться в возникшем противоречии классификации фактора RsfS, а также привлечь внимание научного сообщества к «белым пятнам» в молекулярных механизмах, в которых задействован фактор RsfS. В частности, на сегодняшний день не известно: за счёт каких механизмов происходит активация/инактивация внутриклеточного синтеза фактора RsfS; как регулируется его количество в цитоплазме и задействованы ли в этом алармоны [16], характерные регуляторы для стресс-факторов; каков механизм диссоциации RsfS от 50S-субъединицы рибосомы и имеется ли белок-регулятор этого процесса? Мы считаем, что собранная в этом обзоре информация может послужить базисом для новых исследований в этом направлении.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ПОИСК ПАРТНЕРОВ ФАКТОРА RsfS

Фактор RsfS, а точнее являющийся им гипотетический белок YbeB, был выделен из пула неохарактеризованных консервативных белков [14], ген которого (или его ортолога) был обнаружен как минимум в 2928 видах, включая большинство бактерий [17], растений (ортолог Iojar [13]) и человека (ортолог C7orf30 [18]). При этом выравнивание аминокислотных последовательностей RsfS даёт достаточно низкий процент идентичности, не превышающий 40%, в зависимости от организма [19]. Соседствующее расположение гена *ybeB* с геном *nadD* мононуклеотид аденилилтрансферазы никотиновой кислоты в геноме большинства бактерий позволило предположить участие данного белка в метаболизме NAD. Также сообщалось, что наличие или отсутствие продукта гена *ybeB* в *E. coli* не приводит к значительному изменению фенотипа клеток [20]. Первым этапом в определении функционального значения фактора RsfS (YbeB) в бактериальных клетках стала работа по обнаружению места его посадки [21]. Эксперименты по изотопному мечению белков и анализу профилей центрифугирования рибосом в градиен-

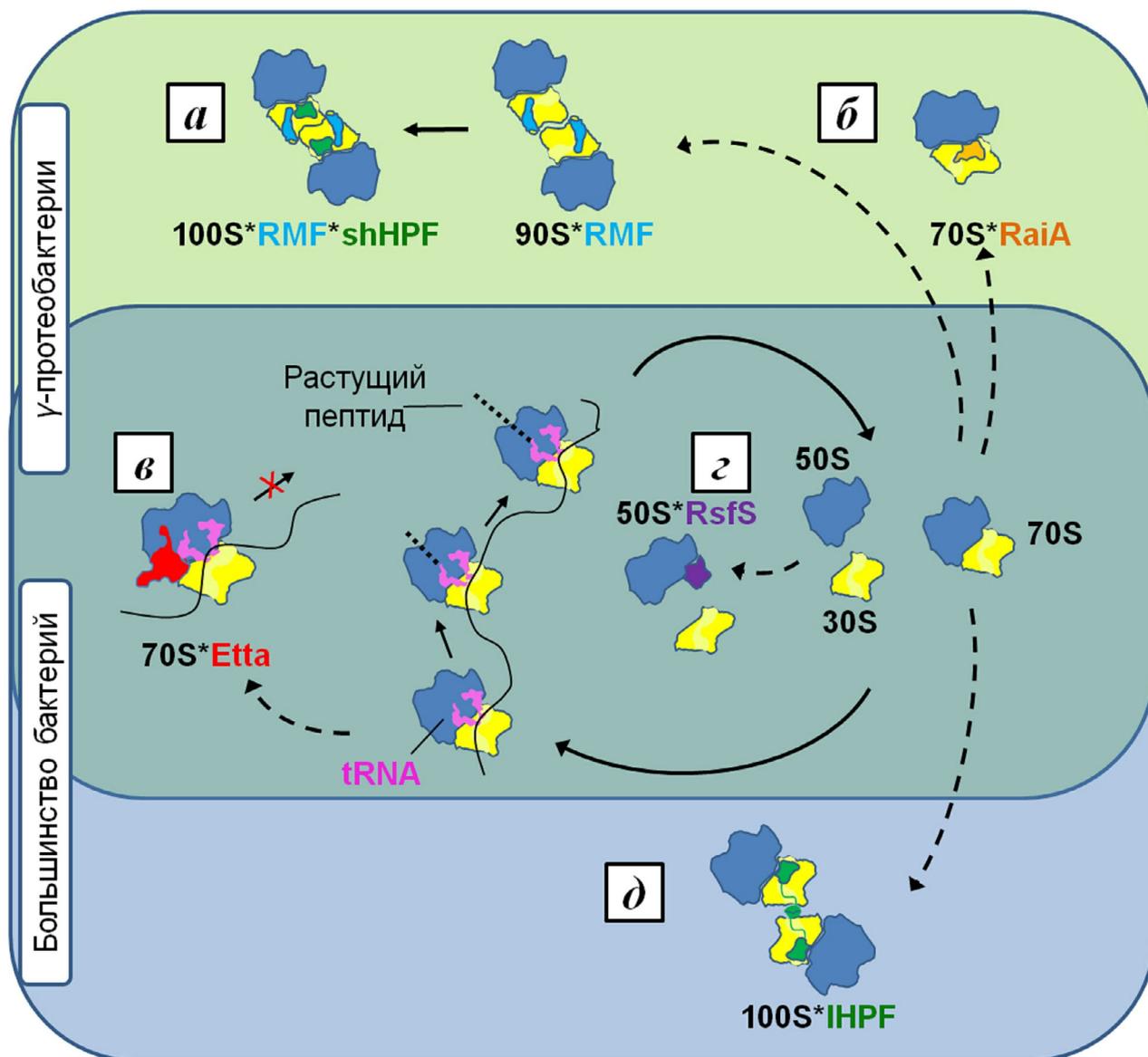


Рис. 1. Регуляция трансляции гибернационными факторами в γ -протеобактериях и других бактериях. При переходе в стационарную фазу или в условиях стресса наблюдается снижение уровня трансляции в γ -протеобактериях за счёт: образования 100S-димеров рибосом при участии фактора, модулирующего рибосому (RMF), и короткого фактора гибернации рибосомы (shHPF) (а); увеличения количества неактивных 70S-мономеров в комплексе с ассоциированным с рибосомой ингибитором А (RaiA) (б); остановки рибосом, прошедших этап инициации энергезависимым регулятором трансляции А (фактором EttA) (в) и предотвращения ассоциации 30S- и 50S-субъединиц фактором сайленсинга рибосомы S (RsfS) (з). В остальных бактериях снижение уровня трансляции в условиях стресса и стационарной фазы роста опосредовано через увеличение количества 100S-димеров рибосом, индуцированных длинным фактором гибернации рибосомы (IHPF) (д), а также через работу факторов EttA (в) и RsfS (з)

тах сахарозы продемонстрировали связанность фактора RsfS с большой 50S-субъединицей рибосомы, при этом комплексов RsfS с малой 30S-субъединицей, 70S-рибосомами и с полисомами не наблюдалось.

Следующим шагом стало исследование белок-белковых взаимодействий между RsfS и различными мишенями. В результате исследо-

ваний сети белок-белковых взаимодействий в *Treponema pallidum* методом двугибридного анализа обнаружены взаимодействия ортолога фактора RsfS (TP0738) с белками GatC, bL9, InfA, uL29, bL31, Thil, Def, bL32 и RimM (таблица) [22]. Из полученных данных следовало, что RsfS может участвовать в процессе трансляции. Применение методов LC-MS и MALDI-TOF

для анализа белок-белковых взаимодействий в *E. coli* выявило ряд белков, контактирующих с фактором RsfS (YbeB) [23]. Среди них присутствовало четыре рибосомных белка большой 50S-субъединицы рибосомы: uL4, bL7/L12, uL14 и bL19 (таблица). Двугибридный анализ со всеми потенциальными партнёрами фактора RsfS, обнаруженными в *T. pallidum* [22] и *E. coli* [23], продемонстрировал наиболее сильное взаимодействие между RsfS и рибосомным белком uL14 как в *T. pallidum*, так и в *E. coli* [17]. Это взаимодействие оказалось консервативным и в протестированных клетках грамположительной бактерии *Streptococcus pneumoniae*, цианобактерии *Synechocystis PCC 6803*, *Zea mays* (ортолог Юар и хлоропластный uL14) и *Homo sapiens* (ортолог C7orf30 и митохондриальный uL14). Таким образом, uL14 идентифицирован как основной специфический партнёр для связывания RsfS на большой субъединице рибосомы. Оставшиеся партнёры RsfS, с которыми фактор взаимодействует слабее, чем с uL14, оказались забыты. Мы считаем, что именно среди этих партнёров может находиться «ключ» к пониманию пока неизвестных этапов функционирования RsfS,

например, его диссоциация и высвобождение 50S-субъединицы рибосомы. Обнаруженные молекулярные взаимодействия также могут свидетельствовать о наличии неизвестных нам молекулярных механизмов, в которых может быть задействован фактор RsfS.

МОДЕЛИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ RsfS С 50S-СУБЪЕДИНИЦЕЙ РИБОСОМЫ

Теоретическая модель взаимодействия фактора RsfS с 50S-субъединицей рибосомы была предложена Hauser et al. [17] на основе молекулярного докинга и биохимических экспериментов. Для молекулярного докинга модель фактора RsfS *E. coli* была сгенерирована на основе гомологичных структур (PDB: 2ID1, 2O5A), модель рибосомного белка uL14 использовалась из кристаллической структуры 70S-рибосомы *E. coli* (PDB: 2AWB). Критерием отбора финальной модели являлось отсутствие стерических препятствий между фактором RsfS и компонентами 50S-субъединицы рибосомы при наложении сгенерированной модели гетеродимера

Белки, взаимодействие которых с RsfS протестировано методом двугибридного анализа

| Белок | Организм | Описание (UniProt) | Источник |
|---|---------------------------|---|----------|
| ThiI InfA bL32 RimM Def uL29 bL9 GatC bL31 | <i>Treponema pallidum</i> | вероятная тРНК серотрансфераза ThiI трансляционный инициаторный фактор IF-1 рибосомный белок bL32 50S-субъединицы фактор созревания RimM пептид деформилаза Def рибосомный белок uL29 50S-субъединицы рибосомный белок bL9 50S-субъединицы С-субъединица глутамил-тРНК (Gln) амидотрансферазы рибосомный белок bL31 50S-субъединицы | [22] |
| DhaK YehL YehQ bL19 Csa uL4 YihU bL7/L12 uL14 | <i>Escherichia coli</i> | дигидроацетон киназа АТФаза семейства MoxR белок, содержащий домен SWIM (цинковый палец) рибосомный белок bL19 50S-субъединицы мультифункциональный CCA-белок рибосомный белок uL4 50S-субъединицы 3'-сульфолактодегидроредуктаза рибосомный белок bL7/L12 50S-субъединицы рибосомный белок uL14 50S-субъединицы | [23] |

Примечание. Представлены данные из работы Hauser et al. [17]. Список партнёров из *E. coli* предложен на основе масс-спектрометрического анализа комплексов с RsfS [23].

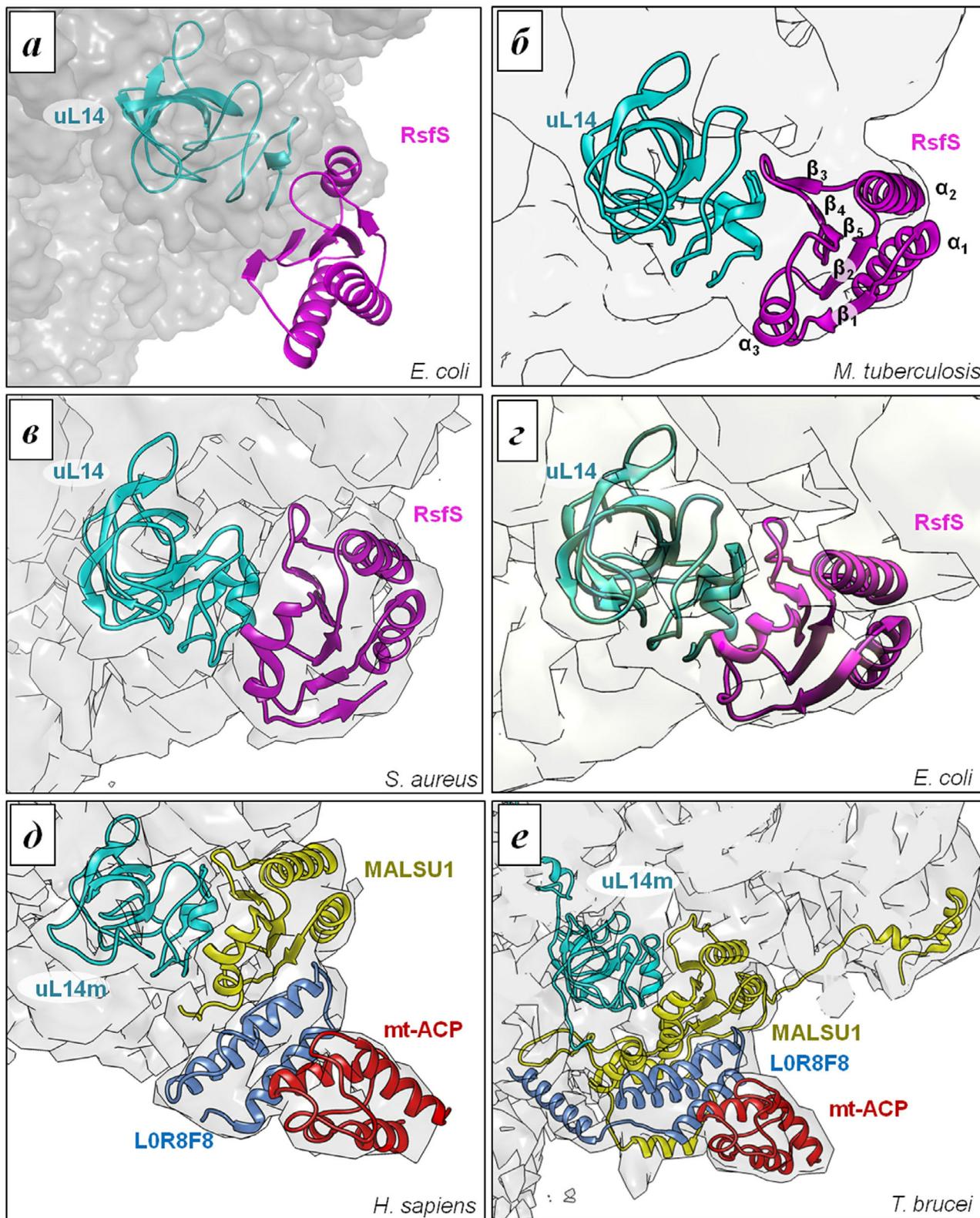


Рис. 2. Модели взаимодействия RsfS и его митохондриального ортолога MALSU1 с рибосомным белком uL14 в составе большой субъединицы рибосомы (серый). *a* – Теоретическая модель для *Escherichia coli* на основе биохимических экспериментов [17]. Модели на основе данных криоэлектронной микроскопии: *b* – комплекс из *Mycobacterium tuberculosis* [15]; *c* – комплекс из *Staphylococcus aureus* [19]; *d* – комплекс из *E. coli* [24]; *e* – комплекс из *Trypanosoma brucei* [26] с дополнительными белками L0R8F8 и митохондриальным белком-носителем ацильного остатка (mt-ACP)

RsfS**uL14* на структуры 70S-рибосомы *E. coli* (PDB: 2AWB, 2AW7). Для подтверждения теоретической модели комплекса RsfS с 50S-субъединицей рибосомы (рис. 2, а) в белке *uL14* проводились одиночные замены на аланин а.о., расположенных в предполагаемой области контакта между RsfS и *uL14* [17]. Далее методом дву-гибридного анализа отслеживалось сохранение гетеродимера RsfS и *uL14*. На основании полученных данных были идентифицированы а.о. в *uL14*, формирующие область контакта этих двух белков в *E. coli*: Lys114, Thr97, Arg98, Ser117, из которых первые два оказались наиболее критичными для сохранения комплекса, а замена Ser117Ala эффекта не оказала. При этом Thr97 и Arg98 участвуют в формировании межсубъединичного моста между 30S- и 50S-субъединицами 70S-рибосомы *E. coli*. Согласно предложенной теоретической модели взаимодействия RsfS и *uL14*, при посадке фактора на 50S-субъединицу блокируются Thr97 и Arg98 и возникают стерические препятствия для ассоциации субъединиц до 70S-рибосомы, что согласовывалось с биохимическими данными.

Первая кристаллическая структура изолированного фактора RsfS – это структура мутантной формы фактора с одиночной заменой Tyr102Ala из *M. tuberculosis* [15]. Так как авторам не удалось получить кристаллы полноразмерного фактора дикого типа, был применён скрининг мутантов RsfS с одиночными заменами а.о., предположительно, находящихся на поверхности белка. Только один из девяти мутантов – с заменой Tyr102Ala – сформировал кристаллы, отражавшие рентгеновские лучи с разрешением 2,1 Å. Согласно полученной структуре, фактор RsfS – однодоменный белок, имеющий укладку $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 2$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 3$, где пять β -тяжей образуют β -лист. Спирали $\alpha 1$ и $\alpha 2$ располагаются с одной стороны β -листа, а спираль $\alpha 3$ – на его краю с другой (взаимное расположение элементов вторичной структуры изображено на рис. 2, б).

Первая структура комплекса 50S-субъединицы рибосомы с фактором RsfS получена методом криоэлектронной микроскопией (крио-ЭМ) с разрешением 9 Å для *M. tuberculosis* [15]. В области рядом с рибосомным белком *uL14* авторы обнаружили плотность, в которую вписали мономер кристаллической структуры фактора RsfS *M. tuberculosis* (рис. 2, в). Был сделан вывод, что водородные связи и электростатические силы, предположительно, являются преобладающим взаимодействием между RsfS и *uL14*, так как электростатический потенциал интерфейса RsfS, преимущественно, отрицательный, а *uL14* – положительный. Контакты между ними

формируются следующими элементами вторичной структуры: со стороны *uL14* – это две С-концевые α -спирали (Arg104–Leu117); со стороны RsfS – это β -листы ($\beta 1$, Val26–Asp30; $\beta 2$, Cys40–Gly46; $\beta 3$, Arg72–Gly75; $\beta 4$, Trp81–Asp85; $\beta 5$, Ile89–His95), петля между $\beta 1$ - и $\beta 2$ -тяжами (Val31–Asp39) и С-концевая $\alpha 3$ -спираль (Phe101–Gly109). Сравнение полученной структуры комплекса 50S*RsfS *M. tuberculosis* с предложенной Hauser et al. [17] теоретической моделью 50S*RsfS *E. coli* выявило существенное отличие: поворот фактора RsfS на 172° по нормали к плоскости интерфейсов. При этом взаимодействие RsfS с *uL14* происходит через те же элементы вторичной структуры: $\alpha 3$ -спираль, β -лист и петлю между $\beta 1$ - и $\beta 2$ -тяжами. Li et al. [15] протестировали влияние четырнадцати одиночных замен а.о. на факторе RsfS, формирующих интерфейс с *uL14*, на его способность ингибировать трансляцию. Только замена Glu74Ala позволила получить растворимый препарат белка, продемонстрировавший потерю активности фактора на 64%, что, скорее всего, связано со снижением аффинности RsfS к 50S-субъединице рибосомы.

Структура комплекса 50S-субъединицы с фактором RsfS из *S. aureus* с высоким разрешением (3,2 Å) получена методом крио-ЭМ в исследовании Khusainov et al. [19]. Модель взаимодействия в RsfS с *uL14* (рис. 2, в) оказалась близка к модели из *M. tuberculosis* (рис. 2, б) и не совпадала с моделью для *E. coli* (рис. 2, а) [15, 17]. Кроме основного контакта в комплексе между RsfS и *uL14*, высокое разрешение позволило предположить наличие дополнительных потенциальных контактов между RsfS и 50S-субъединицей: с рибосомным белком bL19 и спиралью H95 23S рРНК (рис. 3, а). В частности, могут формироваться водородные связи между отрицательно заряженными а.о. Asp32 и Asp84 фактора RsfS и положительно заряженными а.о. Arg39, Arg41 и Gln43, находящимися в петле рибосомного белка bL19. Контакты между отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом спирали H95 23S рРНК и боковыми группами Gln49, Arg53 и Lys56 фактора RsfS также могут участвовать в его стабилизации на 50S-субъединице [19].

Для определения комплексообразующих взаимодействий между RsfS и *uL14* *S. aureus* Khusainov et al. [19] получили кристаллическую структуру комплекса гетеродимера RsfS**uL14* с разрешением 2,3 Å. Сравнение кристаллической и крио-ЭМ-структур показало полную идентичность третичных структур *uL14*, в то время как RsfS в кристалле имел более компактную структуру. Высокое разрешение кристаллической структуры позволило определить сеть водород-

ных связей и области гидрофобных взаимодействий в интерфейсе гетеродимера. При этом основные контакты между а.о. Arg97, Arg107, Lys113 из uL14 и Glu70, Asp81, Tyr98 из RsfS являются консервативными в бактериях [19]. Из них только Arg97 и Lys113 обнаруживаются в списке важных остатков (Arg98 и Lys114 соответственно) для формирования комплекса RsfS*uL14 в *E. coli* [17]. В кристаллической структуре гетеродимера они образуют по одной водородной связи, что, возможно, опровергает их критичную значимость для комплекса в *S. aureus*. В ходе выделения и очистки RsfS *S. aureus* Khusainov et al. [19] не наблюдали гомодимерную фракцию, как в случае с RsfS *M. tuber-*

culosis, что может говорить либо о различии в механизмах действия, либо о необходимости модифицировать теоретическую модель работы фактора RsfS [15].

Последние данные в области исследования бактериального фактора RsfS получены на рибосомах *E. coli* методом крио-ЭМ Nikolay et al. [24]. Им удалось определить три структуры нативных комплексов 50S-субъединиц на поздних этапах созревания с факторами биогенеза. Также были определены структуры комплексов зрелой 50S-субъединицы с фактором RsfS и ГТФазой ObgE, являющейся бактериальным фактором созревания. В структурах трёх промежуточных этапов биогенеза рибосомы обнаружены

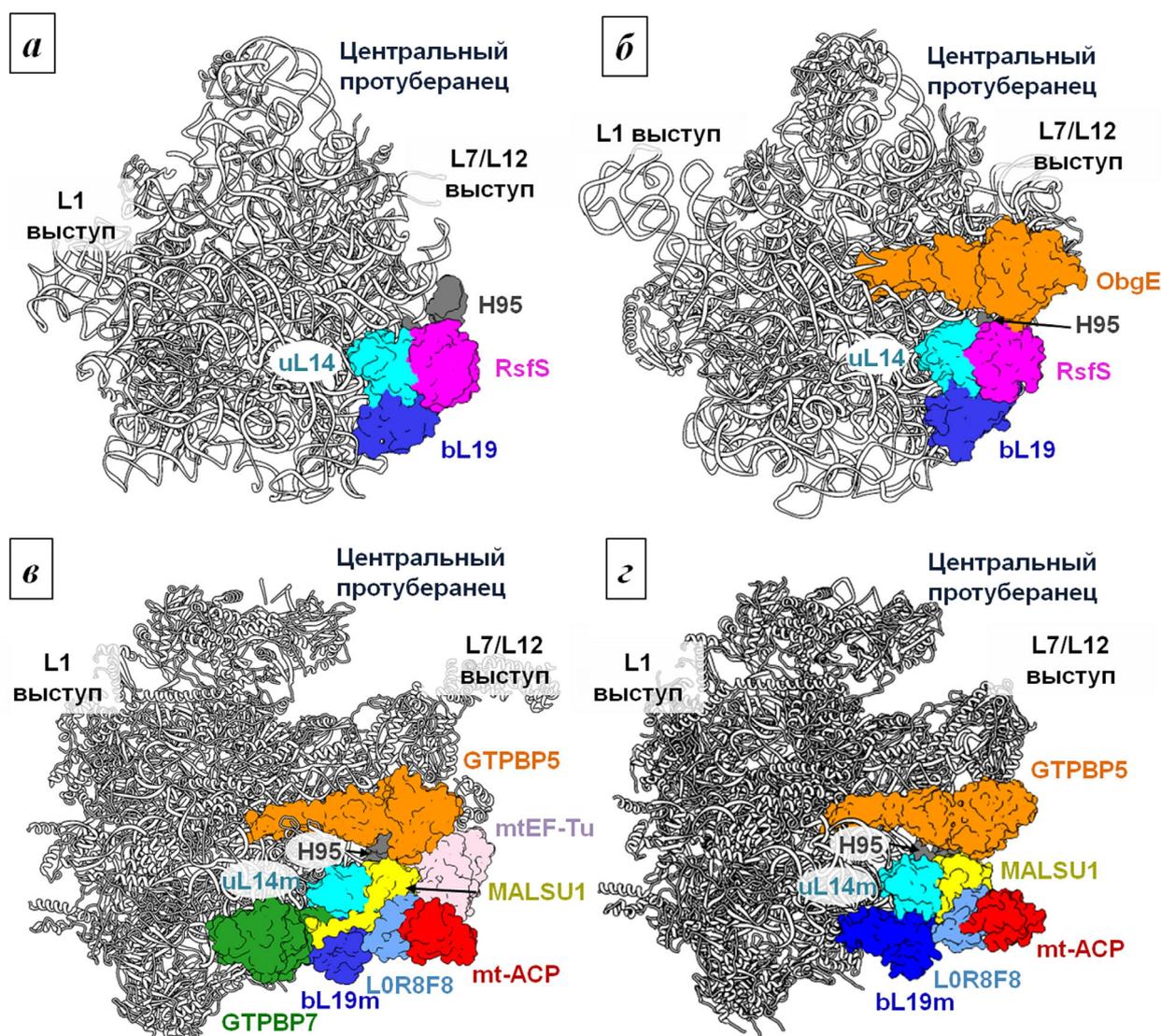


Рис. 3. Партнёры, взаимодействующие с RsfS и с его ортологом MALSU1, по данным крио-ЭМ: *a* – 50S-субъединица рибосомы *S. aureus* (PDB: 6SJ6); *б* – 50S-субъединица рибосомы *E. coli* (PDB: 7BL4); *в* и *г* – промежуточные состояния большой субъединицы миторибосомы *H. sapiens* (PDB: 7O9K, 7ODT)

плотности для факторов RsfS и ObgE [24]. Область связывания RsfS и его ориентация относительно 50S-субъединицы рибосомы (рис. 2, *з*) совпадает с полученными ранее структурами, что подтверждает консервативность данного механизма в бактериях и опровергает теоретическую модель Hauser et al. [17] для *E. coli* (рис. 2, *а*). Мы проанализировали интерфейс между 50S и RsfS *E. coli* (PDB: 7BL4). В нём присутствуют а.о., боковые группы которых могут формировать водородные связи между uL14 и RsfS в *E. coli* – Arg98, Gln93, Lys114, Arg108 на поверхности uL14 и Glu70, Asp81, Tyr98 – со стороны RsfS. При формировании комплекса Ile33, Met37, Trp77, Val79, Met90 на RsfS и Met113, Ile116, Leu118 – на uL14 становятся недоступными молекулам растворителя, формируя гидрофобное ядро. Список перечисленных аминокислот хорошо согласуются со списком аминокислот, формирующих интерфейс в гетеродимере uL14*RsfS из *S. aureus* [19], что позволяет интерпретировать результаты Hauser et al. [17] по влиянию мутаций на формирование комплексов uL14*RsfS в *E. coli*. Мы считаем, что Arg98 и Lys114 участвуют в формировании водородных связей, поэтому их боковые группы важны для стабилизации гетеродимера. Боковая группа Ser117 находится в области гидрофобного ядра, и её потеря не может оказать диссоциирующего эффекта. Причины, по которым боковая группа Thr97 является критичной для формирования гетеродимера, не очевидны, так как данная аминокислота находится на периферии интерфейса и никаких связей не образует. Возможно, боковая группа Thr97 участвует в правильном позиционировании боковой группы Tyr98 RsfS, которая, в свою очередь, формирует водородную связь и закрывает гидрофобное ядро в интерфейсе гетеродимера.

В структурах созревающих рибосом из *E. coli* [24] также обнаруживаются контакты, аналогичные структуре комплекса RsfS с рибосомой из *S. aureus* [19]: между положительно заряженными а.о. Lys36, Arg38 и Gln40 bL19 и отрицательно заряженными Ser32, Asp84 фактора RsfS. В сторону отрицательно заряженного сахарофосфатного остова спирали H95 23S рРНК направлены боковые группы Arg46, Gln57 и Arg60 RsfS, вероятно, участвующие в стабилизации фактора на 50S-субъединице *E. coli*. Комплекс зрелой 50S-субъединицы *E. coli* с RsfS и ObgE, полученный со средним разрешением крио-ЭМ-карты в 2,4 Å (рис. 3, *б*), позволил визуализировать взаимодействия между факторами [24]. Использование нерасщепляемого аналога ГТФ, GMPPNP, зафиксировало ГТФазу ObgE в связанном состоянии. Обнару-

жено, что RsfS (Arg46, His47) совместно со спиралью H95 23S рРНК (A2660–A2662) формируют аналог связывающего кармана для β-шпильки (Leu198–Val211) G-домена ObgE, при этом с противоположной стороны G-домен фиксируется спиралью H43 и H44 23S рРНК. Nikolay et al. [24] предполагают, что такое расположение может ограничивать подвижность G-домена ObgE и тем самым запускать ГТФазную активность.

Сравнивая результаты структурных исследований фактора RsfS и его комплекса с 50S-субъединицей рибосомы, мы обнаруживаем высокую схожесть моделей комплексов RsfS как со зрелыми 50S-субъединицами, так и с созревающими субъединицами. Площадь интерфейса между RsfS и uL14 значительно превосходит контакты RsfS с дополнительными партнёрами bL19 и H95 23S рРНК в комплексе с 50S-субъединицей рибосомы, что демонстрирует высокую аффинность фактора не к субъединице, а именно к рибосомному белку uL14, как к основному партнёру. Следовательно, можно предположить, что для связывания фактора RsfS на большой субъединице рибосомы необходим только лишь свободный интерфейс uL14. Это предположение подтверждается высокой аффинностью RsfS только к рибосомному белку uL14 [17, 23], наличием структуры гетеродимера RsfS с uL14 [19] и совпадением моделей созревающей и зрелой 50S-субъединицы рибосомы [15, 19, 24]. Из полученных структурных данных комплексов мы можем заключить, что добавление фактора RsfS к 50S-субъединице рибосомы *in vitro* (к зрелой или на любой стадии созревания) априори будет образовывать комплекс при условии доступности интерфейса рибосомного белка uL14. Именно так проводились эксперименты [15, 19]. Возможно, что таких комплексов не наблюдалось бы, если бы в смеси присутствовал агент, который либо запускает процесс диссоциации фактора RsfS с 50S-субъединицы рибосомы, либо препятствует связыванию фактора RsfS за счёт его инактивации. Khusainov et al. [19] выдвинули гипотезу, что для диссоциации фактора RsfS с 50S-субъединицы рибосомы необходим дополнительный ГТФазный фактор, по аналогии с HflX-механизмом высвобождения фактора гибернации HPF, который мог бы запускать процесс диссоциации через гидролиз ГТФ [27]. Сам факт наличия крио-ЭМ-комплексов [15, 19] говорит о том, что ни RsfS, ни субъединицы рибосомы процесс диссоциации фактора не регулируют. В случае созревающих рибосом *E. coli* [24] комплексы с RsfS были получены из лизатов клеток, собранных на экспоненциальной фазе роста клеточной культуры, что исключает нали-

чие стресса, как в стационарной фазе роста [17]. В целом это позволяет трактовать функцию фактора RsfS как фактора созревания большой субъединицы рибосомы, но, безусловно, нужны дополнительные функциональные тесты, которые однозначно бы продемонстрировали отличия в созревании большой субъединицы рибосомы в зависимости от наличия и отсутствия фактора RsfS в клетках.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ФАКТОРА RsfS

Поскольку делеционные мутанты с нарушенным процессом биогенеза рибосом приводят к холодочувствительным штаммам [28–30], то в первых тестах по определению функций фактора RsfS в бактериальных клетках *E. coli* проводилась оценка влияния отсутствия фактора RsfS на рост клеток. Эксперименты продемонстрировали, что делеция гена *rsfs* не приводит к холодочувствительному фенотипу [21]. Эксперименты по отслеживанию конкурентного роста штаммов *E. coli* Δ *rsfs* и дикого типа показали низкую конкурентоспособность клеток с делецией в богатой питательной среде и абсолютную неконкурентоспособность при переносе клеток в ходе их роста из богатой питательной среды в бедную [17]. Если в первом случае соотношение количества клеток дикого типа к клеткам делеционного штамма достигало значения 9 : 1 за 35 поколений, то во втором случае – всего за 5 поколений. Перенос клеток с делецией из богатой питательной среды в бедную также приводил к остановке их роста при достижении стационарной фазы на 14 часов с последующим возобновлением скорости удвоения до уровня скорости клеток дикого типа [22].

Эксперименты по экспрессии β -галактозидазы в клетках *E. coli* дикого типа и с делецией гена Δ *rsfs* выявили накопление продукта трансляции в стационарной фазе роста в клетках с делецией, в то время как в клетках дикого типа уровень экспрессии значительно снижался [17]. Аналогичное снижение трансляции наблюдалось и в экспериментах *in vitro* с бесклеточной системой трансляции. Фактор RsfS, связываясь со свободной 50S-субъединицей рибосомы, предотвращал ассоциацию 30S- и 50S-субъединиц и тем самым приводил к снижению уровня трансляции в 5 раз по сравнению с контролем. Стоит отметить, что такого эффекта не наблюдалось при добавлении фактора к 70S-рибосомам [17]. Полученные экспериментальные данные позволили сделать следующие выводы о функциях RsfS: фактор препятствует ассоциа-

ции рибосомных субъединиц до 70S-рибосомы, при этом не взаимодействует с транслирующими рибосомами (рис. 1, *з*). Отсутствие RsfS приводит к низкой адаптируемости клеток при переходе от богатой питательной среды к бедной и к снижению их жизнеспособности в стационарной фазе роста, что в итоге ведёт к гибели клеток [17].

Работа Hauser et al. [17] – первая работа, посвящённая исследованию бактериального фактора RsfS. Именно из её результатов вытекает гипотеза о факторе RsfS как о стресс-факторе. Смоделированные авторами условия голодания (перенос клеток из богатой питательной среды в бедную), как и стационарная фаза роста – это условия стресса, в которых отсутствие фактора RsfS приводило к снижению выживаемости клеток. Отсюда следует важное заключение о необходимости фактора RsfS в условиях стресса. Отсутствие накопления продуктов трансляции β -галактозидазы в стационарной фазе роста клеток *in vivo* (стрессовые условия), что также воспроизведено в экспериментах *in vitro*, является яркой демонстрацией функции RsfS – остановка трансляции ради выживания. Если рассматривать фактор RsfS с точки зрения концепции фактора созревания, то это подразумевает его активную вовлечённость в процесс биогенеза рибосомы. В этом случае RsfS должен быть важен на этапе активного роста и деления клеток (экспоненциальная фаза роста культуры клеток). Однако результат отсутствия фактора RsfS в делеционных мутантах *E. coli* проявляется только в стационарной фазе роста (стрессовые условия), когда большинство рибосом уже созрели и не нуждаются в факторах биогенеза.

В последней работе, посвящённой созреванию 50S-субъединицы *E. coli* [24], обнаружено, что как зрелые, так и незрелые 50S-субъединицы способны связывать ГТФазу ObgE. Однако только зрелые 50S-субъединицы стимулируют ГТФазную активность G-домена ObgE, которая увеличивается на 15% при добавлении RsfS [24]. Анализ ГТФазной активности с течением времени показал увеличение скорости гидролиза при добавлении фактора RsfS на 45%. Таким образом, одной из функций RsfS является стимуляция 50S-опосредованной ГТФазной активности ObgE [24].

Работа Nikolay et al. [24] – последняя вышедшая работа, в которой исследовался бактериальный фактор RsfS, и первая работа, в которой было сделано однозначное заключение, что фактор RsfS обладает функциями фактора созревания 50S-субъединицы рибосомы. В пользу данного утверждения приводятся функциональные тесты с обнаруженным стимулирующим эффек-

том фактора RsfS ГТФазной активности G-домена фактора биогенеза рибосомы ObgE. Действительно, если бы фактор RsfS не участвовал в биогенезе рибосомы, то сложно объяснить «случайно» возникший стимулирующий эффект ГТФазной активности ObgE от связывания RsfS на 50S-субъединице рибосомы.

MALSU1 – МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ОРТОЛОГ RsfS

Li et al. [15] выдвинули гипотезу, что RsfS может иметь более широкий спектр функций в клетках, помимо регуляции уровня трансляции. Такие выводы были сделаны на основе обнаруженных функций ортолога MALSU1 (ранее C7orf30) человека. Данный белок участвует в сборке и стабилизации большой субъединицы митохондриальных рибосом [18, 31, 32]. В эукариотической рибосоме с uL14 связывается фактор eIF6, который предотвращает преждевременную ассоциацию большой и малой субъединиц, однако структурной схожести с RsfS не имеет [33, 34].

В качестве подтверждения этой гипотезы можно рассматривать структуры позднего этапа созревания большой субъединицы митохондриальной рибосомы (миторибосомы) человека в комплексе с ортологом RsfS – MALSU1 [25]. Комплексы получены методом крио-ЭМ со средним разрешением 3 Å. В процессе интерпретации карт крио-ЭМ обнаружено, что фактор MALSU1 связан с белком uL14m большой субъединицы (рис. 2, д). 3D-Модель MALSU1 для крио-ЭМ-структуры была построена на основе ортолога из *M. tuberculosis*. Сравнение пространственных структур MALSU1 и RsfS *M. tuberculosis* показало их схожесть (rmsd = 1,9 Å), а контактирующая область согласовывалась с мутациями, которые приводили к диссоциации комплекса в *E. coli* [17]. В комплексе обнаружено взаимодействие MALSU1 с bL19m и сарцин-рициновой петлёй (H95) митохондриальной рРНК большой субъединицы, что, возможно, помогает правильному сворачиванию митохондриальной рРНК в ходе биогенеза. Эти контакты аналогичны описанным выше дополнительным контактам в комплексах RsfS с большой 50S-субъединицей рибосомы *S. aureus* и *E. coli* [19].

В крио-ЭМ-карте комплекса в области посадки MALSU1 также обнаружена плотность, которую интерпретировали как соответствующую двум белкам. Первый белок – L0R8F8, непосредственно взаимодействующий с MALSU1, второй – митохондриальный белок-носитель ациль-

ного остатка (mt-ACP, mitochondrial Acyl Carrier Protein), соединяющийся с L0R8F8 (рис. 2, д). В дальнейшем установлено, что L0R8F8 является митохондриальным элонгационным фактором I (MIEF1) и участвует в регуляции трансляции митохондриальных рибосом [35]. Белок mt-ACP также обнаружен в комплексах NADH, в сборке железосерного кластера и в созревании как большой, так и малой субъединиц митохондриальных рибосом *Trypanosoma brucei* [26, 36]. Предположительная функция тройного комплекса MALSU1*L0R8F8*mt-ACP заключается в организации стерического препятствия для преждевременной ассоциации большой и малой митохондриальных субъединиц рибосом. Одного фактора MALSU1 для этого может быть недостаточно из-за отсутствия спирали h14 в рРНК малой субъединицы митохондриальной рибосомы, столкновение с которой и препятствует ассоциации в случае бактериального RsfS. Brown et al. [25] предполагают, что тройной комплекс MALSU1*L0R8F8*mt-ACP эволюционировал совместно с эволюцией митохондриальной рибосомы для обеспечения стерического препятствия со спиралями h5, h15 митохондриальной рРНК и N-концом mS26 малой субъединицы рибосомы. На финальном этапе созревания данный комплекс должен покинуть большую субъединицу рибосомы для снятия стерических ограничений.

Комплекс из трёх факторов MALSU1*L0R8F8*mt-ACP идентифицирован в структуре промежуточного состояния созревающей миторибосомы для *T. brucei* (рис. 2, е). [26]. В двух полученных интермедиатах рибосомный комплекс присутствовал только на более позднем этапе созревания, при этом характер его взаимодействия с рибосомой аналогичен описанному в работе Brown et al. [25], а именно: через контакт между MALSU1 и uL14m. Взаимное расположение элементов вторичной структуры в области контакта uL14 (uL14m) и RsfS (MALSU1) сохраняется как в бактериях, так и в митохондриях.

В работе, посвящённой исследованию системы контроля преждевременного прерывания трансляции, запускающей процесс высвобождения миторибосом *H. sapiens*, обнаружен тот же комплекс MALSU1*L0R8F8*mt-ACP [37]. На основе полученных крио-ЭМ-структур больших субъединиц миторибосом в комплексе с факторами высвобождения авторы выдвинули гипотезу о необходимости комплекса MALSU1*L0R8F8*mt-ACP как препятствия преждевременной ассоциации большой и малой субъединиц во время высвобождения тРНК и растущего полипептида. Это позволяет отнести MALSU1 в составе комплекса к таким факто-

рам, как eIF6, ABCE1 и eIF3, предотвращающим преждевременную ассоциацию рибосомных субъединиц в ходе инициации трансляции, рецлинга и биогенеза рибосомы.

Последние работы, посвящённые исследованию промежуточных состояний созревающих миторибосом *H. sapiens*, продемонстрировали наличие комплекса MALSU1*L0R8F8*mt-ACP практически во всех полученных структурах интермедиатов поздней стадии [38–41]. В одном из интермедиатных состояний созревающей большой субъединицы миторибосомы обнаружено формирование контактов между MALSU1 и mtEF-Tu, являющимся митохондриальным аналогом бактериального элонгационного фактора EF-Tu (рис. 3, в) [39]. Такой контакт, предположительно, становится возможным благодаря связыванию ГТФазы, являющейся гомологом бактериального фактора ObgE, ГТФ-связывающим белком (GTPBP5, GTP Binding Protein 5) (другое название MTG2, Mitochondrial Ribosome Associated GTPase 2). В остальных структурах связывание тройственного комплекса (mtEF-Tu*GTP*aa-тРНК) на большой субъединице миторибосомы затруднено из-за возникающих стерических препятствий между ним и комплексом MALSU1*L0R8F8*mt-ACP. Кроме контакта с mtEF-Tu, MALSU1 также взаимодействует с GTPBP5 и GTPBP7 (MTG1) – ещё одним фактором созревания, гомологом бактериального RbgA [39] (рис. 3, в). Контакт между GTPBP5 и MALSU1 присутствует и в других структурах созревающих миторибосом (рис. 3, з), однако GTPBP5, в отличие от ObgE, функционирует независимо от ортолога RsfS – MALSU1 [38, 41]. Ещё один митохондриальный функционально консервативный гомолог бактериального ObgE – GTPBP10. Он присутствовал в первом из девяти промежуточных состояний биогенеза большой субъединицы миторибосомы, практически все из которых содержали комплекс MALSU1*L0R8F8*mt-ACP [40]. Авторы не исключают, что фактор GTPBP10 может сохраняться и в более поздних интермедиатах. GTPBP10 в полученной структуре взаимодействовал с выступом L7/L12 и сарцин-рициновой петлей, что характерно для этого семейства белков как в прокариотах, так и эукариотах. Так как GTPBP10 связывается в той же области, что и GTPBP5, предполагается, что они являются взаимоисключающими, при этом GTPBP10 на определённом этапе созревания субъединицы покидает своё положение, уступая место GTPBP5 [41]. Авторы серии работ, посвящённой исследованию созревания миторибосомы *H. sapiens*, сходятся во мнении, что комплекс MALSU1*L0R8F8*mt-ACP присоединяется на

ранних этапах созревания большой субъединицы и покидает её на заключительном этапе, оказывая анти-ассоциативный эффект. ГТФазы GTPBP5 и GTPBP10, сохранив структуру, гомологичную бактериальному фактору ObgE, предположительно, имеют другую функцию в процессе сборки рибосомы, так как ассоциированы с более ранними её этапами и не регулируются ортологом RsfS.

Подводя итог обзору серии работ, посвящённых исследованию созревания большой субъединицы митохондриальной рибосомы, можно отметить схожесть анти-ассоциативного механизма рибосомных субъединиц, реализованного через факторы RsfS и MALSU1. Они имеют схожую третичную структуру, ассоциированы с аналогичными партнёрами на рибосоме (рибосомные белки uL14, bL19/mtL19, спираль H95 рРНК), взаимодействуют с фактором созревания ObgE/GTPBP5 и формируют стерические препятствия для ассоциации рибосомных субъединиц. При этом имеются и существенные отличия между RsfS и MALSU1. MALSU1 оказывает анти-ассоциативный эффект только в комплексе с L0R8F8 и mt-ACP, а RsfS – в одиночку. MALSU1 взаимодействует с гомологами бактериального фактора ObgE (GTPBP5 и GTPBP10) и фактором GTPBP7 (нет аналога в бактериях), но не регулирует их, в то время как RsfS стимулирует ГТФазную активность фактора ObgE.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя проведённый анализ, мы сталкиваемся с противоречивыми данными. С одной стороны, фактор RsfS – стресс-фактор, снижающий уровень трансляции в стационарной фазе роста культуры клеток за счёт анти-ассоциативного эффекта рибосомных субъединиц. Отсутствие фактора снижает выживаемость клеток в условиях голодания, но при этом не даёт холодочувствительный фенотип, как в случае с другими факторами созревания рибосом. С другой стороны, RsfS – фактор созревания биогенеза рибосомы, проявляющий анти-ассоциативный эффект на этапе сборки 50S-субъединицы. RsfS формирует комплексы с созревающими 50S-субъединицами рибосом, взаимодействует с фактором созревания ObgE и стимулирует его ГТФазную активность, имеет схожую структуру и область связывания с митохондриальным фактором созревания рибосомы MALSU1. Исходя из приведённых данных, можно предположить, что фактор RsfS является бифункциональным белком, который одновременно выполняет функции и стресс-фактора, и фактора биогенеза

рибосомы (к этому склоняется Nikolay et al. [24]). В этом случае возникают следующие вопросы. Почему не наблюдается фенотипического различия в штаммах с делецией $\Delta rsfS$? Действительно ли наличие фактора RsfS на этапе сборки большой субъединицы рибосомы является критичным и к каким дефектам сборки 50S это приведёт? Объективно говоря, заключение, что фактор RsfS является фактором биогенеза рибосомы, сделано по косвенным признакам, так как напрямую не показано, как наличие или отсутствие фактора влияет на процесс сборки 50S-субъединицы рибосомы. Также остаётся открытым важнейший вопрос, касающийся регуляции функций RsfS. Если фактор действительно является бифункциональным, тогда как он ассоциирует/диссоциирует с незрелыми и созревшими рибосомами, и как происходит их распознавание? Вне зависимости от того, является ли RsfS фактором биогенеза или стресс-фактором, остаётся актуальным вопрос регуляции его связывания с большой субъединицей рибосомы.

Мы считаем, что только детальное изучение этих вопросов позволит выявить причины и механизмы, включающие внутриклеточный синтез фактора RsfS и регулируемую его функциональную активность, а также поможет корректно классифицировать RsfS к той или иной группе факторов, отнесение к которым пока остаётся на уровне гипотез.

Финансирование. Работа выполнена на средства, выделенные по государственному заданию ФИЦ «Казанский научный центр РАН».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительная информация. Рисунки подготовлены с использованием программы Chimera [42].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Korostelev, A., Ermolenko, D. N., and Noller, H. F. (2008) Structural dynamics of the ribosome, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12**, 674-683, doi: 10.1016/j.cbpa.2008.08.037.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., et al. (2012) One core, two shells: Bacterial and eukaryotic ribosomes, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 560-567, doi: 10.1038/nsmb.2313.
- Wilson, D. N., and Nierhaus, K. H. (2007) The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **42**, 187-219, doi: 10.1080/10409230701360843.
- Maksimova, E. M., Korepanov, A. P., Kravchenko, O. V., Baymukhametov, T. N., Myasnikov, A. G., et al. (2021) RbfA is involved in two important stages of 30S subunit assembly: Formation of the central pseudoknot and docking of Helix 44 to the decoding center, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, doi: 10.3390/ijms22116140.
- Guo, Q., Goto, S., Chen, Y. L., Feng, B. Y., Xu, Y. J., et al. (2013) Dissecting the *in vivo* assembly of the 30S ribosomal subunit reveals the role of RimM and general features of the assembly process, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 2609-2620, doi: 10.1093/nar/gks1256.
- Klinge, S., and Woolford, J. L. (2019) Ribosome assembly coming into focus, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 116-131, doi: 10.1038/s41580-018-0078-y.
- Ronneau, S., and Hallez, R. (2019) Make and break the alarmone: Regulation of (p)ppGpp synthetase/hydrolase enzymes in bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, **43**, 389-400, doi: 10.1093/femsre/fuz009.
- Ueta, M., Wada, C., and Wada, A. (2010) Formation of 100S ribosomes in *Staphylococcus aureus* by the hibernation promoting factor homolog SaHPF, *Genes Cells*, **15**, 43-58, doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01364.x.
- Ueta, M., Wada, C., Daifuku, T., Sako, Y., Bessho, Y., et al. (2013) Conservation of two distinct types of 100S ribosome in bacteria, *Genes Cells*, **18**, 554-574, doi: 10.1111/gtc.12057.
- Ueta, M., Yoshida, H., Wada, C., Baba, T., Mori, H., et al. (2005) Ribosome binding proteins YbhH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli*, *Genes Cells*, **10**, 1103-1112, doi: 10.1111/j.1365-2443.2005.00903.x.
- Ueta, M., Ohniwa, R. L., Yoshida, H., Maki, Y., Wada, C., et al. (2008) Role of HPF (hibernation promoting factor) in translational activity in *Escherichia coli*, *J. Biochem.*, **143**, 425-433, doi: 10.1093/jb/mvm243.
- Prossliner, T., Winther, K. S., Sorensen, M. A., and Gerdes, K. (2018) Ribosome hibernation, *Annu. Rev. Genet.*, **52**, 321-348, doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035130.
- Han, C. D., Coe, E. H., and Martienssen, R. A. (1992) Molecular-cloning and characterization of iojap (Ij), a pattern striping gene of maize, *EMBO J.*, **11**, 4037-4046, doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05497.x.
- Galperin, M. Y., and Koonin, E. V. (2004) "Conserved hypothetical" proteins: Prioritization of targets for experimental study, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5452-5463, doi: 10.1093/nar/gkh885.
- Li, X., Sun, Q., Jiang, C., Yang, K., Hung, L. W., et al. (2015) Structure of ribosomal silencing factor bound to *Mycobacterium tuberculosis* ribosome, *Structure*, **23**, 1858-1865, doi: 10.1016/j.str.2015.07.014.
- Basu, A., Shields, K. E., Eickhoff, C. S., Hoft, D. F., and Yap, M. N. (2018) Thermal and Nutritional regulation of ribosome hibernation in *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.*, **200**, doi: 10.1128/JB.00426-18.

17. Hauser, R., Pech, M., Kijek, J., Yamamoto, H., Titz, B., et al. (2012) RsfA (YbeB) proteins are conserved ribosomal silencing factors, *PLoS Genet.*, **8**, e1002815, doi: 10.1371/journal.pgen.1002815.
18. Rorbach, J., Gammage, P. A., and Minczuk, M. (2012) C7orf30 is necessary for biogenesis of the large subunit of the mitochondrial ribosome, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 4097-4109, doi: 10.1093/nar/gkr1282.
19. Khusainov, I., Fatkhullin, B., Pellegrino, S., Bikmullin, A., Liu, W. T., et al. (2020) Mechanism of ribosome shutdown by RsfS in *Staphylococcus aureus* revealed by integrative structural biology approach, *Nat. Commun.*, **11**, 1656, doi: 10.1038/s41467-020-15517-0.
20. Bernhardt, T. G., and de Boer, P. A. (2004) Screening for synthetic lethal mutants in *Escherichia coli* and identification of EnvC (YibP) as a periplasmic septal ring factor with murein hydrolase activity, *Mol. Microbiol.*, **52**, 1255-1269, doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04063.x.
21. Jiang, M., Sullivan, S. M., Walker, A. K., Strahler, J. R., Andrews, P. C., et al. (2007) Identification of novel *Escherichia coli* ribosome-associated proteins using isobaric tags and multidimensional protein identification techniques, *J. Bacteriol.*, **189**, 3434-3444, doi: 10.1128/JB.00090-07.
22. Titz, B., Rajagopala, S. V., Goll, J., Hauser, R., McKeivitt, M. T., et al. (2008) The binary protein interactome of *Treponema pallidum* – the syphilis spirochete, *PLoS One*, **3**, e2292, doi: 10.1371/journal.pone.0002292.
23. Butland, G., Peregrin-Alvarez, J. M., Li, J., Yang, W., Yang, X., et al. (2005) Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*, *Nature*, **433**, 531-537, doi: 10.1038/nature03239.
24. Nikolay, R., Hilal, T., Schmidt, S., Qin, B., Schwefel, D., et al. (2021) Snapshots of native pre-50S ribosomes reveal a biogenesis factor network and evolutionary specialization, *Mol. Cell*, **81**, 1200-1215.e1209, doi: 10.1016/j.molcel.2021.02.006.
25. Brown, A., Rathore, S., Kimanius, D., Aibara, S., Bai, X. C., et al. (2017) Structures of the human mitochondrial ribosome in native states of assembly, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 866-869, doi: 10.1038/nsmb.3464.
26. Jaskolowski, M., Ramrath, D. J. F., Bieri, P., Niemann, M., Mattei, S., et al. (2020) Structural insights into the mechanism of mitoribosomal large subunit biogenesis, *Mol. Cell*, **79**, 629-644.e4, doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.030.
27. Basu, A., and Yap, M. N. (2017) Disassembly of the *Staphylococcus aureus* hibernating 100S ribosome by an evolutionarily conserved GTPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E8165-E8173, doi: 10.1073/pnas.1709588114.
28. Gutgsell, N. S., Deutscher, M. P., and Ofengand, J. (2005) The pseudouridine synthase RluD is required for normal ribosome assembly and function in *Escherichia coli*, *RNA*, **11**, 1141-1152, doi: 10.1261/rna.2550105.
29. Charollais, J., Dreyfus, M., and Iost, I. (2004) CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2751-2759, doi: 10.1093/nar/gkh603.
30. Phadtare, S., and Inouye, M. (2008) The cold shock response, *EcoSal Plus*, **3**, doi: 10.1128/ecosalplus.5.4.2.
31. Wanschers, B. F., Szklarczyk, R., Pajak, A., van den Brand, M. A., Gloerich, J., et al. (2012) C7orf30 specifically associates with the large subunit of the mitochondrial ribosome and is involved in translation, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 4040-4051, doi: 10.1093/nar/gkr1271.
32. Fung, S., Nishimura, T., Sasarman, F., and Shoubridge, E. A. (2013) The conserved interaction of C7orf30 with MRPL14 promotes biogenesis of the mitochondrial large ribosomal subunit and mitochondrial translation, *Mol. Biol. Cell*, **24**, 184-193, doi: 10.1091/mbc.E12-09-0651.
33. Gartmann, M., Blau, M., Armache, J. P., Mielke, T., Topf, M., et al. (2010) Mechanism of eIF6-mediated inhibition of ribosomal subunit joining, *J. Biol. Chem.*, **285**, 14848-14851, doi: 10.1074/jbc.C109.096057.
34. Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S., and Ban, N. (2011) Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6, *Science*, **334**, 941-948, doi: 10.1126/science.1211204.
35. Rathore, A., Chu, Q., Tan, D., Martinez, T. F., Donaldson, C. J., et al. (2018) MIEF1 microprotein regulates mitochondrial translation, *Biochemistry*, **57**, 5564-5575, doi: 10.1021/acs.biochem.8b00726.
36. Saurer, M., Ramrath, D. J. F., Niemann, M., Calderaro, S., Prange, C., et al. (2019) Mitoribosomal small subunit biogenesis in trypanosomes involves an extensive assembly machinery, *Science*, **365**, 1144-1149, doi: 10.1126/science.aaw5570.
37. Desai, N., Yang, H. T., Chandrasekaran, V., Kazi, R., Minczuk, M., et al. (2020) Elongational stalling activates mitoribosome-associated quality control, *Science*, **370**, 1105-1110, doi: 10.1126/science.abc7782.
38. Lenarcic, T., Jaskolowski, M., Leibundgut, M., Scaiola, A., Schonhut, T., et al. (2021) Stepwise maturation of the peptidyl transferase region of human mitoribosomes, *Nat. Commun.*, **12**, 3671, doi: 10.1038/s41467-021-23811-8.
39. Cipullo, M., Gese, G. V., Khawaja, A., Hallberg, B. M., and Rorbach, J. (2021) Structural basis for late maturation steps of the human mitoribosomal large subunit, *Nat. Commun.*, **12**, 3673, doi: 10.1038/s41467-021-23617-8.
40. Cheng, J., Berninghausen, O., and Beckmann, R. (2021) A distinct assembly pathway of the human 39S late pre-mitoribosome, *Nat. Commun.*, **12**, 4544, doi: 10.1038/s41467-021-24818-x.
41. Hillen, H. S., Lavdovskaia, E., Nadler, F., Hanitsch, E., Linden, A., et al. (2021) Structural basis of GTPase-mediated mitochondrial ribosome biogenesis and recycling, *Nat. Commun.*, **12**, 3672, doi: 10.1038/s41467-021-23702-y.
42. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., et al. (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605-1612, doi: 10.1002/jcc.20084.

IS RsfS A FACTOR OF HIBERNATION OR A FACTOR OF RIBOSOME BIOGENESIS?

Review

B. F. Fatkhullin^{1,2*}, A. G. Gabdulkhakov¹, and M. M. Yusupov^{2,3}

¹ *Institute of Protein Research, Russian Academy of Science, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: morgenstern100@mail.ru*

² *Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology, 67400 Illkirch, France*

³ *Laboratory of Structural Analyze of Biomacromolecules, Federal Research Center "Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences", 420111 Kazan, Russia*

The appearance of bacterial, archaeal, and eukaryotic ribosome structures, obtained by crystallography and cryogenic electron microscopy, served as an impetus for the study of intracellular regulatory proteins that affect various stages of translation. Among them are ribosome hibernation factors, which have been actively studied in the last decade. They are involved in the regulation of protein biosynthesis under stressful conditions. The main tasks of hibernation factors are to reduce the energy consumption for protein biosynthesis and to preserve existing functional ribosomes from degradation, thereby increasing cell survival in unfavorable conditions. Although the wide interest to this topic, only a few works have been published to the study of the RsfS factor (Ribosome silencing factor S). According to their results, the RsfS factor is usually referred to the group of hibernation factors. However, a recent work in the field of structural studies of the 50S ribosomal subunit maturation demonstrates that RsfS has features inherent to biogenesis factors, for example, association with an immature ribosomal subunit, like its mitochondrial orthologue MALSU1. In this review, we summarized available information about the RsfS factor, its functions and structural features, and also carried out a comparative analysis of the factor with the mitochondrial ortholog MALSU1 in order to try to answer the emerging question: "Is RsfS a hibernation factor or a ribosome biogenesis factor?" This review may serve as an impetus for the study of molecular mechanisms in which the RsfS factor is involved, which, to date, remain completely unknown.

Keywords: ribosome, ribosome biogenesis factor, hibernation factor, RsfS

УДК 577.21

РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА, ИСПОЛЬЗУЕМОГО ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МУТАЦИЙ ПРИ ГЕНОМНОМ РЕДАКТИРОВАНИИ

© 2022 О.В. Володина¹, А.А. Анучина¹, М.И. Зайнитдинова¹,
Н.А. Евтушенко², А.В. Лавров¹, С.А. Смирнихина^{1*}

¹ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова,
115522 Москва, Россия; электронная почта: smirnikhinas@gmail.com

² Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Российского
национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.12.2021

После доработки 19.04.2022

Принята к публикации 19.04.2022

Геномное редактирование позволяет целенаправленно вносить разнообразные изменения в геном, что потенциально может быть использовано для лечения наследственных заболеваний человека. Несмотря на многочисленные исследования в этой области, эффективность методов коррекции мутаций все еще остается невысокой, что не позволяет использовать данные методы в рутинной практике. Показано, что рациональный дизайн компонентов геномного редактирования может существенно повысить эффективность исправления мутаций. В данной работе мы предлагаем дизайн одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотидов (оцОДН) для более эффективного редактирования генов. С использованием модельной системы с восстановлением нокаутированного *EGFP*, интегрированного в геном клеточной культуры НЕК293Т, показано, что лишь небольшая часть оцОДН (около 20 нуклеотидов – с 14-го нуклеотида с 5'-конца от двухцепочечного разрыва до 4-го нуклеотида в сторону 3'-конца), используемой в качестве донорной молекулы для репарации двухцепочечного разрыва ДНК, интегрирует в место разрыва. На основе полученных данных можно рационально подходить к дизайну оцОДН для исправления мутаций с помощью метода CRISPR-Cas9 для разработки генной терапии наследственных болезней человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: CRISPR-Cas9, репарация с помощью однострессовой матрицы, одноцепочечные олигодезоксирибонуклеотиды, *EGFP*, проточная цитофлуориметрия.

DOI: 10.31857/S0320972522050037, **EDN:** ASTYLE

ВВЕДЕНИЕ

Одним из инструментов генной терапии является геномное редактирование, которое позволяет целенаправленно вносить изменения в геном: корректировать мутации, нокаутировать аллели, влиять на экспрессию генов, что потенциально может быть использовано для лечения

наследственных заболеваний человека [1]. Эффективность коррекции мутаций при моногенных заболеваниях, несмотря на все прилагаемые усилия, зачастую невысокая, что препятствует быстрому внедрению новых методов лечения на основе геномного редактирования в клиническую практику [2, 3]. Рациональный дизайн компонентов геномного редактирования позволяет существенно повысить эффективность коррекции мутаций [4]. В данной работе мы предлагаем рациональный дизайн коротких одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотидов для более эффективного редактирования генов.

При лечении наследственных заболеваний с помощью геномного редактирования можно корректировать мутации, то есть вносить целенаправленные изменения в последовательность ДНК. При этом в молекуле ДНК сначала создается двухцепочечный разрыв (ДЦР) с помощью современных программируемых нуклеаз [5] –

Принятые сокращения: ДЦР – двухцепочечный разрыв; НГСК – негомологичное соединение концов; НГР – направленная гомологичная репарация; оцОДН – одноцепочечный олигодезоксирибонуклеотид; РОНМ – репарация с помощью однострессовой матрицы; sgРНК – спейсер гидовой РНК, Cas – CRISPR-ассоциированный белок; CRISPR – система, основанная на коротких палиндромных повторах, регулярно расположенных группами; РАМ – последовательность прилежащего к протоспейсеру мотива (protospacer adjacent motif); TALENs – эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции; ZNFs – нуклеазы цинковых пальцев.

* Адресат для корреспонденции.

нуклеаз цинковых пальцев (ZNFs) [6], эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALENs) [7], или системы, основанной на коротких палиндромных повторах, регулярно расположенных группами (CRISPR) и CRISPR-ассоциированных белках (Cas) [8] – а затем клетка с помощью собственных механизмов репарации исправляет ДЦР.

Есть несколько путей репарации ДНК в клетке после искусственного введения ДЦР. Их можно разделить на RAD51-зависимые и RAD51-независимые. К RAD51-зависимым путям репарации относятся генные конверсии – механизмы, основанные на рекомбинации с донорной молекулой. Они имеют низкую эффективность и зависят от фазы клеточного цикла, однако обладают высокой точностью. Использование донорной молекулы позволяет в конечном итоге изменить последовательность по желанию исследователя. Генные конверсии с использованием двухцепочечной матрицы проходят по каноническому пути, при котором RAD51 образует филаменты на 3'-концах нитей ДНК-мишени, чтобы обеспечить инвазию донорного дуплекса. При этом также необходимо наличие факторов, которые обеспечивают взаимодействие RAD51 с ДНК, включая BRCA2, PALB2 и DSS1. Эффективность генных конверсий с использованием двухцепочечной матрицы снижается при истощении или инактивации этих факторов [9].

К RAD51-независимым путям относятся негомологичное соединение концов (НГСК, NHEJ), отжиг одиночной цепи (SSA), репарация с помощью однонитевой матрицы (РОНМ, SSTR) и некоторые виды индуцируемой разрывом репликации (ВIR), механизм которых еще изучается. НГСК сопряжено с резекцией и лигированием концов ДНК. Этот механизм репарации приводит к возникновению множества коротких инсерций и делеций, что ведет к сдвигу рамки считывания, в связи с этим этот путь репарации используют для нокаутирования генов. НГСК не зависит от наличия донорной молекулы и фазы клеточного цикла, поэтому является доминирующим в эукариотической клетке [10]. При SSA разрыв фланкируется гомологичными последовательностями ДНК, что приводит к делеции промежуточной последовательности.

Еще один независимый от RAD51 путь репарации – РОНМ; он активируется при наличии одноцепочечной донорной молекулы ДНК, в том числе в процессе редактирования генома с использованием одноцепочечных олигонуклеотидов (оцОДН, ssODN). В ходе РОНМ сразу после внедрения двухцепочечного

разрыва укорачиваются 5'-концы, а одноцепочечные 3'-концы участвуют в отжиге с экзогенным донором [11]. MRX связывается с молекулой ДНК и инициирует укорочение концов, белок RAD52 позволяет экзогенному донору отжигаться с доступными концами геномной ДНК. RAD59 и Srs2 предотвращают взаимодействие концов ДНК с RAD51 и останавливают отжиг, инициированный RAD52. Копирование последовательности одноцепочечного донора осуществляется предположительно ДНК-полимеразой δ , затем происходит отжиг на противоположной стороне ДЦР. Несовпадения на 5'-конце создают облигатный гетеродуплекс, который затем исправляется системой репарации неспаренных оснований. Бреши, оставшиеся после РОНМ, заполняются полимеразой ζ [12].

Для оптимизации метода коррекции мутаций и повышения эффективности этого процесса необходимо понимание фундаментальных основ репарации, которые в перспективе приведут к использованию наилучшей по своему строению донорной молекулы. На данный момент при геномном редактировании используют оцОДН, длинные одноцепочечные ДНК (lssDNA) [13, 14] и двухцепочечные донорные молекулы – плазмиды и продукты амплификации [15, 16].

ОцОДН – небольшие одноцепочечные молекулы длиной до 200 нуклеотидов (нт), которые состоят из последовательности для вставки и двух плеч гомологии. Длина плеча гомологии может варьировать от 30 до 60 нт [17]. ОцОДН в основном используются для исправления точечных мутаций [18]. Репарация двухцепочечного разрыва с использованием матриц оцОДН может проходить по пути РОНМ. В этом случае репарация не зависит от RAD51, но зависит от RAD52, RAD59, Srs2 и комплекса Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) [19].

Проведенные ранее исследования [19, 20] показывают, что используемый для репарации двухцепочечных разрывов ДНК оцОДН не полностью встраивается в место разрыва. Концевые нуклеотиды оцОДН участвуют только в создании гомологии с ДНК, тогда как центральная часть – встраивается. Точные длины фрагментов оцОДН, участвующих в создании гомологии и встраивании, были неизвестны. В результате данного исследования было точно определено, какая часть оцОДН участвует в создании гомологии с целевой последовательностью ДНК, а какая – встраивается. Полученные результаты позволят более эффективно подбирать оцОДН для дальнейшего развития подходов к лечению наследственных моногенных заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмидные конструкции и олигонуклеотиды.

В работе были использованы следующие плазмиды: pLVT_turboRFP635-eGFPmut, pCMV-dR8.91, pMD2.G и Cas9(1.1)-sgGFP#2. Плазмида pLVT_turboRFP635-eGFPmut была получена путем амплификации гена *EGFP* с мутацией с.337delG, приводящей к сдвигу рамки считывания с образованием стоп-кодона, с плазмиды pEGFP-mut и клонирования в плазмиду pLVT_turboRFP635. Последовательность гена *EGFP* доступна по ссылке: https://www.addgene.org/browse/sequence_vdb/2487/. Мутация с.337delG обозначает делецию нуклеотида G в 337-м положении от начала открытой рамки считывания. Плазмида pLVT_turboRFP635 была получена на основе плазмиды pRRL.SIN.EF1.WPRE (в лаборатории Didier Trono), в которую были внесены изменения в последовательность полилинкера с введением сайтов для эндонуклеаз рестрикции AgeI и SalI [21]. Карта плазмиды доступна в статье Серебровской с соавт. [21]. В дальнейшем в плазмиду были клонированы фрагменты TurboRFP-T2A (по сайтам рестрикции BamHI и NheI) и EGFPmut (по сайтам рестрикции NheI и SalI). Таким образом, была получена плазмида pLVT_turboRFP635-eGFPmut, верификацию которой проводили секвенированием по Сэнгеру. Упаковочные плазмиды pCMV-dR8.91 и pMD2.G были любезно предоставлены Didier Trono (<https://www.epfl.ch/labs/tronolab/>). Карты плазмид доступны по ссылкам: <https://www.addgene.org/vector-database/2221/> (pCMV-dR8.91) и <https://www.addgene.org/12259/> (pMD2.G).

Подбор спейсера гидовой РНК (сгРНК) проводили с помощью программного обеспечения с открытым доступом Benchling (<https://www.benchling.com/>) на ген *EGFP* с мутацией с.337delG. Последовательность сгРНК (TGTCGCCCTC-GAACTTCACT) была синтезирована в виде двух частично комплементарных олигонуклеотидов с липкими концами для клонирования в плазмиду: sgGFP_2.f (5'-caccTGTCGCCCTCGAACTTCACT-3') и sgGFP_2.r (5'-aacAGTGAAGTTCGAGGGCGACA-3'). Спейсер гидовой РНК клонировали в исходную плазмиду eSpCas9(1.1) (любезно предоставлена Feng Zhang; Addgene plasmid #71814; <http://n2t.net/addgene:71814>; RRID:Addgene_71814), которая содержит мутантную форму SpCas9, по сайтам рестрикции для BbsI. Верификацию полученной плазмиды Cas9(1.1)-sgGFP#2 проводили путем секвенирования по Сэнгеру и рестрикционным анализом.

С помощью той же программы Benchling были подобраны четыре варианта оцОДН для вос-

становления правильной последовательности *EGFP*, содержащих синонимичные замены в разных положениях. Спейсер гидовой РНК был подобран таким образом, что имел гомологию (отжигался) со смысловой цепью ДНК, оцОДН – с антисмысловой.

Клеточная культура. Клеточная культура НЕК293Т-GFPmut была получена в Центре высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова путем лентивирусной трансдукции. Для получения лентивирусных частиц использовалась стандартная методика липофекции упаковочной линии клеток НЕК293Т. Клетки накануне высаживали в количестве, достигающем 70% монослоя (60 мм чашка). Для котрансфекции использовали смесь из трех плазмид pCMV-dR8.91 (2 мкг), pMD2.G (0,6 мкг) и pLVT_turboRFP635-eGFPmut (2 мкг), инкубировали в среде Opti-MEM («Thermo Fisher Scientific», США) с Lipofectamine 2000 («Thermo Fisher Scientific»). Через 6 ч после трансфекции указанных выше плазмид проводили замену среды на DMEM и накапливали вирусные частицы в течение 48 ч. Росточная среда с вирусными частицами была пропущена через 0,45 мкм фильтр и использована для заражения клеток НЕК293Т. Для определения титра вируса следовали протоколу «Евроген» (Россия, https://evrogen.ru/kit-user-manuals/Lenti_LP002.pdf). Использовали 10 мкл вирусных частиц с титром $0,5 \times 10^5$ трансдуцирующих единиц/мл на 10^4 клеток. После заражения клетки подращивали в среде DMEM до состояния конfluence и сортировали их по наличию флуоресценции turboRFP635. С целью коррекции мутации с.337delG в гене *EGFP* проводили котрансфекцию 7,4 мкг плазмиды Cas9(1.1)-sgGFP#2 и 100 пмоль оцОДН на 200 тысяч клеток НЕК293Т-GFPmut с помощью Lipofectamine 2000 по протоколу производителя.

Сортировка клеток. Для получения клеточной культуры НЕК293Т-GFPmut после лентивирусной трансдукции при достижении клетками состояния конfluence проводили сортировку клеток по наличию флуоресценции turboRFP635 с помощью клеточного сортера S3 Cell Sorter («BioRad», США) с фильтром эмиссии 615 ± 25 нм. Через 72 ч после трансфекции Cas9(1.1)-sgGFP#2 и оцОДН клетки культуры НЕК293Т-GFPmut снимали с планшета. Количество GFP-положительных клеток (с успешным редактированием) оценивали с помощью того же клеточного сортера во время сортировки GFP-положительных клеток (длина волны 488 нм, фильтр эмиссии 525 ± 30 нм) для обога-

Таблица 1. Протокол амплификации

| | | |
|--------------------------|-------|-----------|
| Первичная денатурация | 95 °С | 5 минут |
| Амплификация (37 циклов) | 95 °С | 30 секунд |
| | 61 °С | 30 секунд |
| | 72 °С | 50 секунд |
| Финальная элонгация | 72 °С | 5 минут |

щения популяции клеток с успешным восстановлением правильной последовательности *EGFP*. Оценку проводили в двух технических повторностях.

Оценка эффективности редактирования. ДНК для амплификации и секвенирования фрагмента *EGFP* выделяли с помощью набора Quick-gDNA Miniprep Kit («Zymo Research», США). Амплификацию проводили по протоколу, представленному в табл. 1. Последовательность праймеров: eGFP65_F – 5'-ACGTAAACGGC-CACAAGTTCA-3', eGFP527_R – 5'-CTGC-CGTCCTCGATGTTGT-3'.

После амплификации интересующего фрагмента *EGFP* образцы были секвенированы с обоими праймерами на приборе ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США) по протоколу производителя. Анализ хроматограмм проводили с помощью приложения Chromas и интернет-ресурса Benchling для определения нуклеотидов, встроившихся во время репарации ДНК. Процентное соотношение аллелей, восстановленных методом НГСК и РОИМ, оценивали с помощью программы TIDER (<http://shinyapps.datacurators.nl/tider/>). Оценку проводили в трех или четырех технических повторностях. Наличие аллелей дополни-

тельно было валидировано с помощью программы DECODR (<https://decodr.org>).

Статистическая обработка. Для статистической обработки данных использовали критерий Манна–Уитни. Статистическую обработку проводили в программе STATISTICA, версия 10.0 («StatSoft», США). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффективность восстановления EGFP в линии клеток. На подготовительном этапе работы была разработана модельная система для изучения параметров гомологичной репарации ДНК по матрице оцОДН. С помощью лентивирусной трансдукции была создана клеточная линия HEK293T-GFPmut с интегрированным геном *EGFPmut*. Ген зеленого флуоресцентного белка, *EGFPmut*, характеризуется однонуклеотидной делецией с.337delG, приводящей к сдвигу рамки считывания с появлением преждевременного стоп-кодона (рис. 1). При редактировании с помощью CRISPR-Cas9 и оцОДН происходит вставка нуклеотида G в положение с.337 и в клетках появляется флуоресценция eGFP.

Для оценки границ фрагментов оцОДН, участвующих в создании плеч гомологии и непосредственно репарации, были подобраны и синтезированы оцОДН с синонимичными точковыми заменами через разные промежутки (с заменами каждые 9 и 15 нт, а также с заменами на концах) и без замен (табл. 2). Все оцОДН содержали нуклеотид G, позволяющий восстанавливать корректную последовательность гена *EGFP*.

Таблица 2. Последовательности оцОДН, используемые в работе

| Название | Последовательность, 5' → 3' |
|------------------|--|
| ssODN_sgGFP_9nt | TTCTTCAAAGACGACGGTAACACTACAAAACCCGCGCTGAG <u>G</u> TGAAGTTCGAGGGTGACACCCTCGTGAACCGTATCGAGCTCAAGGGCATCGACTTCAAAGAGGACGGTAACATCCTGGGG |
| ssODN_sgGFP_15nt | TTCTTCAAAGGACGATGGCAACTACAAGACGCGCGCCGAG <u>G</u> TGAAATTCGAGGGCGACACCGCTGGTGAACCGCATAGAGCTGAAGGGCATAGACTTCAAAGGAGGATGGCAACATCCTGGGG |
| ssODN_sgGFP_es | TTCTTTAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAG <u>G</u> TGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG |
| ssODN_sgGFP_wt | TTCTTCAAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAG <u>G</u> TGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG |

Примечание. Нижним подчеркиванием полужирным выделен нуклеотид, восстанавливающий правильную последовательность гена *EGFP*. Полужирным черным отмечены синонимичные замены в последовательности оцОДН (ssODN).

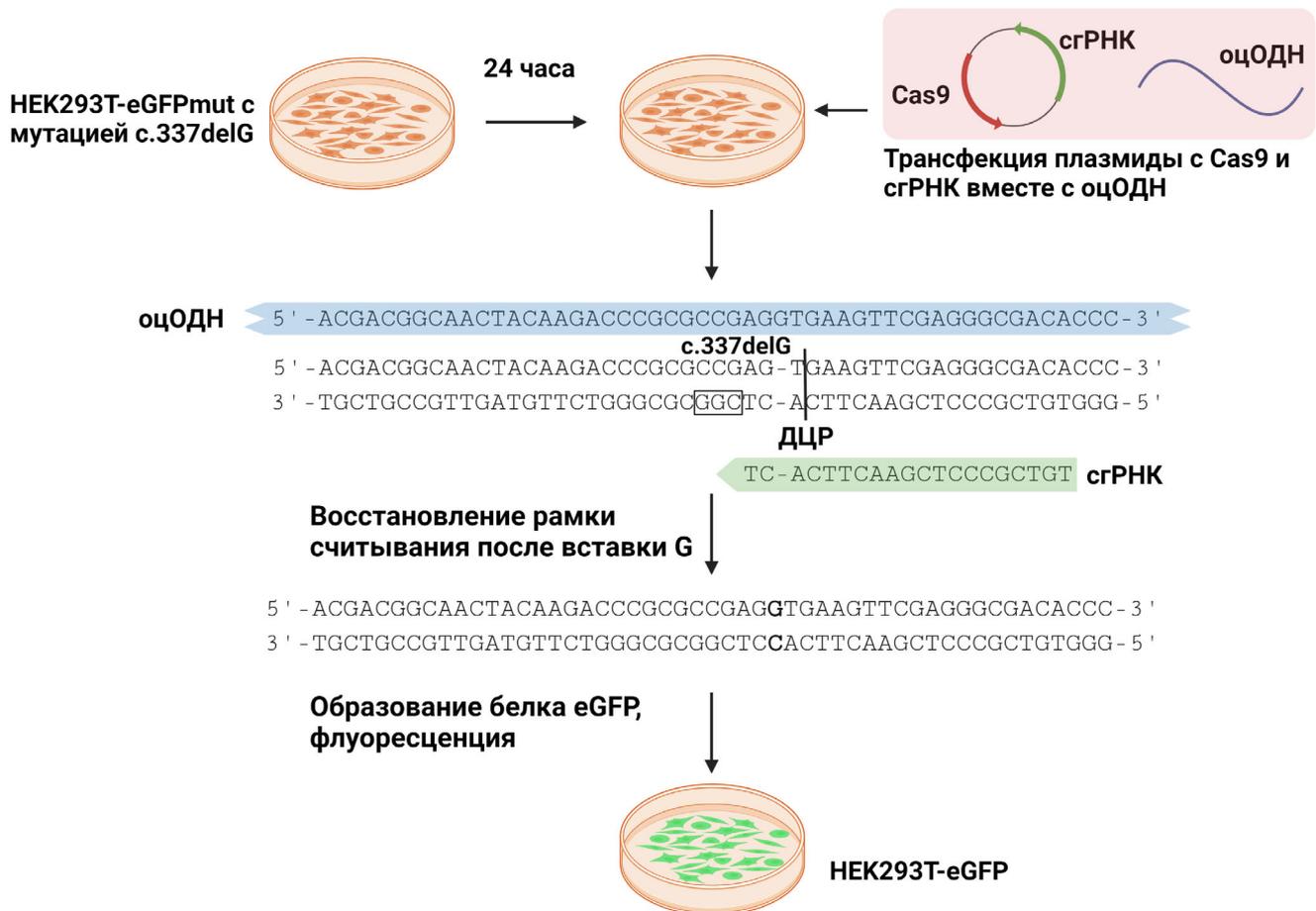


Рис. 1. Схема исправления мутации в гене *EGFP*. Мутация с.337delG приводит к сдвигу рамки считывания; после успешного редактирования наблюдается вставка нуклеотида G и восстановление рамки считывания, что приводит к синтезу нормального белка eGFP и появлению зеленой флуоресценции. Оценить результат редактирования можно с помощью проточной цитофлуориметрии и на хроматограммах. СgРНК – спейсер гидовой РНК, оцОДН – одноцепочечный олигодезоксирибонуклеотид, ДЦР – двухцепочечный разрыв

Далее клетки трансфицировали плазмидой Cas9(1.1)-sgGFP#2 с одним из подобранных оцОДН. Восстановление нормальной последовательности *EGFP* было зарегистрировано при использовании всех четырех оцОДН. Эффективность восстановления *EGFP* оценивали путем проточной цитофлуориметрии (оценивали долю GFP-положительных клеток). ОцОДН с синонимичными заменами каждые 9 или 15 нт обладают меньшей гомологией, поэтому ожидаемо продемонстрировали меньшую эффективность, чем оцОДН с двумя заменами на концах или вовсе без замен: 1,8–2,1% против ~6,7% (рис. 2, а).

GFP-положительные клетки были сортированы для обогащения клеточной популяции с успешно отредактированной мутацией. Эффективность редактирования целевого локуса оценили с помощью секвенирования по Сэнгеру с последующей обработкой хроматограмм по ал-

горитму TIDER. Частота инделов (коротких вставок и делеций нуклеотидов) в целевом локусе колебалась от 10,5% до 14,6% и составила в среднем 11,6%. Этот показатель отражает точность редактирования целевого локуса в общем и обычно обусловлен случайными потерями или вставками нуклеотидов в области ДЦР. Частота вставки нуклеотида G в положение с.337 (восстановление правильной последовательности гена *EGFP*) в GFP-положительных клетках варьировала от 55,6% до 65,7% в зависимости от использованного оцОДН (рис. 2, б). Таким образом, несмотря на различия в эффективности репарации разными оцОДН, были получены отредактированные клетки с восстановленным eGFP с применением всех четырех типов оцОДН, что позволило перейти к основному этапу оценки границ оцОДН, участвующих в формировании плеч гомологии, и участка, используемого в качестве матрицы для репарации.

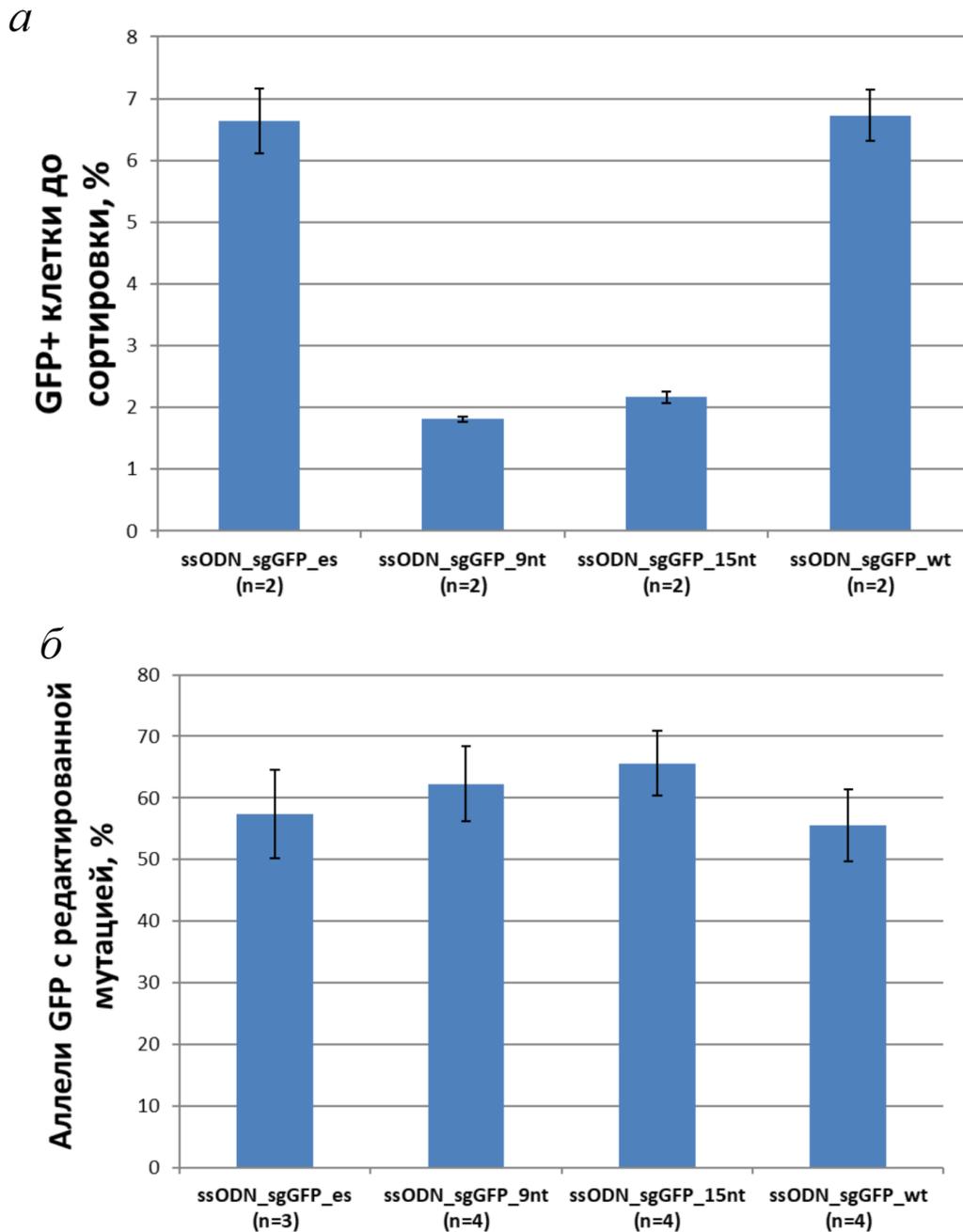


Рис. 2. Коррекция мутации с.337delG в гене *EGFP*. *a* – Процент GFP-положительных клеток в образцах, отредактированных с добавлением различных матриц оцОДН. *b* – Доля отредактированных (восстановленных) различными оцОДН аллелей в GFP-положительных клетках. ssODN_sgGFP_es – образцы с концевыми заменами, ssODN_sgGFP_9nt – образцы с заменами каждые 9 нт, ssODN_sgGFP_15nt – образцы с заменами каждые 15 нт, ssODN_sgGFP_wt – образцы без замен. Планки погрешностей по оси Y указывают 95%-ный доверительный интервал. Число n отражает количество технических повторностей

Длины фрагментов оцОДН, участвующих в создании плеч гомологии и встраивании. Целью работы была оценка границ частей оцОДН, участвующих в формировании плеч гомологии и используемых как матрица для репарации в экспериментах CRISPR-Cas9. Для анализа границ

донорной последовательности, участвующей во вставке, анализировали только клетки, прошедшие сортировку по зеленой флуоресценции. В образцах с добавлением оцОДН с заменами на концах соответствующие замены в геноме определены не были, и хроматограммы не отлича-

лись от контрольных образцов, отредактированных оцОДН_sgGFP_wt без замен (данные не представлены).

При редактировании с помощью оцОДН с заменами каждые 9 нт обнаружены замены нуклеотидов в 5-м и 14-м положениях от ДЦР в сторону 5'-конца оцОДН-матрицы (рис. 3, а). Подчеркнём, что оцОДН были подобраны комплементарными к сгРНК; здесь и далее направления указаны относительно матрицы оцОДН, если не указано иначе. После редактирования клеток с использованием оцОДН с заменами каждые 15 нт замена нуклеотидов произошла в 4-м положении в сторону 3'-конца (рис. 3, б). При этом на хроматограммах наблюдали наложение

пиков нуклеотидов, начиная со встроенного нуклеотида G, что свидетельствует о том, что в образце присутствовало минимум два вида аллелей – редактированный (содержащий дополнительный G) и исходный (с мутацией). Полные хроматограммы, фрагменты которых изображены на рис. 3, представлены в Приложении (рис. S1 и S2). Также в Приложении приведены таблицы с частотами аллелей *EGFP* после редактирования разными оцОДН (рис. S3).

Таким образом, результаты проведенной работы свидетельствуют о том, что со стороны 5'-конца от ДЦР были заменены –14 и –5 нуклеотиды, а со стороны 3'-конца от ДЦР – нуклеотид в позиции +4 (рис. 4).

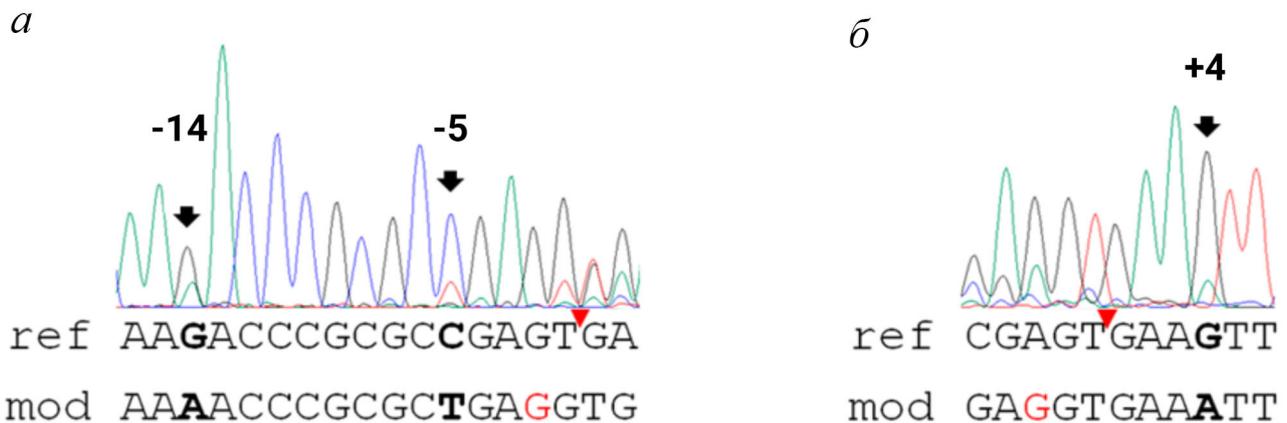


Рис. 3. Замены нуклеотидов в редактированном фрагменте *EGFP*. *а* – Хроматограмма образца после редактирования с помощью ssODN_sgGFP_9nt. Стрелками указаны замены нуклеотидов G на A и C на T. Красной стрелкой указано место введения ДЦР. *б* – Хроматограмма образца после редактирования с помощью ssODN_sgGFP_15nt. Стрелкой указана замена нуклеотида G на A. Красной стрелкой указано место введения ДЦР. Красным выделена вставка нуклеотида G в позиции с.337. Наложение последовательностей, прочитанных с прямого праймера вправо от вставки G (панель *а*), и последовательностей, прочитанных с обратного праймера влево от вставки G (панель *б*), обусловлено тем, что не все аллели *EGFP* в клеточной культуре подвергаются редактированию, что, однако, не затрудняет чтение синонимичных замен до вставки с соответствующего праймера. Ref – исходная последовательность, mod – измененная в результате геномного редактирования последовательность

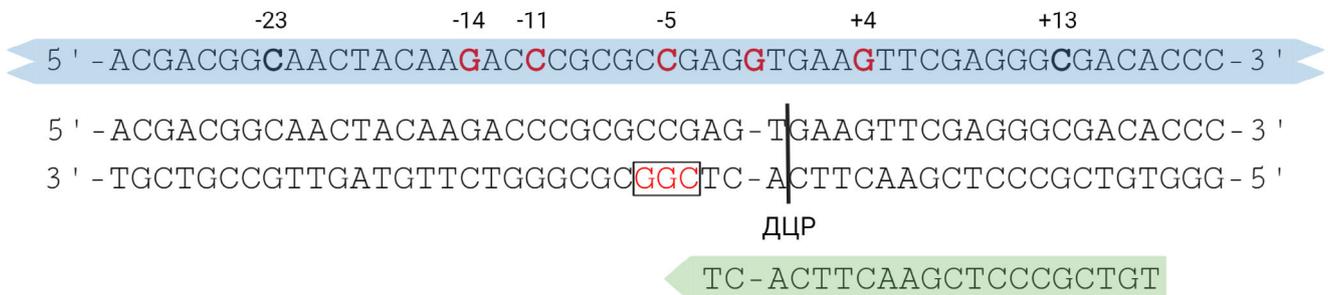


Рис. 4. Расположение заменяемых нуклеотидов при редактировании мутации с.337delG в гене *EGFP* с помощью оцОДН. Голубым указан фрагмент оцОДН, зеленым – последовательность сгРНК, рамкой выделен прилежащий к протоспейсеру мотив (РАМ). Красным полужирным в последовательности оцОДН выделены нуклеотиды, встроенные в последовательность ДНК, полужирным черным – не встроенные. Цифрами указаны анализируемые нуклеотиды от ДЦР

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ОцОДН широко используют в качестве матриц для репарации при CRISPR-Cas9-опосредованном редактировании. Однако до сих пор нет единого мнения насчёт оптимальной длины олигонуклеотидов, их расположения относительно места разрыва и величины плеч гомологии и, соответственно, размеров внутренней части, служащей непосредственно матрицей для восстановления. В данном исследовании мы применили оцОДН длиной 120 нт с асимметричным расположением вокруг места разреза ДНК – 5'-конец длиной в 41 нт и 3'-конец – 79 нт. Для определения размеров и границ области, являющейся матрицей для гомологичной репарации, были использованы оцОДН с синонимичными заменами каждые 9 и каждые 15 нт. Такие оцОДН позволили определить, что для репарации используется небольшой фрагмент длиной около 20 нт (от положения –15 с 5'-конца от ДЦР до положения +4 в сторону 3'-конца от ДЦР). Таким образом, с помощью оцОДН можно скорректировать последовательность в 20 нт, асимметрично расположенных вокруг точки разрыва ДНК. Данное утверждение справедливо для оцОДН, подобранных комплементарными с гРНК, т.е. являющимися идентичными той цепи ДНК, на которую отжигается сРНК (рис. 4), что важно учитывать при дизайне соответствующих экспериментов.

Попытки изучить детально, какая часть оцОДН интегрируется в место двухцепочечного разрыва предпринимались ранее [19, 20]. В работе Gallagher et al. [17] анализировали только область из восьми нуклеотидов вокруг разрыва (по четыре с каждой стороны), а в работе Harmsen et al. [19] изучали влияние факторов репарации неспаренных оснований на эффективность редактирования с помощью оцОДН. Таким образом, насколько нам известно, наша работа является единственной направленной именно на определение длин фрагментов оцОДН, интегрируемых в локусы ДЦР.

В целом, полученные нами данные о длинах фрагментов оцОДН, участвующих в создании гомологии и встраивании, хорошо коррелируют с процитированными выше работами [19, 20]. Со стороны 5'-плеча оцОДН встроилось больше нуклеотидов, чем со стороны 3'-плеча. По данным исследования системы репарации неспаренных оснований эффективность вставки на расстоянии более 9 нт от разрыва сильно зависит от того, на какой стороне была замена. Замена со стороны 5'-плеча происходила в 6–10% случаев, со стороны 3'-плеча – не происходила совсем [20]. Предположительно, причина в том, что 3'-плечо может отжигаться с выступающим

концом на месте разрыва геномной ДНК, а 5'-плечо не способно на отжиг с выступающим концом. Также возможно влияние активности ДНК-полимеразы Polδ(3'-5'), которая может устранить несовпадения нуклеотидов близко к 3'-концу матрицы [19]. В нашей работе мы также можем отметить, что процент успешно отредактированных клеток имел тенденцию к увеличению в тех образцах, где были использованы оцОДН с меньшим количеством замен (рис. 2, а). Вероятнее всего, это обусловлено тем, что плечи гомологии не являются строго комплементарными геномной ДНК, из-за чего эффективность геномного редактирования после инициации ДЦР могла заметно снизиться.

Перекрывающиеся пики на хроматограммах, полученных в данной работе, обусловлены секвенированием смеси аллелей, часть из которых редактировалась, а часть – нет. Современные методы анализа хроматограмм, один из которых – TIDER [22] – использованный нами, позволяют разложить сложную хроматограмму на составляющие. Этот метод широко используется в подобных работах [23, 24], т.к. он позволяет получать точные и воспроизводимые данные по результатам анализа сложных хроматограмм.

Таким образом, в результате работы были четко установлены длины фрагментов оцОДН, участвующие в создании гомологии и интеграции в локус ДЦР. На основе этих данных можно рационально подходить к дизайну оцОДН для коррекции мутаций с целью разработки генной терапии наследственных болезней человека на основе метода CRISPR-Cas9.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для ФГБНУ «МГНЦ». Создание клеточной культуры HEK293T-GFPmut выполнено за счет средств гранта РФФИ № 19-29-04044.

Благодарности. Коллектив выражает благодарность к.б.н. Н.Г. Гурской из Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова (Москва) за помощь в получении клеточной культуры HEK293T-GFPmut.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistry.moscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fellmann, C., Gowen, B. G., and Lin, P. C. (2017) Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy, *Nat Rev Drug Discov.*, **16**, 89-100, doi: 10.1038/nrd.2016.238.
2. Peters-Hall, J. R., Coquelin, M. L., Torres, M. J., LaRanger, R., Alabi, B. R., et al. (2018) Long-term culture and cloning of primary human bronchial basal cells that maintain multipotent differentiation capacity and CFTR channel function, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **315**, L313-L327, doi: 10.1152/ajplung.00355.2017.
3. Smirnikhina, S. A., Kondrateva, E. V., Adilgereeva, E. P., Anuchina, A. A., Zaynitdinova, M. I., et al. (2020) P.F508del editing in cells from cystic fibrosis patients, *PLoS One*, **15**, e0242094, doi: 10.1371/journal.pone.0242094.
4. Richardson, C. D., Ray, G. J., DeWitt, M. A., Curie, G. L., and Corn, J. E. (2016) Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA, *Nat. Biotechnol.*, **34**, 339-344, doi: 10.1038/nbt.3481.
5. Guha, T. K., Wai, A., and Hausner, G. (2017) Programmable genome editing tools and their regulation for efficient genome engineering, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **15**, 146-160, doi: 10.1016/j.csbj.2016.12.006.
6. Durai, S., Mani, M., Kandavelou, K., Wu, J., Porteus, W. H., and Chandrasegaran, S. (2005) Zinc finger nucleases: Custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5978-5990, doi: 10.1093/nar/gki912.
7. Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, Li, Zhang, Y., et al. (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting, *Nucleic Acids Res.*, **39**, e82, doi: 10.1093/nar/gkr218.
8. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., et al. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, **337**, 816-821, doi: 10.1126/science.1225829.
9. Liu, M., Rehman, S., Tang, X., Gu, K., Fan, Q., et al. (2019) Methodologies for improving HDR Efficiency, *Front. Genet.*, **9**, doi: 10.3389/fgene.2018.00691.
10. Seol, J. H., Shim, E. Y., and Lee, S. E. (2018) Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly, *Mutat. Res.*, **809**, 81-87, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2017.07.002.
11. Davis, L., Zhang, Y., Maizels, N. (2018) Assaying repair at DNA nicks, *Methods Enzymol.*, **601**, 71-89, doi: 10.1016/bs.mie.2017.12.001.
12. Gallagher, D. N., and Haber, J. E. (2021) Single-strand template repair: Key insights to increase the efficiency of gene editing, *Curr. Genet.*, **67**, 747-753, doi: 10.1007/s00294-021-01186-z.
13. Hu, Z., Zhou, M., Wu, Y., Li, Z., Liu, X., et al. (2019) ssODN-mediated in-frame deletion with CRISPR/Cas9 restores FVIII function in hemophilia A-patient-derived iPSCs and ECs, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **17**, 198-209, doi: 10.1016/j.omtn.2019.05.019.
14. Bennett, H., Aguilar-Martinez, E., and Adamson, A. D. (2021) CRISPR-mediated knock-in in the mouse embryo using long single stranded DNA donors synthesised by biotinylated PCR, *Methods*, **191**, 3-14, doi: 10.1016/j.jymeth.2020.10.012.
15. Cristea, S., Freyvert, Y., and Santiago, Y. (2013) *In vivo* cleavage of transgene donors promotes nuclease-mediated targeted integration, *Biotechnol. Bioeng.*, **110**, 871-880, doi: 10.1002/bit.24733.
16. Fueller, J., Herbst, K., Meurer, M., Gubicza, K., Kurtulmus, B., et al. (2020) CRISPR-Cas12a-assisted PCR tagging of mammalian genes, *J. Cell Biol.*, **219**, e201910210, doi: 10.1083/jcb.201910210.
17. Bai, H., Liu, L., An, K., Lu, X., Harrison, M., et al. (2020) CRISPR/Cas9-mediated precise genome modification by a long ssDNA template in zebrafish, *BMC Genomics*, **21**, 67, doi: 10.1186/s12864-020-6493-4.
18. Lim, D., Sreekanth, V., Cox, K. J., Law, B. K., Wagner, B. K., et al. (2020) Engineering designer beta cells with a CRISPR-Cas9 conjugation platform, *Nat. Commun.*, **11**, 4043, doi: 10.1038/s41467-020-17725-0.
19. Harmsen, T., Klaasen, S., van de Vrugt, H., Riele, H. T. (2018) DNA mismatch repair and oligonucleotide end-protection promote base-pair substitution distal from a CRISPR/Cas9-induced DNA break, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 2945-2955, doi: 10.1093/nar/gky076.
20. Gallagher, D. N., Pham, N., Tsai, A. M., Janto, N. V., Choi, J., et al. (2020) A Rad51-independent pathway promotes single-strand template repair in gene editing, *PLoS Genet.*, **16**, e1008689, doi: 10.1371/journal.pgen.1008689.
21. Serebrowskaya, E. O., Podvalnaya, N. M., Dudenkova, V. V., Efremova, A. S., Gurskaya, N. G., et al. (2020) Genetically encoded fluorescent sensor for poly-ADP-ribose, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 5004, doi: 10.3390/ijms21145004.
22. Brinkman, E. K., Kousholt, A. N., Harmsen, T., Leemans, C., Chen, T., et al. (2018) Easy quantification of template-directed CRISPR/Cas9 editing, *Nucleic Acids Res.*, **46**, e58, doi: 10.1093/nar/gky164.
23. Etard, C., Joshi, S., and Stegmaier, J. (2017) Tracking of indels by DEdecomposition is a Simple and effective method to assess efficiency of guide RNAs in zebrafish, *Zebrafish*, **14**, 586-588, doi: 10.1089/zeb.2017.1454.
24. Sentmanat, M. F., Peters, S. T., Florian, C. P., Connelly, J. P., and Pruett-Miller, S. M. (2018) A survey of validation strategies for CRISPR-Cas9 editing, *Sci. Rep.*, **8**, 888, doi: 10.1038/s41598-018-19441-8.

RATIONAL DESIGN OF SSODN TO CORRECT MUTATIONS BY GENE EDITING

**O. V. Volodina¹, A. A. Anuchina¹, M. I. Zainitdinova¹,
N. A. Evtushenko², A. V. Lavrov¹, and S. A. Smirnikhina^{1*}**

¹ *Research Centre for Medical Genetics, 115522 Moscow, Russia; e-mail: smirnikhinas@gmail.com*

² *Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,
Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow, Russia*

Gene editing allows to make a variety of targeted changes in genome, which can potentially be used to treat hereditary human diseases. Despite numerous studies in this area, effectiveness of gene editing methods for correcting mutations is still low, so these methods are not allowed in routine practice. It has been shown that rational design of genome editing components can significantly increase efficiency of mutation correction. In this work, we propose design of single-stranded oligodeoxyribonucleotides (ssODNs) to increase efficiency of gene editing. Using a model system to repair knocked out *EGFP* that is integrated into genome of HEK293T cell culture, we have shown that only a small part of ssODN (about 20 nucleotides: from the 15th nucleotide at 3'-end to the 4th nucleotide at 5'-end), a donor molecule for repairing double-stranded DNA breaks, integrates into the site of the break. Based on obtained data, it is possible to rationally approach design of ssODNs to correct mutations using CRISPR-Cas9 method for development of gene therapy for hereditary human diseases.

Keywords: CRISPR-Cas9, single-strand template repair, single-stranded oligodeoxyribonucleotides, *EGFP*, flow cytometry

УДК 539.26

ФОРМИРОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА ВО ВНУТРЕННЕЙ ПОЛОСТИ ФЕРРИТИН-ПОДОБНОГО БЕЛКА Dps. ИССЛЕДОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ АНОМАЛЬНОЙ ДИСПЕРСИИ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ

© 2022 Э.В. Штыкова^{1*}, М.В. Петухов^{1,2}, А.А. Можжев^{1,3,4,5}

¹ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, 119333 Москва, Россия; электронная почта: shtykova@ns.crys.ras.ru

² Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119071 Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, 117997 Москва, Россия

⁵ Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 101000 Москва, Россия

Поступила в редакцию 12.04.2022

После доработки 26.04.2022

Принята к публикации 26.04.2022

Особое место среди додекамерных мини-ферритинов занимает белок Dps, важнейшей функцией которого является защита генома бактерий от различных видов разрушительного внешнего воздействия путем *in celulo* Dps–ДНК сокристаллизации. Следствием такой защитной реакции является возникновение бактериальной резистентности к антибиотикам и другим лекарственным средствам. Поэтому исследованию геном-защитных свойств Dps уделяется огромное внимание. Однако не менее важна другая сторона функциональных особенностей Dps. Будучи ферритин-подобным, этот белок выступает в качестве депо для резервного хранения железа и защищает бактериальные клетки от окислительного повреждения, инициируемого его избытком. Исследование этого явления также является весьма актуальным, и данная работа посвящена изучению процессов формирования наночастиц оксида железа во внутренней полости додекамера Dps. В качестве основного метода исследования был выбран метод аномального малоуглового рассеяния, который позволяет изучать структуру металлосодержащих биологических макромолекул и определять распределение по размерам образовавшихся в них металлических наночастиц. Вклады белковой и металлической составляющих в общее рассеяние разделяются путём вариации энергии падающего рентгеновского излучения вблизи края полосы поглощения атомами металла, в данном случае K-полосы поглощения железа. Были исследованы образцы Dps, содержащие 50, 500 и 2000 атомов железа на додекамер белка. Анализ полученных распределений по размерам показал, что в зависимости от содержания железа в растворе внутри белковой молекулы формируются наночастицы с размерами 2–4 нм и рост металлических наночастиц ограничен размером центральной полости белка. Было также показано, что некоторое количество ионов железа содержится в поверхностном слое Dps. Этот слой очень важен для выполнения белком своих защитных функций, поскольку находящиеся здесь N-концевые домены определяют характер взаимодействия Dps с ДНК. В целом, полученные в данной работе результаты могут быть полезными в качестве очередного шага в изучении феномена Dps, а также с практической точки зрения при создании биосовместимых и стабилизированных в растворе металлических наночастиц.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ферритин-подобные белки, белок Dps, оксид железа, аномальное малоугловое рентгеновское рассеяние, распределение по размерам.

DOI: 10.31857/S0320972522050049, EDN: ATBBAO

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что приблизительно одна треть белков и почти половина ферментов из тех, ко-

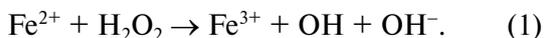
торые уже были изучены, содержат от одного до нескольких ионов различных металлов [1, 2]. Среди них железо является одним из наиболее жизненно важных и распространённых химических элементов. Чаще всего этот металл обнаруживается в белках в составе гема или железосерных простетических групп [2, 3]. Биологическое значение железа определяется его способностью обратимо окисляться и восстанавли-

Принятые сокращения: АМУРР – аномальное малоугловое рентгеновское рассеяние; ММ – молекулярная масса; МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние.

* Адресат для корреспонденции.

ваться. В виде двухвалентных или трёхвалентных ионов железо необходимо для жизненных процессов всех эукариот и большинства прокариот. Оно участвует в таких метаболических процессах, как транспорт кислорода, синтез ДНК, транспорт электронов для производства энергии и является универсальным микроэлементом, который обеспечивает нормальное функционирование всех систем организма на клеточном уровне.

С другой стороны, избыток этого металла катализирует повреждение ДНК, белков и липидов, приводя к нарушению клеточного гомеостаза. Существующие эволюционные механизмы детоксикации и удаления железа из цитозоля включают окисление избыточных ионов двухвалентного железа до трёхвалентного состояния в соответствии с реакцией Фентона [4]:



Накопление образовавшихся ионов трёхвалентного железа происходит в живых организмах в ферритин-подобных белках. Ферритины, как белковое суперсемейство, эволюционно развились для секвестрации железа в растворимой, нетоксичной и биодоступной форме [5]. В составе этих белков неиспользованное железо выступает в качестве резервного и хранится в нереакционноспособном месте отдельно от клеточных процессов, и, соответственно, клетки оказываются защищёнными от окислительного повреждения, инициированного этим металлом [6, 7]. Ферритин – это сложный белковый комплекс, выполняющий роль основного внутриклеточного депо железа у человека и животных и содержащийся практически во всех органах и тканях. Апоферритин млекопитающих (т.е. макромолекула, не содержащая железа) представляет собой тетракозамерный белок с общей молекулярной массой (*ММ*) ~450 кДа. Каждая из 24 полипептидных субъединиц имеет *ММ* ~20 кДа. Структурно, ферритин – это глобулярный белок с центральной полостью, в которой хранится примерно 4500 ионов гидратированного оксида трёхвалентного железа ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) вместе с переменным количеством фосфатов. Внешний диаметр белка составляет 12–13 нм, а диаметр внутренней полости – 7–8 нм [7, 8]. Белковая оболочка ферритина имеет многочисленные поры, через которые осуществляется транспорт железа [9].

Существуют также по крайней мере три типа ферритин-подобных прокариотических белков: бактериальный ферритин, бактериоферритин и додекамерный ферритин (мини-ферритин). Эти бактериальные белки родственны ферритинам,

обнаруженным у эукариот. Бактериальный ферритин и бактериоферритин так же, как ферритин млекопитающих, представляют собой структуру, состоящую из 24 субъединиц с центральной полостью, которая может содержать ~2500 атомов железа в случае бактериального ферритина [10] и ~1800 атомов железа – для бактериоферритина [10, 11]. Существенное отличие бактериоферритина от других форм ферритина состоит в наличии в его структуре гема (протопорфирина IX железа), расположенного между каждыми двумя субъединицами белка и соединённого с метионином каждой из этих субъединиц. Таким образом, одна молекула бактериоферритина содержит 12 групп гема, роль которых, однако, до конца неясна [12–14].

Среди додекамерных мини-ферритинов особое место занимает белок Dps (DNA-binding protein from starved cells), одной из наиболее значимых функций которого является защита генома от таких пагубных факторов, как голодание, термическое воздействие, УФ-и γ -облучение, токсины, химический шок и окислительный стресс. Dps связывается с ДНК, в результате чего формируется устойчивый кристаллический комплекс Dps–ДНК, защищающий дезоксирибонуклеиновую кислоту от повреждений [15–17]. Важным следствием такой защитной реакции является возникновение бактериальной резистентности к антибиотикам и другим лекарственным средствам. Именно поэтому в течение последних двух десятилетий формирование защитных комплексов Dps–ДНК в стресс-индуцированных бактериальных клетках привлекает внимание многих научных групп. Среди публикаций на эту тему наиболее известными являются работы А. Минского и соавторов, которые впервые представили экспериментальные доказательства этого явления [18–20].

В бактериальной клетке Dps обычно содержится в незначительных количествах, а его синтез индуцируется во время стационарной фазы роста бактерии, голодания или окислительного стресса [21]. Известно, что додекамер Dps не содержит каких-либо модулей в своей структуре, предназначенных для распознавания конкретных нуклеотидных последовательностей. Взаимодействие с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК предположительно осуществляется за счёт электростатических связей с богатыми лизином *N*-концевыми доменами мономеров Dps [15, 22–24]. Однако точный механизм, с помощью которого происходит связывание белка с ДНК, неизвестен [25].

Первичная структура мономера Dps представляет собой полипептидную цепь из 167 аминокислотных остатков с *ММ* 18,7 кДа и содер-

жит высоко консервативную последовательность, состоящую из четырёх α -спиралей [26]. Додекамер имеет MM 224,4 кДа, обладает симметрией типа 23, внешний диаметр белка равен 8–9 нм, а диаметр внутренней полости – 4–5 нм. Будучи ферритин-подобным белком, каждый мономер которого может связать до 40 атомов железа, Dps способен накапливать приблизительно 500 ионов Fe^{+3} в своей центральной полости [27].

Таким образом, Dps выполняет одновременно две важнейших для жизнедеятельности бактериальных клеток функции: (1) – формируя кристаллический комплекс с ДНК, он сохраняет генетический материал бактерии от воздействия внешних неблагоприятных факторов; (2) – служит депо для резервного хранения железа и защищает клетки от окислительного повреждения, инициированного его избытком. Обе эти функции тесно связаны между собой. Так, анализируя повреждение ДНК *in vitro*, Zhao et al. [27] показали, что ДНК *Escherichia coli* расщепляется при воздействии сочетания $FeSO_4$ и H_2O_2 , но не повреждается в присутствии Dps. То есть образование комплекса белка с ДНК и способность обезвреживать перекись водорода во время взаимодействия с железом приводит к сохранению генома *E. coli* в условиях стресса [28].

Несмотря на то что Dps *E. coli* не содержит канонических ферроксидазных сайтов, присутствующих в бактериоферритине *E. coli* или бактериальном ферритине, Fe^{2+} может окисляться в некоторых областях белковой макромолекулы и затем накапливаться в виде Fe^{3+} в центральной полости белка [27]. Предположительно, ферроксидазные участки Dps состоят из железосвязывающих аминокислот, включая аспарат, глутамат и гистидин [28, 29]. Например, *N*-концевой домен экспрессированного из бактерии *Deinococcus radiodurans* Dps (DrDps1) содержит область (остатки 30–55), в которой находится сайт связывания с металлами (с мотивом $Asp_{36}x_2His_{39}x_{10}His_{50}x_4Glu_{55}$), расположенный на внешней поверхности додекамера. Разрушение этого сайта влияет на самосборку белка, а также снижает его способность связывания с ДНК, т.е. снижает его защитные функции [30].

В отличие от Dps, далеко не все бактериальные додекамерные мини-ферритины могут одновременно защищать организм от окислительного стресса, образуя кристаллический комплекс с ДНК, и в то же время быть источником железа при его дефиците [31]. Именно поэтому уникальные особенности Dps привлекают такое внимание. Кроме того, в необходимости и важности исследования свойств этого белка присутствует и технологический аспект. Накопление в

достаточном количестве ионов металла во внутренней полости Dps предполагает наличие магнитных свойств, и эти белковые молекулы можно рассматривать как естественные биосенсоры электромагнитного излучения. Dps способен передавать полученный сигнал на ДНК и, следовательно, является чрезвычайно перспективным в качестве основы для создания логических элементов нового поколения. Таким образом, изучение процессов формирования наночастиц железа в стабилизирующей белковой оболочке Dps имеет не только научный, но и практический интерес.

Для того чтобы методом малоуглового рассеяния исследовать структуру металлсодержащих образцов и распределение по размерам образовавшихся в них металлических наночастиц, вклады этих двух составляющих в общее рассеяние следует разделить. Для изучения структуры исходного образца до формирования в нём частиц металла, т.е. матрицы, используется традиционное малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР) [32]. Стандартный метод вычитания рассеяния исходной матрицей из общего рассеяния от металлсодержащего образца возможен только в тех случаях, когда матрица не меняет свою структуру в процессе формирования в ней частиц металла. В том же случае, когда структурные изменения в исходном образце, предположительно, имеют место, используется метод аномального малоуглового рассеяния (АМУРР) [33–36]. В этом методе экспериментальные кривые МУРР от металлсодержащего образца измеряются при разных энергиях рентгеновского пучка: вблизи края полосы поглощения атомами данного металла, т.е. регистрируется рассеяние только от матрицы, и вдали от него, когда снимается общее рассеяние. Полученная разность относится к рассеянию только от наночастиц, содержащих атомы данного металла. Анализ вклада каждой из составляющих позволяет, таким образом, рассчитать распределение по размерам наночастиц металла и исследовать структуру металлсодержащего образца в процессе его взаимодействия с металлом.

В настоящей работе процесс накопления оксида железа во внутренней полости ферритин-подобного белка Dps изучался с помощью аномальной дисперсии рентгеновских лучей, т.е. методом аномального малоуглового рассеяния.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка образцов Dps, содержащих железо. Экспрессия и очистка белка Dps проводи-

лись по ранее разработанной методике [37, 38]. Очищенный белок концентрировали на центрифужном концентраторе Amicon («Merck Millipore», США) с порогом молекулярной массы 10 кДа до концентрации 3 мг/мл, а затем подвергали диализу в буфере 50 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Чистоту анализировали методом электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле, а концентрацию белка определяли спектрофотометрически при A280 с использованием молярного коэффициента абсорбции [39].

К раствору очищенного Dps с концентрацией 3 мг/мл в буфере 50 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) добавляли свежеприготовленный раствор $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в количестве, соответствующем 50, 500 и 2000 атомам железа на додекамер. Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 30 мин. Полученные таким образом железосодержащие образцы далее обозначены в тексте как Dps-Fe50, Dps-Fe500 и Dps-Fe2000 соответственно.

Эксперимент и анализ данных малоуглового рассеяния. Традиционное малоугловое рассеяние. Исследования структуры белка Dps с помощью традиционного малоуглового рентгеновского рассеяния были проведены на синхротроне Petra III (DESY, Германия) на линии P12 [40]. Линия P12 оснащена оборудованием для автоматической смены образцов и двумерным детектором Pilatus 2M («DECTRIS», Швейцария). Интенсивность рассеяния $I(s)$ была измерена в области значений волновых векторов $0,08 < s < 3 \text{ нм}^{-1}$, где $s = (4\pi \sin \theta) / \lambda$ – вектор рассеяния, 2θ – угол рассеяния, и $\lambda = 0,124 \text{ нм}$ – длина волны излучения. Для каждого образца было снято по 50 экспериментальных кривых рассеяния для контроля возможных радиационных повреждений. Радиационного повреждения обнаружено не было.

Первичная обработка кривых рассеяния была проведена с использованием программы PRIMUS [41]. Анализ, интерпретация полученных данных и структурное моделирование проводили с использованием программного комплекса ATSAS [42].

Радиусы инерции (R_g) рассеивающих частиц определялись по начальному участку кривой рассеяния в области самых малых значений s с помощью формулы:

$$I_{\text{exp}}(s) = I(0) \exp(-s^2 R_g^2 / 3), \quad (2)$$

которая справедлива в области $(sR_g) < 1,3$. Из наклона прямолинейного участка графика Гинье – $\ln I(s)$ от s^2 – определяли интенсивность рассеяния в нулевой угол $I(0)$, которая пропор-

циональна молекулярной массе рассеивающей объекта, и радиус инерции R_g .

Молекулярные массы рассчитывали по данным МУРР двумя методами: с помощью подхода Байеса (MM_{Bayesian}) [43] и из значения исключенного объема V_p (породовского объема), недоступного растворителю [44], используя эмпирическое соотношение между V_p и MM_p , которое для белков равно 1,65 [45].

Для построения функции распределения по расстояниям $p(r)$, которая необходима для восстановления формы белка Dps в растворе по данным МУРР, использовалась компьютерная программа GNOM [46]. Функции распределения по расстояниям $p(r)$ определялись с помощью косвенного Фурье-преобразования интенсивности рассеяния в соответствии с интегральным уравнением:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty sr I(s) \sin(sr) ds, \quad (3)$$

где $I(s)$ – интенсивность рассеяния. При этом максимальный размер частицы (D_{max}) находится из условия $p(r) = 0$ при $r > D_{\text{max}}$.

Ab initio метод восстановления формы низкого разрешения белка Dps основан на алгоритме имитации отжига и реализован в программе DAMMIN [47], с помощью которой происходит построение структурных моделей с минимизацией невязки χ^2 между экспериментальными данными и рассеянием, полученным от моделей:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_j \left[\frac{I_{\text{exp}}(s_j) - c I_{\text{calc}}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2, \quad (4)$$

где N – число экспериментальных точек, $I_{\text{exp}}(s_j)$ и $\sigma(s_j)$ – экспериментальные интенсивности и их ошибки, $I_{\text{calc}}(s_j)$ – интенсивность, вычисленная от модели, c – шкалирующий множитель.

Для определения структуры белка, содержащего атомы железа, был использован метод мультифазного моделирования *ab initio*, что позволило определить не только структуру низкого разрешения белковой составляющей комплекса, но и расположение атомов железа в белковой матрице. Построение двухкомпонентной (двухфазной) модели проводилось с использованием программы MONSA [47]. В программе учитывается различие электронных плотностей белковой и металлической составляющих комплекса, а также соотношение их объемов. Для получения двухфазной модели белок–металл были использованы кривые малоуглового рассеяния от исходного белка и белка, содержащего атомы железа. Теоретическая интенсивность рассеяния построенных моделей рассчитывалась программой CRY SOL [48].

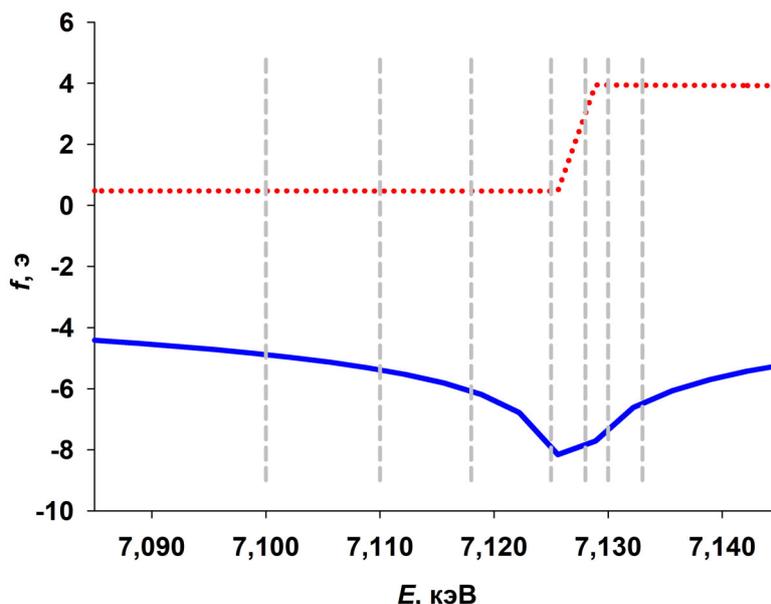


Рис. 1. Изменение действительной и мнимой компонент аномального рассеяния рентгеновского излучения $f'(E)$ (синяя сплошная линия) и $f''(E)$ (красная пунктирная кривая) в зависимости от энергий фотонов E вблизи K – полосы поглощения атомами Fe – $E = 7,125$ кэВ. Вертикальными пунктирными линиями обозначены энергии излучения, при которых проводились измерения аномального рассеяния. Расчетные данные дисперсионных поправок для атомов железа были взяты с сайта открытого доступа (<http://skuld.bmsc.washington.edu/>)

Аномальное малоугловое рассеяние. Эксперименты по аномальному рассеянию также проводились на синхротроне Petra III на линии P12 и заключались в измерении кривых рассеяния рентгеновского излучения при разных длинах волн λ , т.е. при разных энергиях падающего пучка E . Измерения были проведены для исходного белка Dps и образцов Dps, содержащих 50 (Dps-Fe50), 500 (Dps-Fe500) и 2000 (Dps-Fe2000) атомов железа на додекамер. Данные рассеяния регистрировали при нескольких различных энергиях фотонов E_k , при этом энергия E_0 (10 000 кэВ, $\lambda = 0,124$ нм) находится достаточно далеко от края поглощения Fe, и поэтому она была выбрана для изучения структуры исходной макромолекулы Dps, т.е. в этом случае использовался традиционный метод МУРР, как описано выше. Полученные данные МУРР и АМУРР были скорректированы на фоновое рассеяние, флуоресценцию и обработаны с помощью программного комплекса ATSAS [42] и недавно разработанной стратегии сбора данных и обработки аномального малоуглового рассеяния [49].

Рассеивающий фактор атома определяется следующим образом:

$$f(E) = f_0 + f'(E) + if''(E), \quad (5)$$

где дисперсионные поправки $f'(E)$ и $f''(E)$ становятся существенными вблизи края полосы

поглощения резонансного атома. В данном случае измерения проводились вблизи K – полосы поглощения атомами Fe, т.е. при энергии фотонов $E = 7,125$ кэВ ($\lambda = 0,174$ нм). На рис. 1 приведена кривая изменения дисперсионных поправок $f'(E)$ и $f''(E)$ в зависимости от энергий фотонов E , используемых в данной работе.

Для каждого образца были измерены кривые рассеяния $I(s, E_k)$ при 7 различных энергиях падающего излучения E_{1-7} : 7,100, 7,110, 7,118, 7,125, 7,128, 7,130 и 7,133 кэВ в районе края K – полосы поглощения атомами Fe ($E = 7,125$ кэВ). Аномальные поправки для $E = 7,125$ кэВ составили $-8,13$ и $0,48$ соответственно. Разность между кривыми рассеяния, полученными при разных энергиях $\Delta_k(s) = I(s, E_0) - I(s, E_k)$, пропорциональна рассеянию резонансными атомами [33–36]. Эти разностные кривые были использованы при вычислении объёмных функций распределения по размерам $D_V(R)$. Интегральное уравнение

$$I(s) = (\Delta\rho)^2 \int_{R_{\min}}^{R_{\max}} D_V(R) m^2(R) i_0(sR) dR \quad (6)$$

было решено относительно $D_V(R)$ с помощью компьютерной программы GNOM [46] в предположении сферичности образованных наночастиц. В этом уравнении R – радиус сферы, R_{\min} и R_{\max} – минимальный и максимальный размеры, $i_0(x) = \{[\sin(x) - x \cos(x)]/x^3\}^2$ и

$m(R) = (4\pi/3)R^3$ – соответственно форм-фактор сферы и её объём. Плотность рассеивающей длины аномальных атомов определяется как $\Delta\rho = (N_0^2 - N_k^2)e/v_{at}$, где N_0 и N_k – число электронов, вносящих вклад в рассеяние вдали от резонанса и при $E = E_k$, e – заряд электрона и v_{at} – атомный объём.

Был также использован альтернативный метод анализа распределений по размерам наночастиц Fe, образующихся в белке Dps, реализованный в программе MIXTURE [41]. В этом подходе интенсивность рассеяния $I(s)$ от смеси k разных компонентов разного размера представлена в виде линейной комбинации:

$$I(s) = \sum_{k=1}^K v_k I_k(s), \quad (7)$$

где v_k – объёмная доля компонента k , I_k – интенсивность рассеяния этого компонента, K – количество компонентов. Программа MIXTURE моделирует рассеяние от смесей, содержащих K – число разных по форме и размерам рассеивающих объектов, при этом используется теоретическое рассеяние от простых тел (сфер, полых сфер, эллипсоидов, цилиндров и т.д.), каждое из которых характеризуется своей объёмной долей, средним размером, шириной полидисперсного распределения, контрастом и, опционально, возможностью межчастичных взаимодействий. Экспериментальная картина рассеяния аппроксимируется взвешенной комбинацией расчётных индивидуальных (парциальных) кривых от компонентов для минимизации невязки χ^2 между экспериментальными и модельными данными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование структуры белка Dps методом традиционного малоуглового рентгеновского рассеяния. Исследование структуры белка Dps в растворе и определение таких инвариантов малоуглового рассеяния, как радиус инерции R_g , породовой объём V_p , функция распределения по расстояниям $p(r)$ и максимальный размер D_{max} , а также молекулярная масса MM , было проведено с помощью традиционного МУРР. Предварительными измерениями было показано, что в растворе в интервале концентраций Dps от 1,0 мг/мл до 3,0 мг/мл не наблюдалось концентрационной зависимости и образования агрегатов. Поэтому для измерений и дальнейшей обработки и интерпретации данных МУРР был выбран образец с концентрацией 3,0 мг/мл, в результате чего кривая малоуглового рассеяния была достаточно информативной и мало-

шумящей в интервале угловых векторов $0,25 < s < 3,0 \text{ нм}^{-1}$ с хорошо выраженным форм-фактором (рис. 2, кривая 1).

Кривая МУРР от белка Dps, представленная на рис. 2, характерна для раствора монодисперсного белка сферической формы. О сферичности белка свидетельствует также рассчитанная с помощью программы GNOM [46] функция распределения по расстояниям $p(r)$ (рис. 2, вставка), которая описывает форму рассеивающего объекта [32] и используется в программе DAMMIN для восстановления структуры низкого разрешения по данным МУРР [47]. Из профиля функции $p(r)$ можно также сделать вывод о том, что в данном случае сферическое тело является полым – функция распределения по размерам ассиметрична, и её максимум смещён вправо. Кроме того, поскольку амплитуда функции $p(r)$ пропорциональна электронной плотности отдельных частей рассеивающего объекта, можно предположить, что в белке имеется более разреженный поверхностный слой, так как на профиле $p(r)$ в интервале размеров $\sim 8\text{--}9,6 \text{ нм}$ присутствует слабо рассеивающий «хвост». Из литературных данных и наших предыдущих исследований следует, что это рассеяние соответствует рассеянию гибкими N -концевыми доменами белка [24, 50, 51].

Структура низкого разрешения Dps (шариковая модель) была восстановлена по кривой малоуглового рассеяния с использованием программы DAMMIN [47]. Восстановление формы основано на алгоритме имитации отжига в пределах сферы, диаметр которой равен максимальному размеру макромолекулы белка D_{max} , который, в свою очередь, определялся из функции распределения по расстояниям и был равен 9,6 нм. Результаты восстановления представлены на рис. 2, б серыми шариками. Коэффициент невязки χ^2 с экспериментальными данными равен 1,9, что свидетельствует о хорошем соответствии экспериментальной кривой МУРР и кривой рассеяния от полученной формы низкого разрешения (рис. 2, а, кривая 2). Шариковая модель структуры Dps имеет центральную полость и соответствует известной кристаллической структуре белка (PDB ID: 1DPS) (рис. 2, б), хотя шариковая модель несколько больше по размеру за счёт рассеяния N -концевыми доменами, которые отсутствуют в структуре атомного разрешения 1DPS из-за гибкости и невозможности их кристаллизации [26].

Основные структурные характеристики Dps, полученные непосредственно по кривой малоуглового рассеяния без применения моделирования (инварианты МУРР), представлены в табл. 1.

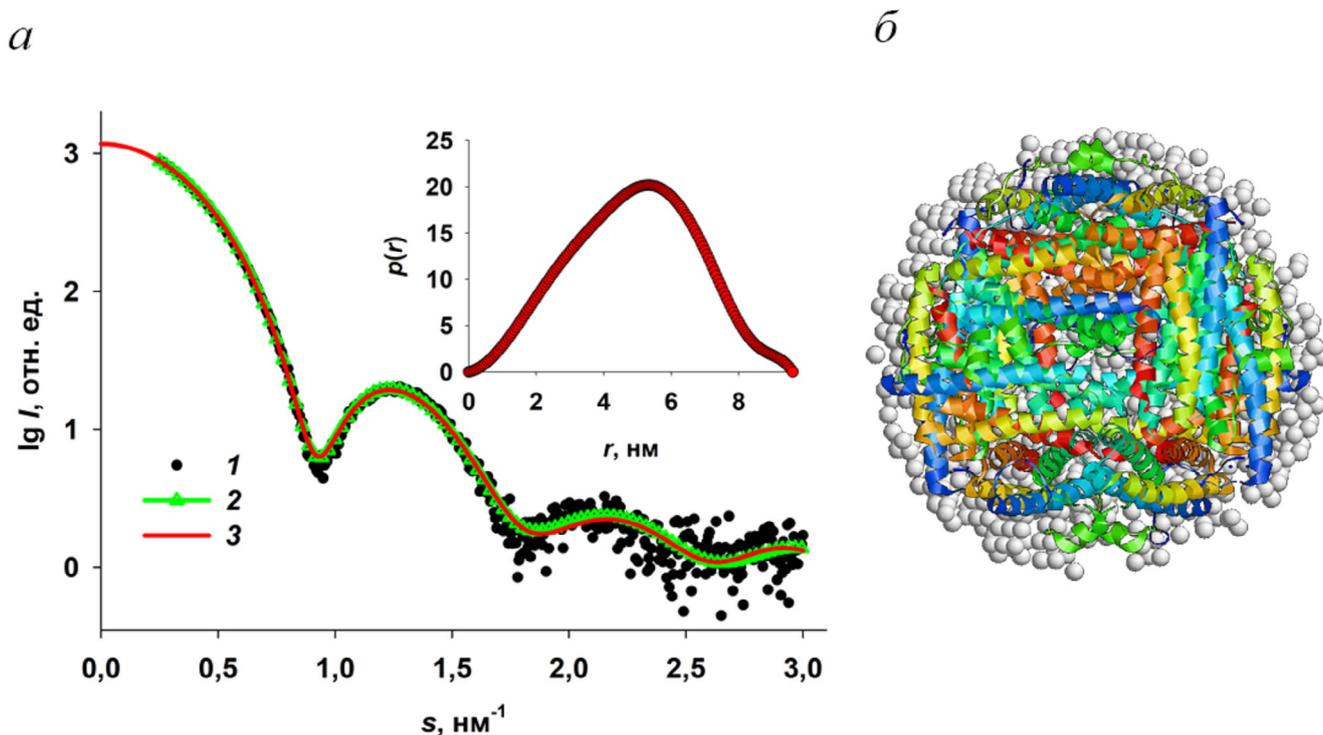


Рис. 2. Восстановление формы низкого разрешения белка Dps. *a* – Экспериментальная кривая малоуглового рентгеновского рассеяния (1); теоретическая кривая рассеяния, рассчитанная от шариковой модели, полученной с помощью программы DAMMIN (2); теоретическая кривая рассеяния, рассчитанная от функции распределения по расстояниям $p(r)$ (3). Вставка: функция распределения по расстояниям $p(r)$. *б* – Наложение кристаллической структуры Dps (цветные спирали) на шариковую модель, полученную с помощью программы DAMMIN (серые шарики)

Данные табл. 1 вместе с восстановленной формой низкого разрешения белка свидетельствуют о нативном состоянии Dps, соответствуют характеристикам этого белка, известным из литературы [26, 50, 51] и дают возможность его дальнейшего использования в исследовании процессов накопления атомов железа во внутренней полости белкового додекамера.

Использование аномального малоуглового рассеяния для изучения формирования наночастиц железа в Dps. Экспериментальные кривые аномального малоуглового рассеяния, измеренные при разных энергиях излучения, приведены на рис. 3.

Анализ кривых рассеяния от образцов с разным содержанием ионов Fe^{3+} , измеренных при разных энергиях излучения E_{1-7} , позволяет вы-

явить следующие особенности процесса взаимодействия белка Dps с ионами железа.

1. Кривые рассеяния при энергии E_0 вдали от полосы поглощения железа (10 000 кэВ, $\lambda = 0,124$ нм) и при энергиях $E_{1, 2}$ (7,100 и 7,110 кэВ) практически совпадают для всех Fe-содержащих образцов. По этой причине кривые МУРР, измеренные при E_0 , не показаны на рис. 3, чтобы не перегружать его.

2. Низкое содержание железа (50 атомов на молекулу Dps) не влияет на общие структурные характеристики белка при энергиях относительно далеких от K -полосы поглощения железа. Важно ещё раз подчеркнуть, что предварительный структурный анализ исходного белка Dps при энергии E_0 показал, что белок находится в состоянии, пригодном для использования его в качестве матрицы для формирования наночастиц железа.

3. В отличие от образца с низким содержанием железа (Dps-Fe50), образцы Dps-Fe500 и Dps-Fe2000 демонстрируют значительное увеличение интенсивности рассеяния в самых малых углах, т.е. проявляют высокую полидисперсность за счёт способности железа, как переходного металла, образовывать устойчивые ком-

Таблица 1. Основные структурные характеристики белка Dps

| Образец | R_g , нм | V_p , нм ³ | D_{max} , нм | MM_{Porod} , кДа | $MM_{Bayesian}$, кДа |
|---------|---------------|-------------------------|----------------|--------------------|-----------------------|
| Dps | $3,9 \pm 0,2$ | 330 ± 30 | 9,6 | 190 ± 20 | 210 |

плексы, например с азотом аминогрупп белка, стягивая между собой белковые цепи соседних макромолекул. Таким образом, белковая матрица существенно меняется при взаимодействии с соединением железа, и применение в данном случае аномального малоуглового рассеяния является сугубо необходимым.

4. В образцах с высоким содержанием ионов железа (Fe500 и Dps-Fe2000) следует ожидать наличия крупных металлических наночастиц за счёт образования белковых агрегатов, содержащих металл.

5. Кривые рассеяния, измеренные при разных энергиях фотонов E_{1-7} , показывают определённую зависимость от энергии падающего пучка в интервале угловых векторов $0,5 < s < 1,3 \text{ нм}^{-1}$ с минимумом при $s = 0,95 \text{ нм}^{-1}$ (рис. 3). Хотя эта зависимость наиболее заметна для образца Dps-Fe2000, тем не менее для всех железосодержащих образцов появляется возможность вычислить разность между кривыми рассеяния, полученными при различных энергиях $\Delta_k(s) = I(s, E_1) - I(s, E_k)$, которая пропорциональна рассеянию резонансными атомами Fe и

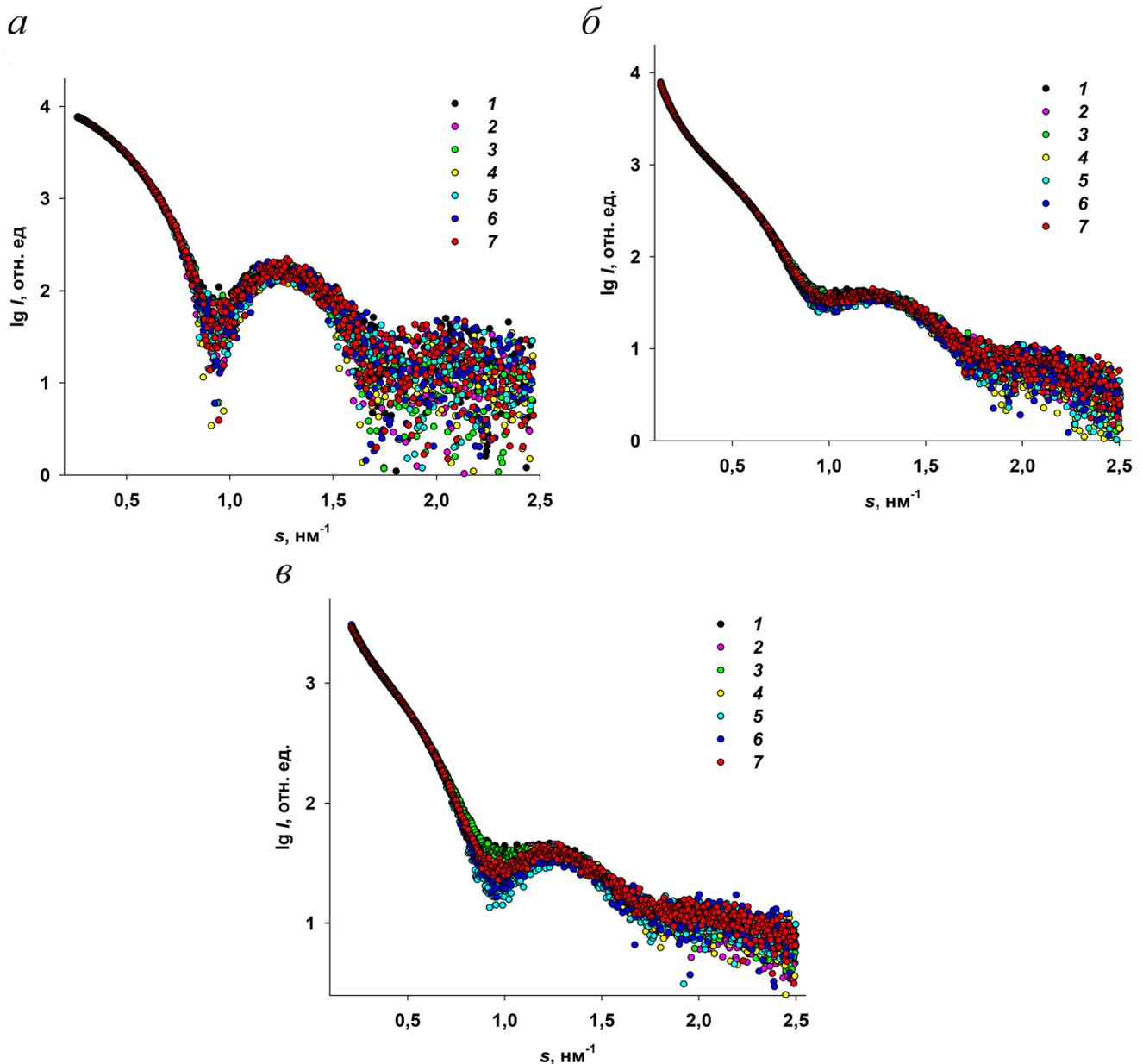


Рис. 3. Экспериментальные кривые рассеяния от трёх Fe-содержащих образцов белка Dps, измеренные при различных энергиях фотонов: Dps-Fe50 (а); Dps-Fe500 (б); Dps-Fe2000 (в). Номера кривых рассеяния соответствуют номерам энергий излучения E_{1-7} : 7,100; 7,110; 7,118; 7,125; 7,128; 7,130 и 7,133 кэВ

может быть использована для анализа распределений по размерам образованных в белковой матрице наночастиц металла.

б. Максимум аномального сигнала для всех Fe-содержащих образцов зарегистрирован при энергии фотонов $E_5 = 7,128$ кэВ, т.е. вблизи K-полосы поглощения Fe (рис. 1). Соответственно, кривая рассеяния при этой энергии использовалась для получения резонансного сигнала $\Delta_5(s) = I(s, E_1) - I(s, E_5)$ только от наночастиц железа, образующихся во внутреннем пространстве белка Dps. Критерием того, что разностный сигнал действительно вызван исключительно рассеянием частицами Fe, является отсутствие на полученных кривых аномального сигнала рассеяния от белковой матрицы, т.е. от фактора Dps. Этому критерию удовлетворяли все Fe-содержащие образцы (рис. 4, а).

Полученные кривые аномального сигнала использовались затем для расчёта объёмных функций распределения по размерам $D_V(R)$ наночастиц оксида железа, образующихся во внутренних полостях додекамера Dps (рис. 4, б). Важно отметить, что кривые аномального рассеяния достаточно хорошо выражены для образцов Dps-Fe500 и Dps-Fe2000, в то время как для образца Dps-Fe50 этот сигнал слабый и зашумлённый. Поэтому функцию распределения по размерам, рассчитанную по этой кривой, следует рассматривать только как оценочную.

Анализируя полученные объёмные распределения по размерам (рис. 4, б), можно отследить следующие закономерности. При малом содержании ионов железа формируются преимущественно мелкие наночастицы с размерами ~2 нм. При увеличении содержания железа до

500 атомов на молекулу белка также появляются наночастицы размером 4–5 нм (плечо на графике функции $D_V(R)$) и более крупные формирования размером до 20 нм, относящиеся к наночастицам оксида железа в белковых агрегатах. Последних, однако, при таком содержании ионов железа формируется совсем немного. И, наконец, при концентрации железа 2000 атомов на додекамер исчезают частицы размером 2 нм и преимущественно образуются частицы размером 4–5 нм, а также крупные Fe-содержащие структуры. То есть при высоких концентрациях железа внутренние полости белка практически полностью заполняются наночастицами ионов металла. Их размер ограничивается и определяется размером внутренней полости додекамера Dps и концентрацией железа в растворе, что имеет значение с точки зрения возможного использования матрицы этого белка для формирования стабилизированных в растворе металлических наночастиц.

Похожие результаты были получены альтернативным методом определения фракционного состава наночастиц железа в додекамере белка с помощью программы MIXTURE в предположении сферичности образованных наночастиц. Для каждого образца были заданы по три фракции с достаточно широким интервалом размеров $D_{\min} - D_{\max}$. Для каждой фракции программа MIXTURE рассчитала средний размер частиц и объёмную долю фракций (табл. 2).

Как и в случае определения объёмных распределений по размерам $D_V(R)$ с помощью интерактивной программы GNOM, в случае использования программы MIXTURE во всех образцах доминирующей фракцией оказываются наночастицы с размерами 2–4 нм и присутствует небольшое количество более крупных образований. Поскольку в обоих методах определяются объёмные доли наночастиц, то в количественном выражении число крупных частиц невелико даже для высокой концентрации атомов железа в исходном растворе, но из-за своего размера такие большие частицы вносят существенный вклад в рассеяние в самых малых углах, что хорошо видно на рис. 3, б и в.

Кривые малоуглового рассеяния, рассчитанные по указанным в табл. 2 фракционным составам каждого образца, хорошо соответствуют полученным аномальным сигналам (рис. 5).

Мультифазное *ab initio* моделирование по данным МУРР. Из анализа литературных данных известно, что сайты связывания ионов железа находятся не только во внутренней полости белка, но также и на поверхности додекамера Dps [28–30, 52]. В этом случае наночастицы не образуются, но поскольку на каждый мономер

Таблица 2. Фракционный состав наночастиц железа в белке Dps

| Образец | Интервал $D_{\min} - D_{\max}$, нм | D_{result} , нм | Объёмная доля, % |
|------------|-------------------------------------|--------------------------|------------------|
| Dps-Fe50 | 1,8–3,0 | 1,3 | 94 |
| | 4,0–6,0 | 4,6 | 1,0 |
| | 8,0–15,0 | 12,6 | 5,0 |
| Dps-Fe500 | 1,8–3,0 | 2,0 | 44 |
| | 4,0–6,0 | 4,0 | 43 |
| | 8,0–15,0 | 8,0 | 13 |
| Dps-Fe2000 | 1,8–3,0 | 1,5 | 44 |
| | 4,0–6,0 | 4,0 | 40 |
| | 8,0–15,0 | 9,0 | 16 |

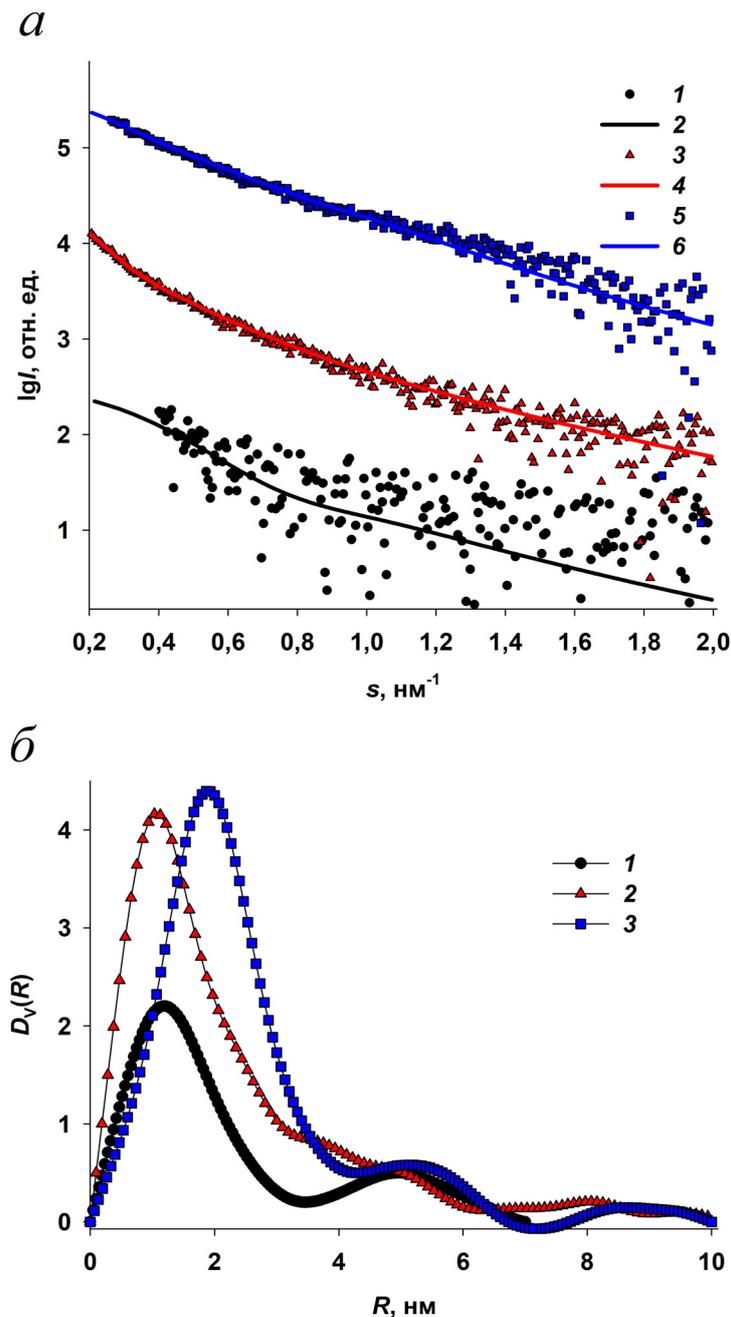


Рис. 4. Определение распределений по размерам наночастиц оксида железа по данным аномального малоуглового рассеяния. *a* – Разностные кривые (аномальный сигнал) $\Delta_s(s) = I(s, E_1) - I(s, E_2)$ и соответствующие расчётные кривые рассеяния от распределений по размерам наночастиц железа для образцов Dps-Fe50 (1 и 2); Dps-Fe500 (3 и 4) и Dps-Fe2000 (5 и 6). *b* – Объёмные распределения по размерам $D_v(R)$ наночастиц железа в образцах Dps-Fe50 (1), Dps-Fe500 (2) и Dps-Fe2000 (3), рассчитанные по кривым аномального сигнала программой GNOM

может приходиться до четырёх аминокислот, присоединяющих ионы металла в области *N*-концевых доменов белка, то в сумме эти атомы железа, благодаря своей высокой электронной плотности, вносят свой вклад в рассеяние всей макромолекулы в целом и в распределения по размерам в частности. В малоугловом рассеянии

существует метод, позволяющий использовать различие в электронных плотностях отдельных частей рассеивающих объектов, чтобы локализовать те или иные особенности структуры, связанные с этим различием. Таким методом является *ab initio* метод мультифазного моделирования, который реализован в программе MONSA [47].

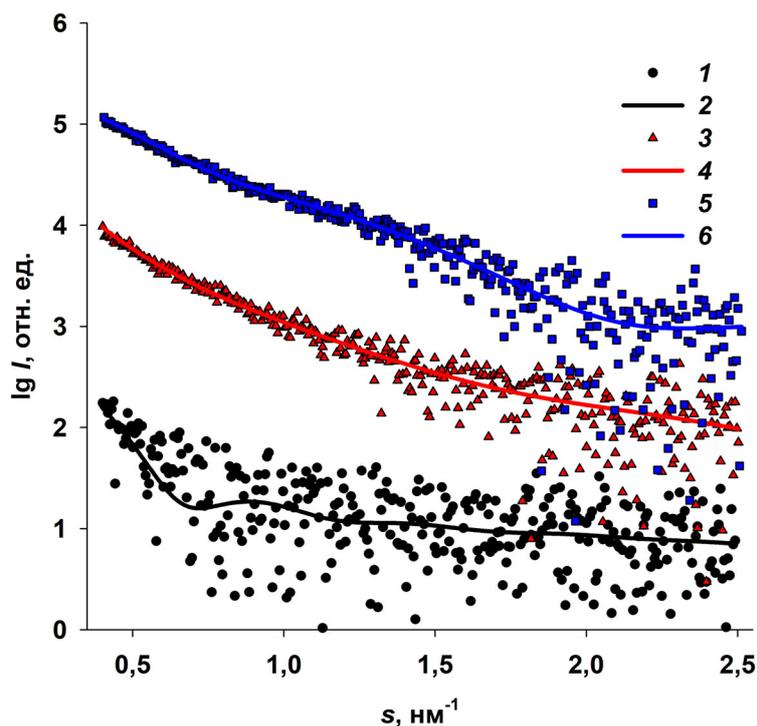


Рис. 5. Сравнение разностных кривых (аномальных сигналов) $\Delta_s(s) = I(s, E_1) - I(s, E_2)$ и соответствующих расчётных кривых рассеяния от распределений по размерам наночастиц, содержащих железо, для образцов Dps-Fe50 (1 и 2); Dps-Fe500 (3 и 4) и Dps-Fe2000 (5 и 6), полученных с помощью программы MIXTURE

Для решения структурной задачи в этом подходе необходимо учитывать различие электронных плотностей белковой и металлической составляющих комплекса, а также соотношение их объёмов. Для получения двухфазной модели белок–металл были использованы кривые малоуглового рассеяния от исходного белка и белка, содержащего атомы железа. Был выбран образец Dps-Fe500 со средним содержанием железа, когда можно надёжно детектировать сформированные наночастицы во внутренней полости белка, но в то же время на фоне сильного рассеяния от этих наночастиц можно будет определить локализацию значительно более мелких металлсодержащих групп на поверхности додекамера. Результаты моделирования представлены на рис. 6.

Мультифазное моделирование позволило впервые визуализировать локализацию атомов железа в поверхностном слое белка и в то же время подтвердить расположение основной массы металла в центральной полости додекамера. При этом получено хорошее соответствие между экспериментальными данными и расчётными кривыми от шариковых моделей с $\chi^2 = 2,1$. Такая обобщённая модель даёт наиболее полную картину формирования наночастиц оксида железа в ферритин-подобном белке,

имеющем также функцию защиты генетического материала бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хорошо известно, что не все мини-ферритины могут выполнять функцию защиты бактериального генома при окислительном стрессе и отнюдь не все нуклеоид-ассоциированные белки способны к детоксикации и накоплению атомов железа. Поэтому многофункциональность ферритин-подобного белка Dps уникальна, и её следствием является устойчивая резистентность бактерий к лекарственным препаратам и антибиотикам. Безусловно, основное внимание исследователей привлекает способность Dps к *in cellulo* биокристаллизации с ДНК. Образовавшиеся таким образом персистирующие клетки микроорганизмов толерантны ко многим внешним воздействиям и могут сохранять жизнеспособность в течение очень долгого времени, а при наступлении благоприятных условий дают начало новой популяции, сохраняющей свои патогенные свойства [53]. Поэтому архивация ДНК в процессе *in cellulo* сокристаллизации с Dps требует внимания и глубокого изучения. Однако не менее важно исследовать спо-

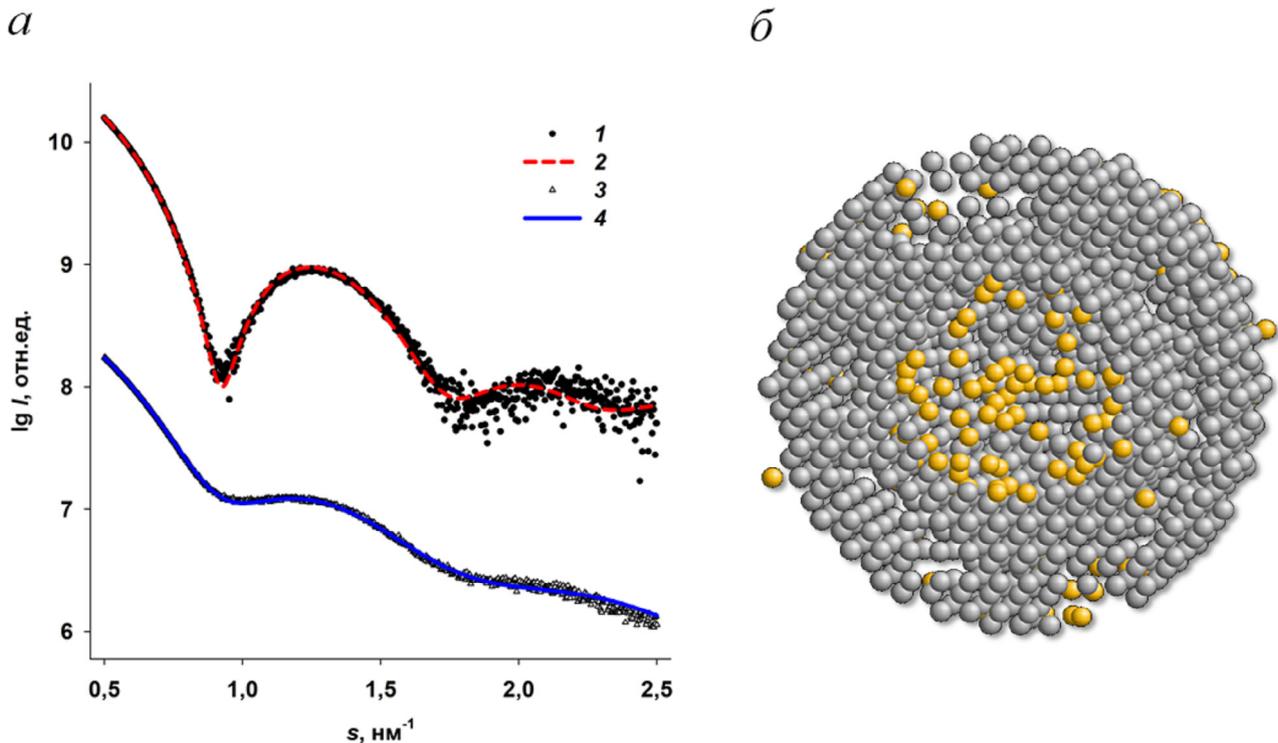


Рис. 6. Мультифазное моделирование комплекса Dps с железом с помощью программы MONSA. *a* – Экспериментальная кривая малоуглового рассеяния от исходного Dps (1); рассеяние от белковой части мультифазной модели (2); экспериментальные данные от комплекса Dps-Fe500 (3); рассеяние от полной мультифазной модели (4). *б* – Мультифазная модель. Серые шарики обозначают белок, желтые – кластеры железа. Модель показана в разрезе для лучшей визуализации

способность Dps к детоксикации и переработке Fe^{2+} в нетоксичную Fe^{3+} -форму с последующим накоплением ионов трёхвалентного железа во внутреннем пространстве белка, т.е. также в защищённом от внешних воздействий состоянии. Обе функции Dps тесно связаны между собой [30]. В наших предыдущих работах мы исследовали закономерности образования Dps–ДНК сокристаллов, в том числе при взаимодействии с двухвалентными ионами металлов [37, 38, 50]. В данной работе мы изучали вторую особенность функциональных свойств Dps, а именно: процесс накопления ионов железа во внутренней полости этого мини-ферритина. Применяя метод аномального малоуглового рассеяния, нам удалось показать, что в основном внутри белковой молекулы формируются наночастицы с размерами 2–4 нм, т.е. рост металлических наночастиц ограничен пространственными характеристиками внутренней полости белка. Однако некоторое количество ионов железа содержится также в поверхностном слое Dps. Этот слой очень важен для выполнения белком своих защитных функций, поскольку находящиеся здесь *N*-концевые домены определяют характер взаимодействия Dps с ДНК в растворе, и именно гибкие, богатые лизином

N-концевые домены ответственны за взаимодействие с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом дезоксирибонуклеиновой кислоты [15, 22–24]. Соответственно, *N*-концевые домены белка должны быть доступны для связи с ДНК [50, 51, 53]. Однако атомы железа могут связываться с отрицательно заряженными аминокислотами Asp и Glu в тех же самых *N*-концевых областях Dps. Железо относится к переходным металлам и образует прочные комплексы, например с азотом (N), входящим в состав аминогрупп аминокислот. Поэтому двухвалентные атомы железа могут образовывать связи с соседними белковыми цепями, притягивая их друг к другу и стабилизируя поверхностные участки додекамера. В этом случае *N*-концевые домены оказываются прижатыми к поверхности белка и образование кристаллического комплекса Dps–ДНК не происходит [50, 54]. Однако присутствие в растворе хелатирующего агента, например ЭДТА, может разрушить эти связи железа с аминокислотами на поверхности додекамера, и это может стать способом восстановления взаимодействия Dps с ДНК, не затрагивая внутренних областей белка и сформированных там наночастиц. Таким образом, зарядовое состояние ионов железа в составе Dps (на поверхности

и в ядре) имеет большое значение и нуждается в глубоком изучении.

Структурные исследования с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния не позволяют определить валентное состояние железа. По определению, функция белков, подобных ферритину (в том числе Dps), состоит в окислении Fe^{2+} до трёхвалентного состояния с последующим накоплением этой нетоксичной формы в центральной полости белка. Однако имеются работы, показывающие, что механизм удаления двухвалентного железа из раствора и окисления его в соответствующих сайтах белка носит более сложный характер. Так, при использовании метода Мёссбауэровской спектроскопии для определения зарядового состояния ионов железа была показана неоднородность неорганической составляющей Dps. Оказалось, что железо в белке находится в форме магнетита $FeO \cdot Fe_2O_3$, т.е. представляет собой смесь ионов двухвалентного и трёхвалентного железа [55]. При этом авторами был сделан вывод, что именно такой состав неорганических ядер Dps способствует поддержанию додекамерной структуры белка.

В целом, процесс формирования внутри белковой полости Dps наночастиц, содержащих атомы металлов, и не только железа, но, напри-

мер, кобальта и, возможно, других, представляет определённый практический интерес. Поэтому проведённые в данной работе исследования могут быть полезными не только в плане изучения уникальных свойств Dps, но также могут быть вкладом в разработку стабилизированных в растворе биосовместимых нанокапсул, обладающих магнитными свойствами. Пластичность и структурная устойчивость белковой матрицы Dps может служить определённым гарантом возможности разработки таких технологий [56].

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-10071).

Благодарности. Авторы благодарят А. Грузинова, сотрудника Европейской лаборатории молекулярной биологии (EMBL), за проведение экспериментов по аномальному малоугловому рассеянию и ценную дискуссию.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D., and Robinson, N. J. (2009) Metalloproteins and metal sensing, *Nature*, **460**, 823-830.
2. Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G. L., and Thornton, J. M. (2008) Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **13**, 1205-1218.
3. Beinert, H., Holm, R. H., and Munck, E. (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures, *Science*, **277**, 653-659.
4. Fenton, H. J. H. (1894) Oxidation of tartaric acid in presence of iron, *J. Chem. Soc. Trans.*, **65**, 899-910.
5. Briat, J.-F. (1992) Iron assimilation and storage in prokaryotes, *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 2475-2483.
6. Andrews, S. C. (1998) Iron storage in bacteria, *Adv. Microbiol. Physiol.*, **40**, 281-351.
7. Harrison, P. M., and Arosio, P. (1996) The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1275**, 161-203.
8. Theil, E. C. (1987) Ferritin, structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms, *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 289-315.
9. Levi, S., Salfeld, J., Franceschinelli, F., Cozzi, A., Dorner, M. H., et al. (1989) Expression and structural and functional properties of human ferritin L-chain from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **28**, 5179-5184.
10. Hudson, A. J., Andrews, S. C., Hawkins, C., Williams, J. M., Izuhara, M., et al. (1993) Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin, *Eur. J. Biochem.*, **218**, 985-995.
11. Andrews, S. C., Smith, J. M. A., Guest, J. R., and Harrison, P. M. (1990) Genetic and structural characterization of the bacterioferritin of *Escherichia coli*, *Biochem. Soc. Trans.*, **18**, 658-659.
12. Cheesman, M. R., Le Brun, N. E., Kadir, F. H. A., Thomson, A. J., Moore, G. R., et al. (1993) Haem and non-haem iron sites in *Escherichia coli* bacterioferritin: Spectroscopic and model building studies, *Biochem. J.*, **292**, 47-56.
13. Chasteen, N. D. (1998) Ferritin. Uptake, storage, and release of iron, *Met. Ions Biol. Syst.*, **35**, 479-514.
14. Romao, C. V., Louro, R., Timkovich, R., Lëubben, M., Liu, M.-Y., et al. (2000) Iron-coproporphyrin III is a natural cofactor in bacterioferritin from the anaerobic bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*, *FEBS Lett.*, **480**, 213-216.
15. Almiron, M., Link, A. J., Furlong, D., and Kolter, R. (1992) A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*, *Genes Dev.*, **6**, 2646-2654.
16. Nair, S., and Finkel, S. E. (2004) Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase, *J. Bacteriol.*, **186**, 4192-4198.
17. Frenkiel-Krispin, D., and Minsky, A. (2006) Nucleoid organization and the maintenance of DNA integrity in *E. coli*, *B. subtilis* and *D. radiodurans*, *J. Struct. Biol.*, **156**, 311-319.
18. Frenkiel-Krispin, D., Ben-Avraham, I., Englander, J., Shimoni, E., Wolf, S. G., et al. (2004) Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria, *Mol. Microbiol.*, **51**, 395-405.
19. Reich, Z., Wachtel, E. J., and Minsky, A. (1994) Liquid-crystalline mesophases of plasmid DNA in bacteria, *Science*, **264**, 1460-1463.
20. Wolf, S. G., Frenkiel, D., Arad, T., Finkel, S. E., Kolter, R., et al. (1999) DNA protection by biocrystallization, *Nature*, **400**, 83-85.

21. Stephani, K., Weichart, D., and Hengge, R. (2003) Dynamic control of Dps protein levels by ClpXP and ClpAP proteases in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **49**, 1605-1614.
22. Azam, T. A., and Ishihama, A. (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **274**, 33105-33113.
23. Azam, T. A., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., and Ishihama, A. (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid, *J. Bacteriol.*, **181**, 6361-6370.
24. Ceci, P., Cellai, S., Falvo, E., Rivetti, C., Rossi, G. L., et al. (2004) DNA condensation and self-aggregation of *Escherichia coli* Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5935-5944.
25. Gupta, S., and Chatterji, D. (2003) Bimodal protection of DNA by *Mycobacterium smegmatis* DNA-binding protein from stationary phase cells, *J. Biol. Chem.*, **278**, 5235-5241.
26. Grant, R. A., Filman, D. J., Finkel, S. E., Kolter, R., and Hogle, J. M. (1998) The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA, *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 294-303.
27. Zhao, G., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T. M., et al. (2002) Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 27689-27696.
28. Ilari, A., Ceci, P., Ferrari, D., Rossi, G. L., and Chiancone, E. (2002) Iron incorporation into *Escherichia coli* Dps gives rise to a ferritin-like microcrystalline core, *J. Biol. Chem.*, **277**, 37619-37623.
29. Ilari, A., Stefanini, S., Chiancone, E., and Tsernoglou, D. (2000) The dodecameric ferritin from *Listeria innocua* contains a novel intersubunit iron-binding site, *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 38-43.
30. Nguyen, K. H., and Grove, A. (2012) Metal binding at the *Deinococcus radiodurans* Dps-1N-terminal metal site controls dodecameric assembly and DNA binding, *Biochemistry*, **51**, 6679-6689.
31. Smith, J. L. (2004) The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria, *Crit. Rev. Microbiol.*, **30**, 173-185.
32. Feigin, L. A., and Svergun, D. I. (1987) *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*, Plenum Press, New York.
33. Stuhmann, H. B. (1980) Anomalous dispersion of small-angle scattering of horse-spleen ferritin at the Iron K absorption edge, *Acta Crystallogr. A*, **36**, 996-1001.
34. Stuhmann, H. B., and Notbohm, H. (1981) Configuration of the four iron atoms in dissolved human hemoglobin as studied by anomalous dispersion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6216-6220.
35. Stuhmann, H. B. (1985) Resonant scattering in macromolecular structure research, *Adv. Polym. Sci.*, **67**, 123-163.
36. Stuhmann, H. B., Goerigk, G., and Munk, B. (1994) *Anomalous X-ray Scattering*, Elsevier, Amsterdam.
37. Dadinova, L. A., Chesnokov, Y. M., Kamyshinsky, R. A., Orlov, I. A., Petoukhov, M. V., et al. (2019) Protective Dps-DNA co-crystallization in stressed cells: An *in vitro* structural study by small-angle X-ray scattering and cryo-electron tomography, *FEBS Lett.*, **593**, 1360-1371.
38. Kamyshinsky, R., Chesnokov, Y., Dadinova, L., Mozhaev, A., Orlov, I., et al. (2020) Polymorphic protective Dps-DNA co-crystals by cryo electron tomography and small angle X-ray scattering, *Biomolecules*, **10**, 39.
39. Grimsley, G. R., and Pace, C. N. (2004) Spectrophotometric determination of protein concentration, *Curr. Protoc. Protein Sci.*, **3**, doi: 10.1002/0471140864.ps0301s33.
40. Blanchet, C. E., Spilotros, A., Schwemmer, F., Graewert, M. A., Kikhney, A., et al. (2015) Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY), *J. Appl. Crystallogr.*, **48**, 431-443.
41. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., and Svergun, D. I. (2003) PRIMUS: A Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Cryst.*, **36**, 1277-1282.
42. Manalastas-Cantos, K., Konarev, P. V., Hajizadeh, N. R., Kikhney, A. G., Petoukhov, M. V., et al. (2021) ATSAS 3.0: Expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Cryst.*, **54**, 343-355.
43. Hajizadeh, N. R., Franke, D., Jeffries, C. M., and Svergun, D. I. (2018) Consensus Bayesian assessment of protein molecular mass from solution X-ray scattering data, *Sci. Rep.*, **8**, 7204.
44. Porod, G. (1982) *Small Angle X-Ray Scattering*, Academic Press, London.
45. Franke, D., Petoukhov, M. V., Konarev, P. V., Panjkovich, A., Tuukkanen, A., et al. (2017) ATSAS 2.8: A comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions, *J. Appl. Cryst.*, **50**, 1212-1225.
46. Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria, *J. Appl. Cryst.*, **25**, 495-503.
47. Svergun, D. I. (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing, *Biophys. J.*, **76**, 2879-2886.
48. Svergun, D., Barberato, C., and Koch, M. H. J. (1995) CRY SOL — a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Cryst.*, **28**, 768-773.
49. Gruzinov, A. Y., Schroer, M. A., Manalastas-Cantos, K., Kikhney, A. G., Hajizadeh, N. R., et al. (2021) Anomalous SAXS at P12 beamline EMBL Hamburg: Instrumentation and applications, *J. Synch. Rad.*, **28**, 812-823.
50. Сошинская Е. Ю., Дудинова Л. А., Можяев А. А., Штыкова Э. В. (2020) Влияние состава буфера на конформационную подвижность N-концевых фрагментов Dps и характер взаимодействия с ДНК. Исследование методом малоуглового рентгеновского рассеяния, *Кристаллография*, **65**, 886-895.
51. Dubrovin, E. V., Dadinova, L. A., Petoukhov, M. V., Soshinskaya, E. Yu., Mozhaev, A. A., et al. (2021) Spatial organization of Dps and DNA-Dps complexes, *J. Mol. Biol.*, **433**, 166930.
52. Minato, T., Teramoto, T., Kakuta, Y., Ogo, S., and Yoon, K. S. (2020) Biochemical and structural characterization of a thermostable Dps protein with His-type ferroxidase centers and outer metal-binding sites, *FEBS Open Bio*, **10**, 1219-1229.
53. Harms, A., Maisonneuve, E., and Gerdes, K. (2016) Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure, *Science*, **354**, aaf4268.
54. Dadinova, L., Kamyshinsky, R., Chesnokov, Yu., Mozhaev, A., Matveev, V., et al. (2021) Structural rearrangement of Dps-DNA complex caused by divalent Mg and Fe cations, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6056.
55. Antipov, S., Turishchev, S., Purtov, Yu., Shvyreva, U., Sinelnikov, A., et al. (2017) The oligomeric form of the *Escherichia coli* Dps protein depends on the availability of iron ions, *Molecules*, **22**, 1904.
56. Zeth, K., Sancho-Vaello, E., and Okuda, M. (2019) Metal positions and translocation pathways of the dodecameric ferritin-like protein Dps, *Inorg. Chem.*, **58**, 11351-11363.

**FORMATION OF IRON OXIDE NANOPARTICLES
IN INTERNAL CAVITY OF FERRITIN-LIKE Dps PROTEIN.
INVESTIGATION WITH ANOMALOUS DISPERSION OF X-RAYS**

E. V. Shtykova^{1*}, M. V. Petoukhov^{1,2}, and A. A. Mozhaev^{1,3,4,5}

¹ *Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics", Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russia; e-mail: shtykova@ns.crys.ras.ru*

² *Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia*

³ *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia*

⁴ *Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow, Russia*

⁵ *National Research University Higher School of Economics, 101000 Moscow, Russia*

DNA-binding protein of starvation (Dps) plays a special role among dodecamer miniferritins. Its most important function is to protect the bacterial genome from various types of destructive external influences by means of *in cellulo* Dps-DNA co-crystallization. The consequence of such a protective reaction is the emergence of bacterial resistance to antibiotics and other drugs. Therefore, great attention is paid to the study of the genome-protective properties of Dps. However, the other side of Dps functionality is equally important. Being ferritin-like, this protein acts as an iron storage depot and protects bacterial cells from oxidative damage initiated by its excess. The study of this phenomenon is also very relevant, and this work is devoted to the study of the formation of iron oxide nanoparticles in the internal cavity of the Dps dodecamer. The method of anomalous small-angle scattering was chosen as the main research method, which makes it possible to study the structure of metal-containing biological macromolecules and determine the size distribution of metal nanoparticles formed in them. The contributions of the protein and metal components to the total scattering are separated by varying the energy of the incident X-ray radiation near the edge of the absorption band by metal atoms, in this case the *K*-absorption band of iron. Dps samples containing 50, 500, and 2000 iron atoms per protein dodecamer were examined. An analysis of the obtained size distributions showed that, depending on the iron content in the solution, nanoparticles with sizes of 2–4 nm are formed inside the protein molecule, and the growth of metal nanoparticles is limited by the size of the central cavity of the protein. It was also shown that some amount of iron ions is contained in the surface layer of Dps. This layer is very important for the protein to perform its protective functions, since the N-terminal domains located here determine the nature of the interaction between Dps and DNA. In general, the results obtained in this work can be useful as the next step in the study of the Dps phenomenon, as well as from a practical point of view, in the creation of biocompatible and solution-stabilized metal nanoparticles.

Keywords: ferritin-like proteins, Dps, iron oxide, anomalous SAXS, size distribution

ПОЛИЭКСТРЕМОФИЛЬНЫЕ ЭУКАРИОТЫ CYANIDIALES

Обзор

© 2022 И.Н. Стадничук^{1*}, И.В. Тропин²

¹ Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, 127726 Москва, Россия; электронная почта: stadnichuk@mail.ru

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

Поступила в редакцию 29.12.2021

После доработки 28.03.2022

Принята к публикации 24.04.2022

Красные микроводоросли Cyanidiales благодаря полиэкстремофилии, считавшейся невозможной для эукариот, получили название «водорослей-загадок». Cyanidiales обитают преимущественно в геотермальных серных источниках с рН 0–4, температурами до 56 °С, в присутствии растворенных тяжелых металлов, сочетая эукариотное строение клеток с особенностями, присущими лишь экстремофильным видам прокариот. Благодаря исключительности свойств и минимальным для эукариот размерам генома Cyanidiales стали одним из важнейших объектов исследований в клеточной физиологии, биохимии, молекулярной биологии, филогеномике и эволюционной биологии. Они играют важную роль в исследовании многих сторон оксигенного фотосинтеза и вопросов его происхождения. Свойства полиэкстремофилии и соответствующие пути метаболизма были унаследованы Cyanidiales от архей и бактерий с помощью горизонтального переноса генов. Тем самым была открыта возможность передачи генов от прокариот к эукариотам, что стало новым этапом в понимании становления эукариотной организации клетки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: термоацидофилия, микроводоросли, Cyanidiales, *Cyanidium caldarium*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Galdieria sulphuraria*.

DOI: 10.31857/S0320972522050050, **EDN:** ATHDHC

Посвящается памяти О.Ю. Сенцовой

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли Cyanidiales являются высокоспецифичной группой эукариотных фотосинтетиков в составе отдела Rhodophyta. Основные представители группы обитают в геотермальных серных источниках, ранее считавшихся недоступными для эукариот, и являются полиэкстремофилами, растущими при крайне низких значениях рН (0–4) и высокой температуре, вплоть до 56 °С, в присутствии токсичных ионов тяжелых металлов. Способность существовать при сочетании подобных условий известна лишь для ряда архей и бактерий, но не описана для каких-либо иных эукариотных организмов. Кроме того, виды, принадлежащие роду *Galdieria* в составе порядка Cyanidiales, способны наряду с автотрофией к гетеротрофному росту с использованием десятков органических субстратов, что

также не встречается у других оксигенных фотосинтетиков. Длительное время Cyanidiales служили лишь объектами исследований в области альгологии и экофизиологии [1]. К началу 90-х годов прошлого века было открыто несколько новых представителей этой группы, в чем немалую роль сыграли работы О.Ю. Сенцовой, расширившие видовой состав и биогеографию вулканических зон обитания этих уникальных микроорганизмов [2, 3]. Начавшиеся затем генетические, биохимические и молекулярно-биологические исследования Cyanidiales и иных красных водорослей пролили свет на ранние этапы происхождения оксигенного фотосинтеза, включая эндосимбиотическое происхождение хлоропластов и формирование супергруппы архепластид – красных, зеленых и глаукофитовых водорослей, имеющих двумембранные хлоропласты [4]. Изучение архепластид позволяет проследить последующее распространение оксигенного фотосинтеза среди остальных водорослевых фил и наземных растений. Секвенирование геномов у ряда видов Cyanidiales и других

Принятые сокращения: ГПГ – горизонтальный перенос генов.

* Адресат для корреспонденции.

красных водорослей показало, что их эволюция сопровождалась утратой значительной доли генов, присутствовавших у общего фотосинтезирующего эукариотного предка [5]. Оказалось, что эволюционный прогресс может быть связан не только с увеличением разнообразия генов, но и с их элиминацией, ведущей к сокращению энергозатрат клетки на содержание генетического аппарата [4, 5]. Филогенный анализ в сопоставлении с исследованием метаболических путей за последние годы позволили установить, что устойчивость к жестким стрессовым условиям унаследована представителями Cyanidiales от экстремофильных прокариот, благодаря чему был открыт горизонтальный перенос генов (ГПГ) между про- и эукариотами, известный ранее только для коэволюции архей и бактерий [5]. Эти полиэкстремофилы можно культивировать как в лабораторных условиях, так и в открытых водоемах, где любые иные микроводоросли подвергаются риску бактериального заражения. В настоящее время изучение видов, принадлежащих к Cyanidiales, с полностью секвенированными геномами является междисциплинарной областью биологии, имеющей прекрасные биотехнологические перспективы и позволяющей очертить адаптационные границы, в которых способны существовать эукариоты [6].

ИСТОРИЯ, СИСТЕМАТИКА, БИОГЕОГРАФИЯ

Микроорганизм синеватой окраски с неясной систематической принадлежностью был обнаружен в кислых термальных источниках Италии в первой половине XIX века (см. работу [7] и ссылки в ней). После уточнения особенностей морфологии и ряда переименований вид был в итоге идентифицирован как красная микроводоросль и получил название *Cyanidium caldarium* (см. [8] и ссылки). Многие годы *C. caldarium* считался уникальным видом, пока в 1981 г., также в Италии, не была найдена морфологически сходная с *C. caldarium* геотермальная микроводоросль *Galdieria sulphuraria* [9], а несколькими годами ранее — еще один представитель этой группы, *Cyanidioschyzon merolae* [10]. В начале 90-х годов О.Ю. Сенцовой [2, 3] род *Galdieria* был пополнен сразу тремя новыми видами: *G. partita*, *G. daedala* и *G. maxima*, найденными на Камчатке и Курильских островах. В дальнейшем эти фотосинтетики были обнаружены в гейзерах, фумаролах, серных источниках, сольфатарных участках и в сопровождающих горячие источники грязевых альго-бактериальных матах в различных районах Тихоокеанского вулканического ог-

ненного кольца (рис. 1). В Европе термоацидофилы, кроме Италии, были найдены в Исландии и на Азорских островах ([1, 6, 7] и рис. 1).

Эндолитные мезофильные разновидности *Galdieria* были найдены в разломах и расселинах скал, в порах рыхлых каменистых пород и в фотической зоне пещер, где они защищены от высухания, перепадов температуры и действия ультрафиолета. Клетки водорослей образуют налеты-пленки, имеющие цвет от сине-зеленого до почти черного там, где возникает кислая среда обитания. Разновидности *Galdieria*, морфологически сходные с *G. sulphuraria*, обнаружены также при слабокислых и нейтральных pH (5–7) в карстовых пещерах Чили, Израиля, Турции и Франции [1, 6]. Еще один вид *Galdieria*, названный *Galdieria phlegrea*, найден в кислой, но не термальной среде обитания [1], а нахождение *Galdieria* в разогреваемых отвалах добычи каменного угля означает появление приспособленности к антропогенному ландшафту [11]. Классификация большого количества эндолитных штаммов остается неопределенной. Среди Cyanidiales имеются виды-космополиты (*G. maxima*, *G. partita*, *G. sulphuraria* и *C. caldarium*) и эндемики ряда районов. Филогенные данные свидетельствуют, что наиболее ранними по происхождению стали не мезофилы, а геотермальные виды Cyanidiales, причем первой возникшей подгруппой этих микроводорослей является род *Galdieria* [7].

В настоящее время общепризнанными являются семь видов Cyanidiales: *Cyanidioschyzon merolae* De Luca, *Cyanidium caldarium* Geitler, *Galdieria sulphuraria* Merola, *Galdieria maxima* Sentsova, *Galdieria partita* Sentsova, *Galdieria daedala* Sentsova и *Galdieria phlegrea* Pinto [7, 11]. В отделе красных водорослей, или Rhodophyta, они образуют филу Cyanidiophytina, класс Cyanidiophyceae, порядок Cyanidiales и два семейства: Cyanidiaceae с родами *Cyanidium* (1 вид) и *Cyanidioschyzon* (1 вид) и Galdieraceae с одним родом *Galdieria*, содержащим 5 видов. В 2020 г. найден еще один вид, принадлежащий к Cyanidiales, для которого предложено название *Cyanidiococcus yangmingshanensis* [12]. По размеру клеток и ряду других морфологических признаков этот вид наиболее близок к *C. merolae* [12].

ЭВОЛЮЦИОННОЕ ПРОИСХОЖДЕНИЕ

Родоначальниками кислородного фотосинтеза являются, как известно, возникшие 2,6–2,5 млрд лет назад цианобактерии. Около 1,9 млрд лет тому назад в результате эндосимбионтного поглощения цианобактерии, родствен-



Рис. 1. Геотермальные области обнаружения Cyanidiales (обозначены кружками по данным обзорных вулканологических карт)

ной нынешнему примитивному роду *Gloeomargarita* [11], неким эукариотным гетеротрофом сформировались хлоропласты и возник общий автотрофный эукариотный предок [10, 11]. Этот несохранившийся предковый ствол фотосинтетиков, не получивший определенного названия (возможное — Protoarchaeplastida), подвергся одновременной дивергенции на три эукариотные ветви (см. [11, 12] и ссылки). Согласно филогеномным данным, сначала, 1,7 млрд лет тому назад, от единого ствола отделились глаукофиты (синяя ветвь), спустя 100–200 млн лет от оставшегося общим для красных и зеленых водорослей предка возникли одноклеточные багрянки (красная ветвь) и, наконец, 1,1 млрд лет назад появились зеленые водоросли [11]. Три группы эукариот, названных архепластидами, имеют хлоропласты с двойной мембраной и вместе с цианобактериями сохраняются по настоящее время (рис. 2). В ходе последовавших событий вторичного и третичного эндосимбиоза зеленые и красные микроводоросли (но не Cyanidiales) дали начало водорослям с четырехмембранным и редуцированными трехмембранными хлоропластами, в результате чего появились новые водорослевые филы [13]. Высшие растения унаследовали от зеленых водорослей архепластидный тип хлоропластов [14].

В совокупности с тремя архепластидными таксонами в альгологической систематике насчитывается около 10 наиболее крупных водорослевых отделов. Среди них — отдел красные водоросли (багрянки, Rhodophyta) образован семью классами одно- и многоклеточных, в основном морских водорослей [15]. Cyanidiales образуют монофилетическую группу, отделившуюся 1,4 млрд лет назад от остальных красных водорослей. Поэтому наряду с глаукофитами Cyanidiales являются наиболее древними эукариотами-фотосинтетиками. Экстремофилия и раннее обособление стали причинами их отличия от других Rhodophyta [15].

ЦИТОЛОГИЯ И КАРИОЛОГИЯ

Клетки Cyanidiales имеют характерный синне-зеленый цвет и иногда могут быть собраны в гомогенный слизистый матрикс. В клетках присутствуют микротельца, есть один беспиреноидный стенкоположный хлоропласт с параллельно идущими тилакоидами. Митохондрия единственная, обычно вогнутой формы; толщина клеточной стенки не менее 40 нм, но у *S. merolae* стенка не сформирована. У всех, кроме *Galdieria*, отсутствует вакуоля. Общим свой-

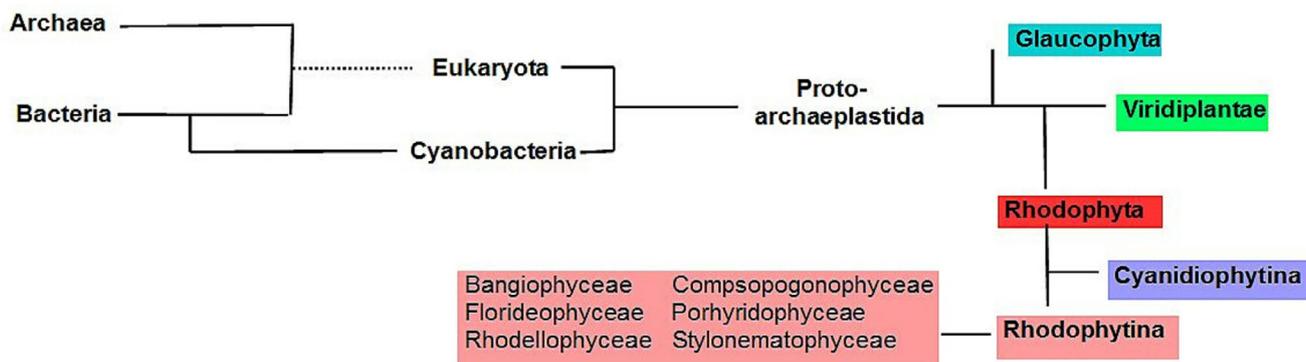


Рис. 2. Происхождение трех фил архепластидных фотосинтетиков (Glaucophyta, Viridiplantae и Rhodophyta). Длина отрезков, последовательно (слева направо) соединяющих группы организмов, условно пропорциональна срокам их появления. Фила Rhodophyta [15] состоит из рано обособившейся субфилы Cyanidiophytina (один класс Cyanidiophyceae с одним порядком Cyanidiales) и субфилы Rhodophytina, содержащей группы Bangiophyceae, Compsopogonophyceae, Florideophyceae, Porphyridiophyceae, Rhodellophyceae, Stylonematophyceae

ством является использование аммония в качестве источника минерального азота.

Клетки *C. caldarium* и видов рода *Galdieria* обладают округлой формой. Их обычные размеры составляют 2–5 мкм. Самыми крупными являются клетки *G. maxima* (штамм IPPAS-P507), диаметр которых равен 4,0–16,5 мкм [2, 3]. *C. merolae* отличается от других водорослей наименьшими размерами ($\leq 1,5$ –2,0 мкм) и овально-грушевидной формой клеток [16]. Размножение Cyanidiales бесполое, с помощью округлых или тетраэдрических эндоспор. Как правило, образуются 4 эндоспоры, но возможно уменьшение их числа до 2 или увеличение до 8 и даже до 32. У *C. merolae* размножение, при отсутствии клеточной стенки, происходит перетяжкой клетки надвое, но в геноме сохраняются гены белков, обслуживающих мейотическое деление [16, 17].

C. caldarium и *G. sulphuraria* нередко обитают совместно и морфологически очень сходны. Многие годы их наиболее ясным различием служила возможность гетеротрофии у *G. sulphuraria*. Определение хромосомных чисел вносит ясность в альгологическую систематику, особенно в случае подобных затруднений [18]. Водоросли семейства Galdieraceae (*G. sulphuraria*, *G. partita* и *G. maxima*) имеют минимальный для эукариот набор из двух хромосом, в то время как в ядре *C. caldarium* хромосомы меньше по размерам и их насчитывается пять, или, возможно, семь [19]. Для *C. merolae* разрешение хромосомных изображений в микроскопических препаратах оказалось недостаточным. Геномные исследования позволили установить, что ядро клеток *C. merolae* содержит 20 хромосом [20], чьи изображения в световом микроскопе накладываются друг на друга. Таким образом, все роды Cyanidiales имеют достоверные кариологические различия.

ОСОБЕННОСТИ ГЕНОМА

Особенности генома Cyanidiales определяются историей происхождения Rhodophyta, ранним отделением ветви Cyanidiales от основного эволюционного ствола красных водорослей, горизонтальным переносом генов (ГПГ) от прокариот, обуславливающим экстремофилию, и микроэволюцией видов внутри группы. Геномные проекты осуществлены для *C. merolae* и *G. sulphuraria*.

Транскриптомные и геномные данные для представителей 14 родов красных водорослей показали, что их клетки содержат не более 10 000 генов. Становление багрянок сопровождалось сокращением примерно 25% генома, который имелся у их общего с зелеными водорослями эукариотного предка [20, 21]. Были утрачены гены жгутиков, базальных телец, фитохромной системы, уреазы (гидролиз мочевины), специфичного для растений миозина, гены регуляции автофагии, часть генов сократительных белков цитокinesis и гены контактных белков плазмалеммы и мембранных ферментов [20, 21]. Альгологическая обособленность красных водорослей, включая Cyanidiales, проявляется также в общем с грибами кинурениновом, но не аспартатном пути катаболизма триптофана с его участием в *de novo* биосинтезе NAD^+ [22].

Дальнейшее сокращение генома произошло при отхождении ветви Cyanidiales от общего ствола красных водорослей. У Cyanidiales отсутствуют мейоз и часть связанных с мейозом генов. По сравнению с другими фотосинтетиками понижена доля генов, регулирующих образование вторичных метаболитов. У *C. merolae* утрачены гены клеточной стенки и гены транспорта многих углеводов. Ядерный геном содержит

5331 ген, в том числе 4474 белок-кодирующих генов, и является наименьшим из всех известных у фотосинтезирующих эукариот [20]. Гены имеют малое число повторов и минимум интронов (26 на весь геном), а удобство генетических трансформаций делает *C. merolae* модельным объектом геномики [6, 23].

В секвенированном геноме *G. sulphuraria* найдено 6623 гена. Сохраняются интроны и альтернативный сплайсинг, что необходимо для сложного аппарата построения клеточной стенки, а также транспорта и усвоения десятков органических субстратов при гетеротрофном и миксотрофном росте, возможном для *Galdieria* [21]. Появляющиеся адаптационные возможности, обеспечиваемые более широким набором генов и интронами [24], могут превалировать над выигрышем от сокращения энергозатрат на содержание генома, как в случае *G. sulphuraria*, либо отступить на второй план перед экономией энергорасходов клетки, как у *C. merolae*. Не менее 30% генов *G. sulphuraria* не имеют ортологов в геноме *C. merolae* и наоборот, что указывает, согласно известному принципу конкурентного исключения, на занятие двумя видами различных микрониз в термально-ацидофильных биотопах.

Согласно филогеномному анализу, Cyanidiales благодаря ГПГ приобрели 5% своих белок-кодирующих генов от архей и бактерий. У *G. sulphuraria* идентифицировано по крайней мере 75 заимствований генов от экстремофильных прокариот [25]. От архей получены АТФазы, связанные с толерантностью клеток к повышенным температурам [20, 25], и гены биометилирования мышьяковистых производных [26]. Среди трансмембранных транспортных протеинов в плазмалемме преобладают белки, полученные благодаря ГПГ. Многочисленные сахаракиназы *G. sulphuraria* проявляют большее сходство с ферментами прокариот, чем с белками растений [27]. О некоторых белках, например, ферментах пути синтеза сахарозы у *G. sulphuraria*, нельзя сказать с определенностью, получены ли они с помощью ГПГ или унаследованы напрямую от общего предка зеленых и красных водорослей [20, 22, 25]. В совокупности белки, приобретенные с помощью ГПГ, необходимы для выработки устойчивости к температуре, тяжелым металлам, ацидофилии и для усвоения разнообразной органики. ГПГ-гены могут приобретаться не только *de novo* из-за их отсутствия у эукариот, но и для замены уже имевшихся на более успешные в условиях экстремофилии.

Пластом и митохондриальным геном у Cyanidiales, как и у всех фотосинтетиков, харак-

теризуются эндоплазматической передачей генов в клеточное ядро. Пластомы *G. sulphuraria* и *C. merolae* сокращаются соответственно до 207 и 158 белок-кодирующих генов, которые имеют большое число межгенных петель. Отмечена компактность пластома *C. merolae* с перекрытием 40% имеющихся генов. В пластомае найден ген субъединицы сульфатного транспортера, что, очевидно, коррелирует с обитанием этого организма в серных источниках. Набор митохондриальных генов, а именно, 18 у *G. sulphuraria* и 34 у *C. merolae*, является еще меньшим, и кольцевые геномы, как и в родопластах, не содержат интронов. В целом влияние экстремофилии на геномы органелл исследовано еще недостаточно (см. [28] и ссылки).

ТЕРМОФИЛИЯ

Верхняя температурная граница роста Cyanidiales находится на 50–56 °С, что является недостижимым пределом для иных микроводорослей (см. [29] и ссылки). У других эукариотных термофилов (немногие простейшие и грибы) лимит может находиться выше, в области 62–63 °С. Способность жить при температурах выше 80 °С считается гипертермофилией, возможной для архей и бактерий (рис. 3, а). Следует упомянуть, что максимальная температура роста, равная 122 °С, зафиксирована для метаногенной археи *Methanopyrus kandleri* [29].

Общим свойством термофилов является появление в цитоплазме протекторных соединений, например полиаминов. Также показано уменьшение числа двойных связей в составе жирных кислот и увеличение гидрофобности белков. В составе ДНК отмечается рост доли гуанина и цитозина, пара оснований которых более стабильна, чем пара аденин-урацил, и возрастание гидрофобности белков [29, 30].

Наиболее исследованным в этом плане у Cyanidiales является фотосинтетический белок С-фикоцианин, в молекуле которого дополнительные солевые мостики ведут к повышению температуры денатурации до 83 °С, что заведомо выше, чем для С-фикоцианина мезофилов [30, 31]. Показано, что у *G. phlegrea* переход от автотрофного к гетеротрофному типу питания ведет к увеличению термостабильности клеток [32]. В автотрофных клетках содержание С-фикоцианина снижается при подъеме температуры выше 30 °С, а гетеротрофные клетки, наоборот, имеют максимальное количество С-фикоцианина при 40–50 °С [32].

С понижением температуры до 40 °С при увеличении поверхности растекающихся сер-

ных источников Cyanidiales могут вытесняться умеренно термофильными и мезофильными, например, зелеными, микроводорослями [33]. При температуре 25–28 °С у *G. sulphuraria* и *C. merolae* падает активность фотосинтеза, расходуются запасы крахмала и изменяется экспрессия ядерных генов [34, 35]. Таким образом, обычный для мезофилов температурный режим вызывает у термофилов холодovou стресс. Сведения о проявлениях термофилии у клеток Cyanidiales остаются во многом феноменологическими.

АЦИДОФИЛИЯ

Высокая кислотность водных источников в зонах вулканической активности вызвана геохимическим образованием серной кислоты при атмосферном окислении выделяемого из кальдер гидротермального сероводорода, а также деятельностью серобактерий. Уровень кислотности в 0,1–1,0 ед. рН является границей для существующей земной жизни [33]. Ацидофилы, живущие при рН 1,0, хорошо известны и представлены хемолитотрофными и органотрофными археями и бактериями, но в местах своего обитания Cyanidiales являются доминирующими видами при рН $\geq 2,5$. У эукариот ацидофилы, наряду с Cyanidiales, встречаются среди одноклеточных грибов, а также у эвгленовых, диатомовых, золотистых и зеленых нитчатых водорослей (рис. 3, б). От Cyanidiales другие микроводоросли-ацидофилы отличаются более разно-

образной экологией и более низкими температурами, например, в случае обитания в сфагновых болотах. Цианобактерии, имеющие сходный с Cyanidiales фотосинтетический аппарат, не способны выживать при рН ниже 4. Различие, вероятно, связано с появлением предковых цианобактерий в ходе эволюции в щелочных водоемах. С другой стороны, среди Cyanidiales нет алкалофильных видов, обычных среди цианобактерий.

Функционирование макромолекул, особенно белков, подразумевает нейтральные величины рН внутри клетки. При кислых рН ферменты теряют активность, а хлорофилл в тилакоидах превращается в феофитин. Внутриклеточный рН у Cyanidiales, как и у других ацидофилов, равен 6,6–6,7 [36]. При рН среды обитания 1–4 это означает, что концентрация протонов внутри и снаружи клетки различается в 10^3 – 10^6 раз; таким образом, способность клеток к ацидофилии связана с поддержанием градиента протонов на плазмалемме [37]. Роль клеточной стенки как протонного барьера из-за наличия в ней водных пор вторична в качестве протонного барьера по отношению к плазмалемме, т.к. клетки *C. merolae* и подвижных ацидофилов у ряда других групп водорослей вообще не имеют стенки.

Имеющийся градиент концентрации создает постоянную диффузию протонов внутрь клетки, несмотря на то что число белковых каналов плазмалеммы, которые позволяли бы протонам проникать внутрь, минимизируется [25]. Нейтральность рН в клетках Cyanidiales обеспечива-



Рис. 3. Верхние пределы температуры (а) и нижние пределы кислотности (б), при которых возможен рост микроорганизмов и нитчатых водорослей ([29, 33] и ссылки в них)

ется активным обратным транспортом H^+ во внешнюю среду протонной мембранной помпой, что сопровождается удалением анионов с помощью АТРазы Р-типа, работа которой регулируется на уровне транскрипции [37]. Действие помпы дополняется связыванием проникающих протонов в буферной системе клетки и обменом протонов цитоплазмы на K^+ и Na^+ проточной вакуоли [37, 38]. Буферная емкость протоплазмы и изоляция внутри вакуоли играют меньшую роль в сравнении с обратным мембранным транспортом. Согласно расчетам, на работу протонной АТРазы из-за активной диффузии протонов внутрь клетки расходуется до 50% всей клеточной АТР [37]. При этом положительный потенциал +10 мВ на плазмалемме, создаваемый выкачиваемыми протонами, служит препятствием для проникания внутрь катионов металлов [39].

УСТОЙЧИВОСТЬ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ

Условия в районах вулканической активности губительны для большинства организмов. Низкие значения рН геотермальных вод способствуют растворению горных пород и переводу металлов из минеральной кристаллической и гидратированной формы в ионную, наиболее токсичную. As, Cd, Cr, Hg, Pb как элементы, не участвующие в метаболизме, инактивируют белки, соединяясь с сульфгидрильными группами аминокислотных остатков, а также способствуют перекисному окислению липидов и образованию активных форм кислорода (АФК), участвующих в цикле Габера–Вейса, реакции Фентона, окисления пула глутатиона и др. В ответ в клетке активируется система антиоксидантной защиты, в результате чего ионы металлов связываются с хелатирующими агентами (фитохелатины, металлотионеины) и изолируются в вакуолях или удаляются наружу в виде металлоорганических производных цитратов, малатов и полифосфатов [40].

Cu, Fe, Mn необходимы при фотосинтезе; гемовое и негемовое железо входит в состав многих белков; соединения Zn, Mo, Co и Ni в малых количествах также нужны клеткам, но с увеличением концентрации становятся токсичными. Устойчивость к металлам у клеток *C. caldarium* уменьшается в ряду $Al > Cu > Cr > Mn > Ni > Zn > Cd$ [41].

Избыточное железо в клетках *Galdieria* депонируется в виде фосфатов, образующих в цитоплазме электронноплотные тельца размером 100–200 нм; формирование полифосфатов показано также для Al (III) и Mn (II) [41]. Инактивация

ртути происходит благодаря биосинтезу дисульфидов. Клетки *Galdieria*, образуя β -HgS, могут связать до 1000 ppb ртути, что в 20 раз превышает уровень растворенного металла в вулканических источниках. Hg-редуктаза, ген которой был получен от протеобактерий, переводит ионы Hg^{2+} в менее токсичную металлическую ртуть. Образование нерастворимых сульфидов отмечено также для Cd в клетках *C. merolae* [42, 43] при извлечении серы из цистеина под действием десульфогидразы. Мышьяк в клетках *C. merolae* переводится в малотоксичную биометильную форму благодаря метилтрансферазам (ArsM). Кроме того, найдены два гена управляемой мембранной мышьяковой помпы ArsB, ведущие происхождение от термоацидофильных бактерий [26]. Cyanidiales способны расти в присутствии 200 мМ алюминия [44]. Анализ генома *G. sulphuraria* показал [25], что в плазмалемме должны находиться ионные каналы, обеспечивающие селективный транспорт необходимых клетке катионов (рис. 4), благодаря чему Cyanidiales в своих местах обитания участвуют в биогеохимических циклах металлов.

УСВОЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА

Фиксация молекул углекислого газа у Cyanidiales, как у большинства фотосинтетиков, происходит по C_3 -пути с помощью рибулозобисфосфаткарбоксилазы (РБФК) [45]. При рН 1–4 буферное равновесие $CO_2 \leftrightarrow HCO_3^- \leftrightarrow CO_3^{2-}$ в серных источниках полностью смещено в сторону CO_2 , но из-за повышенной температуры растворимость углекислоты является очень низкой. Тем не менее выраженное сродство к липидам ускоряет диффузию растворенного CO_2 сквозь клеточную мембрану. Вероятно, поэтому аквалицеропорины плазмалеммы и резус-протеин Rh1 пластидных мембран, которые облегчают проникание CO_2 сквозь липидный барьер у растений, у *C. merolae* не обнаружены [46].

Уровень CO_2 в воздухе составляет 0,04%, что у многих фотосинтетиков оказывается недостаточным для карбоксилазной активности РБФК как ключевого фермента цикла Кальвина, возникшего в обогащенном углекислым газом ранней биосфере. CO_2 -Концентрирующий механизм (ССМ) с помощью карбоангидразы позволяет вовлекать в усвоение углерода ионы HCO_3^- благодаря их диссоциации на OH^- с защелачиванием внешней или внутренней среды клетки и на используемый клетками CO_2 . У цианобактерий фермент локализован в карбоксисомах, у

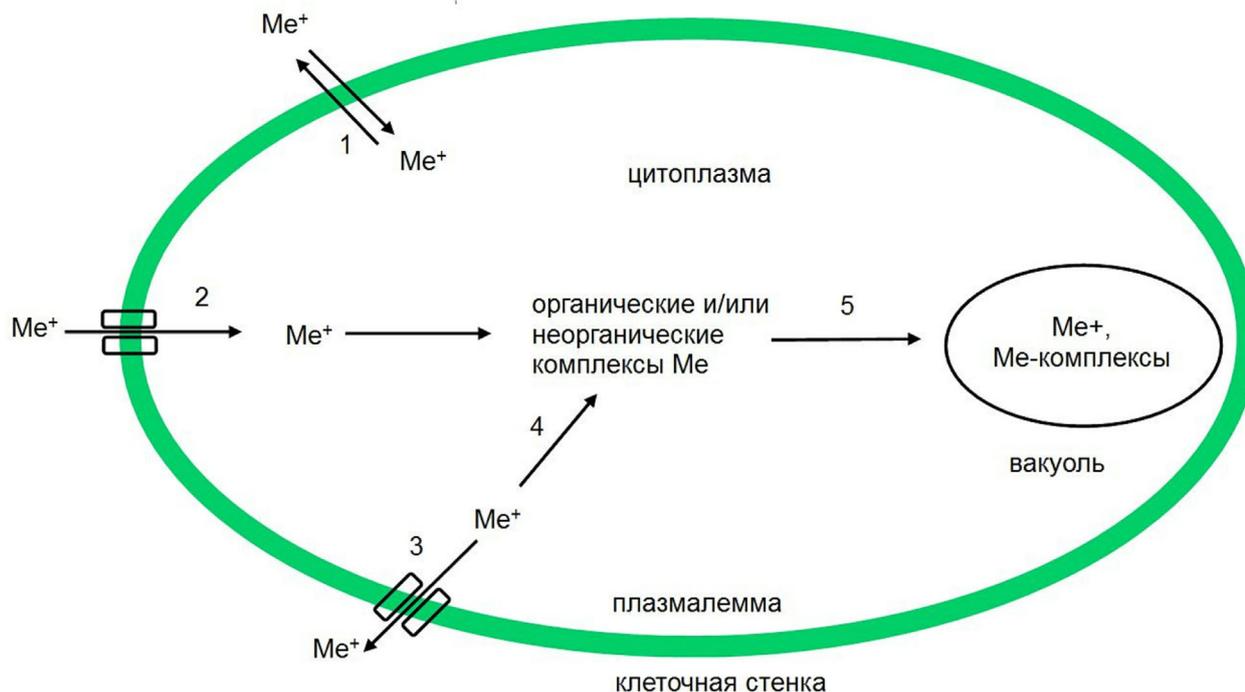


Рис. 4. Общепринятая схема поступления и распределения металлов (Me^+ и их комплексы) в растительной клетке. 1 – Диффузия по градиенту концентрации; 2 – активный внутриклеточный транспорт с помощью переносчиков; 3 – активное удаление из клетки; 4 – образование комплексов металлов с органическими и неорганическими субстратами цитоплазмы; 5 – изоляция внутри вакуоли в виде свободных катионов и металлокомплексов

водорослей – в пиреноидах, хотя их наличие в хлоропластах не является однозначным свидетельством ССМ, и ряд зеленых, красных и хризофитовых водорослей могут обходиться только усвоением CO_2 [47]. У *C. caldarium* признаков ССМ не обнаружено; у *C. merolae* ингибиторы карбоангидразы не влияют на выделение O_2 , указывая, наряду с беспиреноидными хлоропластами, на требующее ряда дополнительных доказательств отсутствие ССМ [48], которое соответствует гидрохимически обусловленному отсутствию ионов HCO_3^{3-} в кислой среде [48]. Для улучшения фиксации CO_2 Cyanidiales используют форму РБФК, обладающую максимальной карбоксилазной активностью. Из четырех известных форм, IA, IB, IC, и ID, у Cyanidiales, как и у всех красных водорослей, присутствует форма ID, отличающаяся самым большим сродством к CO_2 [47]. Содержание углекислого газа в горячих источниках составляет 10 мкМ, а РБФК из *C. caldarium* и *G. sulphuraria* фиксирует CO_2 , начиная с концентрации 6–7 мкМ, которая является наименьшей известной для эукариот [49].

В активном центре РБФК возможно связывание как CO_2 , так и O_2 . Повышение освещенности приводит к дополнительному фотосинтетическому образованию O_2 и, соответственно, к

появлению токсичных активных форм кислорода (АФК). В этих условиях возрастает конкурентная по отношению к углекислому газу РБФК-фиксация O_2 , что нейтрализует избыточный кислород, но приводит затем к появлению 3-фосфоглицеринового альдегида (3-ФГА) и 2-фосфогликолата (2ФГ), ингибирующего ряд клеточных ферментов. Поэтому 2ФГ утилизируется в реакциях фотодыхания, называемых также гликолатным циклом [50]. Цепь реакций последовательно осуществляется в трех органеллах: митохондриях, пероксисомах и хлоропластах. Согласно BLAST-анализу (генома), клетки *C. merolae* содержат ген каталазы и гены всех остальных белков, участвующих в фотодыхании у высших растений, указывая, что у *C. merolae* возможно фотодыхание [51]. Об этом, в частности, говорит и зависимость выделения O_2 у *C. merolae* от изменений углекислотного компенсационного пункта [48].

ГЕТЕРОТРОФИЯ И МИКСОТРОФИЯ

Виды рода *Galdieria* обладают способностью к темновой гетеротрофии. Выявлено 27 усвояемых углеводов и полиолов, и с учетом аминокислот и интермедиатов цикла Кребса – до

50 органических веществ, которые могут использоваться *Galdieria* для построения собственных органических соединений и как источник энергии [6, 7, 52]. При переходе от авто- к гетеротрофии размеры клеток *Galdieria* увеличиваются [52, 53], утончается клеточная стенка, облегчая поступление органики, возрастает число митохондрий, крупный хлоропласт разбивается на несколько мелких пропластид, теряются хлорофилл и фикобилины, утрачиваются многие ферменты фотосинтеза, в клетке увеличивается содержание гликогена, стеариновой и малеиновой кислот, мононенасыщенных жирных кислот и эргостерола [54].

Возможности культурального роста гетеротрофных клеток *G. sulphuraria* составляют 50–100 г/л в виде сухой биомассы, что сопоставимо с высокопродуктивными одноклеточными грибами, гетеротрофными бактериями и единичными видами микроводорослей других таксонов [55]. Лаг-фаза после добавления органики в ростовую среду может занимать от 1 до 45 суток [6, 52]. Наиболее быстро усваиваются глюкоза и другие гексозы (рис. 5).

В геноме *G. sulphuraria* выявлено 28 потенциальных мембранных переносчиков различных углеводов [27, 56]. Доля мембранных транспортеров в протеоме составляет 5,2%, что значительно больше, чем у фотоавтотрофных микроводорослей [25]. Все переносчики углеводов разбиваются на три группы: 1) группа глю-

козы и др. гексоз; 2) группа пентоз и 3) группа полиолов [27]. *G. sulphuraria* может расти, используя лишь чистый глицерин.

Превращение усвояемых полиолов в углеводы происходит с помощью дегидрогеназ. «Всеядностью» *G. sulphuraria* обязана наличию разнообразных ферментов. У *G. sulphuraria* обнаружены гены галактокиназы, глицерокиназы, глюкокиназы, ксилокиназы, рибокиназы, фруктокиназы и др. [57]. Манноза в форме манноза-6-фосфата токсична для высших растений, а у *G. sulphuraria* под действием глюкокиназы и изомеразы превращается в фруктозо-6-фосфат, что устраняет клеточный токсикоз [58]. Аналогичным образом метаболизируется токсичная галактоза. Пути использования углеводов и другие основные метаболические процессы в клетках *Galdieria* подробно рассмотрены в [57]. Вероятным источником усвояемой органики служат отмирающие собственные клетки и находящиеся в той же среде обитания нефотосинтезирующие бактерии.

C. merolae обладает значительно меньшим числом белков для транспорта аминокислот и углеводов по сравнению с *G. sulphuraria* [59, 60]. При содержании глицерина во внешней среде, равном 200 мкМ, преодолевается концентрационный клеточный барьер, делая возможным гетеротрофный рост, хотя и более медленный, чем при автотрофии. Гетеротрофия не возникает, однако, при добавке в среду глюкозы, янтарной

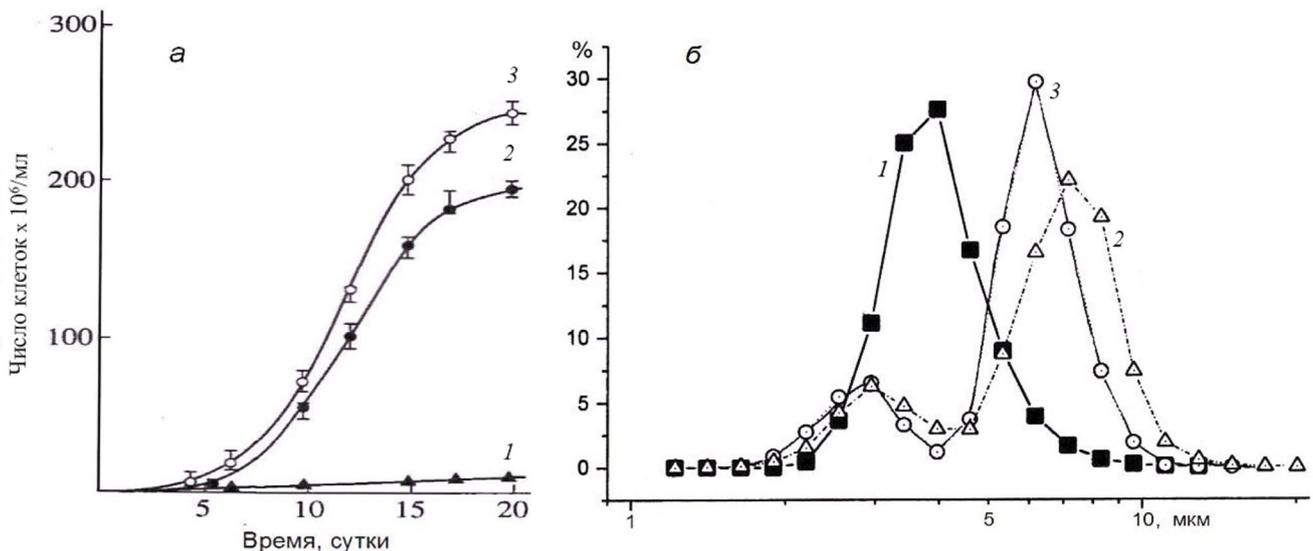


Рис. 5. Влияние добавления 1%-ной глюкозы на рост культуры и размеры клеток *G. partita*. а – Ростовые кривые клеток при фотоавтотрофном (1), хемогетеротрофном (2) и фотогетеротрофном (3) росте. Присутствие глюкозы в ростовой среде (2 и 3) приводит к многократному увеличению числа клеток; б – рефрактограмма размеров клеток *G. partita*, выращенных в течение семи дней в фотоавтотрофных (1), хемогетеротрофных (2) и фотогетеротрофных (3) условиях [53]. Небольшое увеличение доли гетеротрофных клеток размером 3 мкм объясняется повышенным образованием микроспор, меньших по размеру, чем вегетативные клетки

или молочной кислот [60]. С экофизиологической точки зрения *C. merolae* остается фотоавтотрофом, но встраивание одного из генов — переносчиков глюкозы из *G. sulphuraria* в геном *C. merolae* позволило и в этом случае осуществить гетеротрофный рост [56].

Виды рода *Galdieria* наряду с темновой гетеротрофией способны к миксотрофному (фотогетеротрофному) росту, который в разных биохимических вариантах метаболизма является успешной эволюционной стратегией, увеличивающей физиологическую активность ряда фотосинтетиков [61]. Взаимоотношение дыхательного и фотосинтетического процессов еще оставляет много неясных вопросов, которые подразумевают исследование миксотрофов, подобных *Galdieria*.

За *C. caldarium* сохраняется характеристика строгого фотоавтотрофа.

ЗАПАСНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ

Багрянковый, или флоридный, крахмал Cyanidiales, как и у всех красных водорослей, накапливается в цитозоле, в отличие от биосинтеза крахмала в хлоропластах у зеленых водорослей и высших растений. Содержание запасных углеводов в клетках Cyanidiales невелико, их значительные количества синтезируются лишь при концентрации CO₂ в среде не ниже 1%, и у представителей *Galdieria* — при переходе к гетеротрофии. У гетеротрофно растущей *G. maxima* количество глюкана может возрастать с 5 до 80% сухого веса клетки [62]. В миксотрофных условиях накопление полисахаридов за счет суммарного поступления CO₂ и органики идет более интенсивно, чем при темновой гетеротрофии [62, 63]. В условиях гетеротрофии углеводы среди запасных веществ составляют до 65%, белки — 25%, а липиды — лишь 10% [64]. У *C. merolae*, как и у других фотоавтотрофов, содержание запасных углеводов увеличивается при деградации белков, вызванной дефицитом азота [65, 66].

Ферменты синтеза глюканов у красных и зеленых водорослей имеют общее происхождение, что указывает на появление крахмала до эволюционного разделения этих двух ветвей архепластид [67]. Сборку полисахаридных цепей у глюканов ведут два фермента. Гликогенсинтаза увеличивает длину молекул глюкана за счет α -1,4-гликозидных связей между молекулами D-глюкозы, и одновременно ветвящий фермент создает боковые ответвления с помощью α -1,6-связей. Для фотосинтетиков характерны по-разному разветвленные глюканы. *G. sulphu-*

rarica содержит ген, кодирующий гликогенсинтазу с дополнительным активным центром появления разветвлений, что приводит к большому числу боковых α -1,6 ковалентных связей. К настоящему времени не известен ни один организм среди про- или эукариот с подобными свойствами. Представители *Galdieria* синтезируют наиболее разветвленный из полиглюканов, который по частоте образования боковых цепей превосходит амилопектин высших растений, гликоген дрожжей, фитогликоген цианобактерий и крахмалы мезофильных красных водорослей [68]. Средняя длина неразветвленных участков полиглюкана у *G. maxima* составляет 6–7 остатков глюкозы [62], у *G. sulphuraria* их число равняется 9–10 [68]. Высокоразветвленные полисахариды быстрее других полиглюканов утилизируются как углеводный резерв.

Кроме багрянкового крахмала, красные водоросли синтезируют низкомолекулярные сахара: флоридозид и, в меньшем количестве, изофлоридозид [69]. У Cyanidiales, если горячий источник является гипергалинным, эти соединения, наряду с быстрорастворимым крахмалом, выполняют роль осмопротекторов (в эксперименте до 1,2 М NaCl) [69]. Аналогичным образом эти два сахара, вероятно, могут защищать от пересыхания эндолитные виды *Galdieria* [69].

КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА

Клеточная стенка служит водорослям и наземным растениям защитой от проникания инфекционных агентов и агрессивных веществ, от поедания гетеротрофами, а также является опорной структурой [70, 71]. В термоацидофильной среде обитания опасность поедания или инфекционного заражения для Cyanidiales минимальна, но клеточный каркас и защита от химических воздействий необходимы. У *C. caldarium* и *G. sulphuraria* стенки прочны настолько, что затрудняют механическое разрушение. Клетки *C. merolae* при малых размерах (2 мкм) обходятся без клеточной стенки, демонстрируя некоторую способность к фототаксису [72].

С учетом внутреннего или наружного положения относительно плазмалеммы и других особенностей различают пять (типы I–V) базовых типов клеточной стенки [71]. Красные водоросли, включая Cyanidiales, вместе с высшими растениями и зелеными водорослями относятся к типу III с внутренним расположением клеточной мембраны [70]. Сходство целлюлозных и других полимерных волокон у разных по срокам

происхождения групп водорослей является следствием очень раннего параллельного переноса генов их биосинтеза от бактерий к эукариотам [73]. У красных водорослей мономерами фибриллярных цепей полисахаридов служат (1-3)(1-4)- β -D-глюканы; скреплять волокна стенки могут агар, каррагинан и лигнин [71]. Клеточная стенка *C. caldarium*, имея толщину 50 нм, содержит 12–14% гемицеллюлозы, 3–4% целлюлозы и 2% липидов; 55% массы стенки составляют кислотоустойчивые белки [74]. Пути биосинтеза компонентов стенки у красных водорослей остаются неясными, но в геноме *G. sulphuraria* идентифицированы гены фукозил-, галактозил-, маннозил- и гликозилтрансфераз [75]. Средствами защиты клеточной стенки и клетки в целом от АФК служат пероксидазы. Из десяти генов пероксидаз, найденных у *G. sulphuraria*, три кодируют пероксидазы класса III, которые участвуют в формировании лигнина, сшивающего микрофибриллы гемицеллюлоз [75]. Предполагается, что способность *Galdieria* выживать месяцами в полной темноте при отсутствии органики связана с лигнификацией и закупоркой на этот период стеночных пор для сообщения с внешней средой [75].

При переходе от автотрофии к гетеротрофному питанию клеточная стенка *G. sulphuraria*, как упоминалось, заметно истончается [54]. Отсутствие стенки у *C. merolae*, непроницаемость стенки у *C. caldarium* для органических веществ и изменение толщины стенки у *G. sulphuraria* служат указанием на лабильность и эволюционные изменения этой структуры у эукариот.

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ МЕМБРАН

К основным мембранным липидам *C. merolae* и *G. sulphuraria* относятся моно- и дигалактозилглицеролы, сульфоллипиды, фосфатидилглицерол, фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилинозитол, хотя разнообразие жирных кислот в липидах невелико: их представляют пальмитиновая, олеиновая, линоленовая и линолевая. Липиды *Cyanidiales*, согласно биохимическому анализу, сходны с липидами растений и других групп водорослей [76, 77].

Ацилированные липиды пластидных мембран у растений и водорослей содержат полиеновые жирные кислоты, в биосинтезе которых используются прокариотный и эукариотный пути, локализованные соответственно в хлоропластах и эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР). Кислоты 16 : 0 и 18 : 0 синтезируются в пластидах, а их элонгация и десатурация происходят в цитоплазме. Биосинтез линолевой кислоты, име-

ющей две двойные связи и входящей в состав фосфатидилхолина, полностью осуществляется в цитоплазме. Обычные для других эукариот полиеновые жирные кислоты с тремя двойными связями, за исключением линоленовой, у *Cyanidiales* отсутствуют. Десатурация жирных кислот в составе липидов ведет к увеличению текучести мембран, необходимой при низких и средних температурах, в чем не нуждаются организмы-термофилы. По-видимому, по этой причине, как следует из геномного анализа, *C. merolae* не содержит десатураз цианобактериального (пластидного) происхождения, которые катализируют образование двойных связей в жирных кислотах растений [78]. При образовании моногалактозилдиацилглицерола используется сочтанный биосинтез с использованием пальмитиновой кислоты, поступающей из хлоропласта, и линолевой кислоты, синтезируемой в ЭПР [78]. Тонкая биохимическая регуляция состава мембранных липидов достигается образованием изомеров имеющихся в них жирных кислот в зависимости от изменений pH среды [79]. При кислых значениях pH в серных источниках фосфаты очень плохо растворимы, отчего фосфорное голодание привело у *Cyanidiales* к замене фосфолипидов на бетаинлипиды. Десятки выявленных у *G. sulphuraria* разновидностей бетаинлипидов разделяются на 14 классов [79]. Данные сравнительной геномики в сопоставлении со схемами метаболических путей показывают, что в геноме *C. merolae* активность 121 гена связана с участием в биосинтезе жирных кислот и липидов [58, 78].

При переходе от автотрофного к гетеротрофному росту у *G. sulphuraria* содержание липидов в пересчете на сухой вес клеток меняется незначительно, т.к. основным запасаемым полимером служит багрянковый крахмал, а не масла [64]. Имеются данные о наличии у *G. sulphuraria* генов синтеза липида А, который является составной частью липополисахаридов у грамотрицательных бактерий, где они обеспечивают структурную целостность и защиту клеточной мембраны от агрессивных воздействий окружающей среды [58], что полностью соответствует условиям существования *Cyanidiales*.

ПИГМЕНТНЫЙ АППАРАТ ФОТОСИНТЕЗА

Монофилетическое происхождение хлоропластов от цианобактерий позволяет сопоставлять результаты, полученные при исследовании фотосинтеза у представителей разных растительных таксонов. Пигментный аппарат оксигенного фотосинтеза универсален и состоит из

макрокомплексов фотосистем 1 и 2 (ФС 1 и ФС 2), которые отличаются консервативностью, и дополняющей светосбор вариабельной светособирающей антенны. Фикобилисомная антенна цианобактерий сохранилась у всех красных и глаукофитовых водорослей, в то время как в зеленой линии археопластид она сменилась хлорофилл *a/b*-содержащей антенной, а у хромофит была заменена на хлорофилл *a/c*-содержащие протеины [80].

Коровые комплексы цианобактериальной ФС 2 состоят из 3 гидрофильных и 17 трансмембранных полипептидов, образуя в тилакоидной мембране димеры общей массой 700 кДа. Выявленные различия ФС 2 в хлоропластах разных таксонов касаются водоокисляющего Mn_4CaO_5 -содержащего кластера. У цианобактерий кластер состоит из трех белковых субъединиц, PsbO, PsbU и PsbV. Для *C. caldarium* в 2016 г. был получен первый среди эукариотных фотосинтетиков кристаллический препарат ФС 2 [81]. Как оказалось, к трем перечисленным полипептидам для стабилизации формы кластера добавляется полипептид PsbQ', имеющий участки гомологии с подобным ему полипептидом PsbQ зеленых водорослей и растений [81].

Коровый комплекс ФС 1 у цианобактерий содержит 12 полипептидов и образует в тилакоидной мембране мономеры и тримеры; у растений число полипептидов ФС 1 возрастает до 15, и комплекс находится в тилакоидах только в виде мономеров массой 600 кДа. Кристаллические структуры комплексов ФС 1, полученных из *C. merolae*, из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 и из растений (*Pisum sativum*), характеризуются совпадением в размещении молекул антенного хлорофилла в апопротеинах [82]. У *C. merolae* сохранилась имеющаяся у цианобактерий PsaM субъединица комплекса ФС 1, утраченная растениями [83]. Поэтому не исключено, что полипептид PsaM участвует в контакте ФС 1 с фикобилисомной антенной. У *C. merolae*, как и у растений, в составе ФС 1 появляется PsaO-полипептид, но отсутствуют приобретенные растениями PsaG и PsaH полипептиды. PsaL-полипептид у *C. merolae* утратил α -спиральный сегмент, необходимый для тримеризации ФС 1 у цианобактерий [83], что коррелирует с отсутствием тримеров ФС 1 у красных водорослей и появлением у них антенных Lhcr-полипептидов, содержащих по 13–15 хлорофилльных молекул. Lhcr-полипептиды, от трех у *C. merolae* до 5–9 – у *G. sulphuraria*, полупоясом охватывают в плоскости мембраны мономер ФС 1, увеличивая его светопоглощение [82]. Такое строение аналогично присутствию LHC-антенны, примыкающей к мономерам ФС 1 у зе-

леных водорослей и растений. Содержание ФС 1 у красных водорослей, как и у цианобактерий, в несколько раз превышает содержание ФС 2, отличаясь от соотношения 1 : 1 у растений, что, очевидно, связано с разными долями линейного и циклического электронного транспорта. Донором электрона для ФС 1 у Cyanidiales и, вероятно, у других красных водорослей, служит цитохром c_6 , в то время как у растений донором является пластоцианин, а у цианобактерий имеются оба донора [82, 83].

В фикобилисомах макрофитных красных водорослей присутствует красный пигмент фикоэритрин (В- или R-), цвет которого определяет окраску клеток. У Cyanidiales, рано обособившихся от остальных багрянок, фикоэритрина нет, а С-фикоцианин и аллофикоцианин, находящиеся в полудисковидных фикобилисомах [84], в сочетании с хлорофиллом придают клеткам сине-зеленую окраску, подобную окраске цианобактерий. Как у всех оксигенных фотосинтетиков, у Cyanidiales имеется молекулярный механизм светового баланса двух фотосистем, называемый обратимым переходом из Состояния 1 в Состояние 2 [85], но отсутствует цианобактериальный механизм нефотохимического тушения фикобилисом за счет светозащитного оранжевого каротиноид-протеина [86].

СИГНАЛЬНЫЕ И РЕГУЛЯТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Регуляторами и сенсорами биохимических и физиологических процессов у растений служат фитогормоны, фоторецепторные белки, глюкозо-гексокиназная система, активные формы кислорода, ионы Ca^{2+} , различные липиды и жирные кислоты, сахароза, мелатонин, метилглиоксаль, олигопептиды и другие соединения. Например, трипептид глутатион, как показано для *C. merolae* [87], является сенсором изменений редокс-состояния клеток. Глюкоза, оставаясь основой энергетического обмена, выполняет у *Galdieria* регуляторные функции, связанные с координацией фотосинтеза и дыхательных процессов [88]. В частности, глюкоза ингибирует биосинтез фотосинтетических пигментов (рис. 6).

Важнейшими являются механизмы световой и гормональной регуляции клеток, наиболее полно исследованные у цветковых растений. К белкам-фоторецепторам относятся криптохром/фотолиазы, фитохромы, фототропины, белки семейства ZEITLUPE и рецептор УФ-В света [89]. В частности, у *Arabidopsis thaliana* известно 14 фоторецепторов: пять фитохромов,

три криптохрома, два фототропина, три белка ZEITLUPE и один УФ-В рецептор UVR8. Фоторецепцию водорослей исследуют, прежде всего используя сравнение их геномных данных с данными для *A. thaliana*. В геноме *C. merolae* не найдено иных фоторецепторных генов, кроме пяти генов криптохром/фотолиазной системы [90, 91], что делает клетки *C. merolae* прекрасным объектом изучения криптохромной рецепции. Как показывает транскриптомный анализ, синий и красный свет влияют на активность 35% генома у данного вида. Синий свет регулирует транскрипцию генов белкового синтеза, красный – генов управления фотосинтезом и генов репарации ДНК. Совместно под контролем синего и красного участков спектра находятся реакции углеродного метаболизма и биосинтеза фотосинтетических пигментов. Поскольку криптохромы поглощают лишь синий свет, для объяснения эффекта в красном световом диапазоне предложена небесспорная в этом случае гипотеза ретроградного сигналинга между хлоропластом, функционирующим при красном свете, и ядром клетки [91, 92]. Синхронизация деления клеток *C. merolae* чередованием белого света и темноты [93] также подразумевает наличие клеточных сигналов от образующихся продуктов фотосинтеза.

У цветковых растений, для которых гормональная регуляция исследована наиболее полно, известно шесть групп фитогормонов: абсцизовая кислота (АБК), ауксины, брассиностероиды, гиббереллины, цитокинины и этилен. Список может быть расширен за счет соединений, проявляющих сходную с гормонами активность, таких как жасмоновая и салициловая кислоты, олигопептиды глутатион и мелатонин и др. [94]. Многообразная система гормонов, как и обилие фоторецепторов, по-видимому, не нужны в столь полном объеме микроводорослям как одноклеточным организмам. В геноме *C. merolae* идентифицированы лишь гены синтеза АБК с рецепторным протеином RCAR/PYR. Такие гормоны, как АБК являются универсальными, появляясь в эволюции уже у цианобактерий. Содержание АБК в клетках *C. merolae* уступает цветковым растениям и возрастает в ответ на солевой стресс. АБК у *C. merolae* замедляет репликацию ДНК и увеличивает время клеточного цикла, подобно тому, как это наблюдается у *A. thaliana* [95].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

У микроводорослей метаболические пути, скорость нарастания биомассы и выработка клеточных продуктов изменяются в зависимость

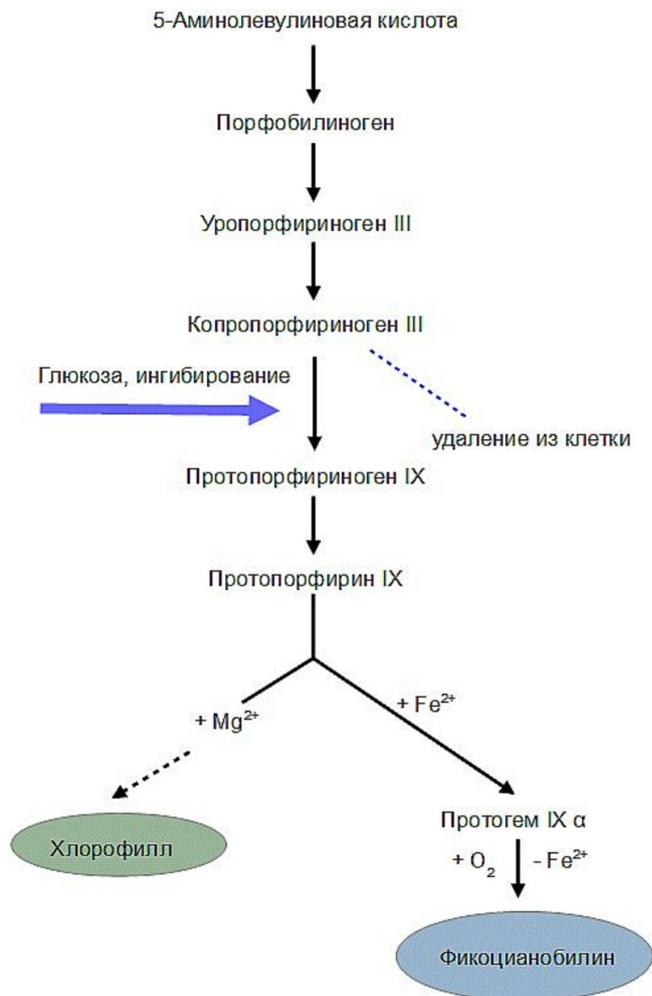


Рис. 6. Ингибирование биосинтеза пигментов фотосинтеза, хлорофилла и фикоцианобилина при гетеротрофном росте *G. partita*. Добавление 1%-ной глюкозы в ростовую среду приводит к подавлению образования протопорфириногена IX с удалением кислоторастворимого предшественника, копропорфириногена III, в ростовую среду [88]

ти от светового режима, модификаций генома и химического состава культивационной среды в более широких пределах, чем возможно для высших растений. Использование микроводорослей регламентируется доходностью производства, стоимостью фотобиореакторов, переходом от лабораторных разработок к промышленному внедрению патентов и возможностями открытого культивирования. Биотехнологическими направлениями использования Cyanidiales являются: 1) получение ценных водорослевых метаболитов; 2) генноинженерные модификации клеток; 3) биоремедиация; 4) извлечение редкоземельных элементов из промышленных отходов; 5) наработка биодизельного топлива.

К возможным перспективным метаболитам *Galdieria* относится С-фикоцианин, синий пиг-

мент фикобилисом, который получают из цианобактерии *Arthrospira platensis* для нужд фармацевтики, косметологии и в качестве пищевого красителя [96]. Меньшее в сравнении с цианобактериями содержание С-фикоцианина в гетеротрофной культуре *G. sulphuraria* 074G может компенсироваться более высокой суточной продуктивностью биомассы и большей термоустойчивостью. Немаловажным является также использование дешевых ферментеров вместо дорогих фотобиореакторов. Разнообразие видов *Galdieria* и модификации штаммов предполагают создание дополнительной конкуренции продукту *A. platensis* [97].

C. merolae как вид с полностью расшифрованным геномом относится к лучшим возможным объектам «зеленой» биотехнологии. Минимальный гаплоидный ядерный геном, почти полная утрата интронов, отсутствие клеточной стенки, облегчающее выделение ДНК и РНК, и знание, наряду с ядерным, хлоропластного и митохондриального геномов делают *C. merolae* заманчивым генноинженерным объектом. Перспективной для наработки определенных ферментов является возможность пластовой трансформации *C. merolae* [98]. Ведутся успешные работы по включению в ДНК *C. merolae* генов транспортных белков из *G. sulphuraria*, что, по имеющимся оценкам [99], позволит создаваемым штаммам *C. merolae* усваивать и нарабатывать десятки органических соединений, создавая потенциал для их дальнейшего использования [99].

Биоремедиация при повышенных температурах бытовых и промышленных сточных вод, содержащих токсичную органику, служит одним из направлений работ с Cyanidiales, где эти микроорганизмы используются для извлечения азота и фосфора. Формирование водорослевых матов *G. sulphuraria* в горячих источниках указывает на возможность иммобилизации культуры для этих целей в очистных сооружениях [99].

Выживание в природе в присутствии растворенных тяжелых металлов и способность роста Cyanidiales в агрессивной кислой среде подразумевают еще одно технологическое направление: извлечение сохраняющих высокую ценность редкоземельных элементов из отвалов горнорудных пород [99].

Глицерин, на котором в качестве органического субстрата растет *Galdieria*, является значительным продуктом отхода в производстве биодизельного топлива из других растений. Перспективной в дальнейшем является сверхэкспрессия двух глицерол-3-фосфаттрансфераз,

CmGPAT1 и CmGPAT2, при которой в клетках мутанта *C. merolae* 10D аккумулируется в 50 раз большее количество триацилглицеридов, чем в диком штамме [100].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстремофилией называется обитание в условиях внешней среды, угнетающих жизнедеятельность большинства земных организмов и приводящих к стрессовым состояниям вплоть до гибели. Cyanidiales подвергаются различным экстремальным физико-химическим воздействиям, к которым относятся высокая температура и выраженная кислотность среды, биоцидное действие растворенных тяжелых металлов и необходимость длительного выживания фотосинтезирующих клеток в отсутствие освещения (гетеротрофия у *Galdieria*). Экстремофилия достаточно широко распространена у прокариот, как у архей, так и у бактерий, но у эукариот встречается относительно редко. Она известна у немногих видов из различных эукариотных систематических групп, но, как правило, ограничивается приспособлением к какому-либо одному ограничивающему фактору. Особенностью Cyanidiales является полиэкстремофилия. В условиях одновременного воздействия нескольких отрицательных абиотических факторов, совокупность которых является губительной для подавляющего числа эукариотных (микро)организмов, в случае Cyanidiales создалась возможность использования биотопов, где произошло высвобождение из-под пресса иной биоты. Для этих микроводорослей отсутствует прямая конкуренция с другими микро- и макрофотосинтетиками, они избавлены от опасности поедания хищниками и воздействия инфекционных агентов. Отсутствие нежелательных биологических воздействий превысило отрицательную роль агрессивных физико-химических факторов и стало условием успеха в геотермальной среде обитания и затем, для части видов – в мезофильных средах.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121040800153-1).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Seckbach, J. (2010) Overview of Cyanidian Biology, in *Red Algae in the Genomic Age* (Seckbach, J., and Chapman, D. J. eds.) Springer, N.Y., pp. 345-356.
- Sentsova, O. Yu. (1991) On the diversity of acido-thermophilic unicellular algae of the genus *Galdieria* (Rhodophyta, Cyanidiophyceae), *Botanichesky J.*, **76**, 69-79.
- Sentsova, O. Yu. (1994) The Study of Cyanidiophyceae in Russia. Algae of Genus *Galdieria*: Diversity, Characterization and Occurrence in Mixed Populations with *Cyanidium caldarium*, in *Evolutionary Pathways and Enigmatic Algae: Cyanidium caldarium (Rhodophyta) and Related Cells* (Seckbach, J., ed.) Kluwer, Dordrecht, pp. 167-174.
- Стадничук И. Н., Кузнецов В. В. (2021) Эндосимбиотическое происхождение хлоропластов в эволюции растительной клетки, *Физиол. Раст.*, **68**, 3-19.
- Bhattacharya, D., Qiu, H., Lee, J. M., Yoon, H. S., Weber, A. P. N., et al. (2018) When less is more: *Red algae* as models for studying gene loss and genome evolution in eukaryotes, *Crit. Rev. Plant Sci.*, **37**, 81-99.
- Miyagishima, S., and Tanaka, K. (2021) The unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* – the simplest model of a photosynthetic eukaryote, *Plant Cell Physiol.*, **62**, 926-941.
- Pinto, G., Ciniglia, C., Cascone, C., and Pollio, A. (2007) Species Composition of Cyanidiales Assemblages in Pisciarelli (Campi Flegrei, Italy) and Description of *Galdieria phlegrea* sp. nov., in *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments* (Seckbach, J., ed.) pp. 488-501.
- Allen, M. A. (1959) Studies with *Cyanidium caldarium*, an anomalously pigmented chlorophyte, *Arch. Mikrobiol.*, **32**, 270-277.
- Merola, A., Castaldo, R., De Luca, P., Gambardella, R., Musachio, A., et al. (1981) Revision of *Cyanidium caldarium*. Three species of acidophilic algae, *Giorn. Bot. Ital.*, **115**, 189-195.
- De Luca, P., Taddei, R., and Varano, L. (1978) '*Cyanidioschyzon merolae*': A new alga of thermal acidic environments, *Webbia*, **33**, 37-44.
- Barcytė, D., Nedbalová, L., Culka, A., Košek, F., and Jehlička, J. (2018) Burning coal spoil heaps as a new habitat for the extremophilic red alga *Galdieria sulphuraria*, *Fottea (Olomouc)*, **18**, 19-29.
- Liu, S.-L., Chiang, Y.-R., Yoon, H. S., and Fu, H.-Y. (2020) Comparative genome analysis reveals *Cyanidiococcus* gen. nov., a new extremophilic red algal genus sister to *Cyanidioschyzon* (Cyanidioschyzonaceae, Rhodophyta), *J. Phycol.*, **56**, 1428-1442.
- Sánchez-Baracaldo, P., Raven, J. A., Pisani, D., Knoll, A. H. (2017) Early photosynthetic eukaryotes inhabited low-salinity habitats, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, e7737.
- Donoghue, P., and Paps, J. (2020) Plant evolution: Assembling land plants, *Curr. Biol.*, **30**, R81-R83.
- Yoon, H. S., Müller, K. M., Sheath, R. G., Ott, F. D., and Bhattacharya, D. (2006) Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta), *J. Phycol.*, **42**, 482-492.
- Jong, L. W., Fujiwara, T., Hirooka, S., and Miyagishima, S. Y. (2021) Cell size for commitment to cell division and number of successive cell divisions in cyanidialean red algae, *Protoplasma*, doi: 10.1007/s00709-021-01628-y.
- Guo, L., and Yang, G. (2015) Predicting the reproduction strategies of several microalgae through their genome sequences, *J. Ocean Univ. China*, **14**, 491-502.
- Седова Т. В. (1996) *Кариология водорослей*, Наука, СПб., 386 с.
- Muravenko, O., Selyakh, I., Kononenko, N., and Stadnichuk, I. (2001) Chromosome numbers and nuclear DNA contents in the red microalgae *Cyanidium caldarium* and three *Galdieria* species, *Eur. J. Phycol.*, **36**, 227-232.
- Nozaki, H., Takano, H., Misumi, O., Terasawa, K., Matsuzaki, M., et al. (2007) A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*, *BMC Biol.*, **5**, 28, doi: 10.1186/1741-7007-5-28.
- Qiu, H., Price, D. C., Yang, E. C., Yoon, H. S., and Bhattacharya, D. (2015) Evidence of ancient genome reduction in red algae (Rhodophyta), *J. Phycol.*, **51**, 624-636.
- Termes, C. M., and Schönknecht, G. (2014) Gene transfers shaped the evolution of *de novo* NAD⁺ biosynthesis in eukaryotes, *Genome Biol. Evol.*, **6**, 2335-2349.
- Ohnuma, M., Misumi, O., Fujiwara, T., Watanabe, S., Tanaka, K., et al. (2009) Transient gene suppression in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Protoplasma*, **236**, 107-112.
- Поверенная И. В., Ройтберг М. А. (2020) Сплайсосомные интроны: свойства, функции и эволюция, *Биохимия*, **85**, 851-862.
- Schönknecht, G., Weber, A. P. M., and Lercher, M. J. (2014) Horizontal gene acquisition by eukaryotes as drives of adaptive evolution, *BioEssays*, **36**, 9-20.
- Ye, J., Rensing, C., Rosen, B. P., and Zhu, Y.-G. (2017) Arsenic bioremediation by photosynthetic organisms, *Trends Plant Sci.*, **17**, 155-161.
- Barbier, G., Oesterhelt, C., Larson, M. D., Halgren, R. G., Wilkerson, C., et al. (2005) Comparative genomics of two closely related unicellular thermo-acidophilic red algae, *Galdieria sulphuraria* and *Cyanidioschyzon merolae*, reveals the molecular basis of the metabolic flexibility of *Galdieria sulphuraria* and significant differences in carbohydrate metabolism of both algae, *Plant Physiol.*, **137**, 460-474.
- Jain, K., Krause, K., Grewe, F., Gaven, F., Nelson, G. F., et al. (2015) Extreme features of the *Galdieria sulphuraria* organellar genomes: A consequence of polyextremophily? *Genome Biol. Evol.*, **7**, 367-380.
- Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., et al. (2008) Cell proliferation at 122 °C and isotopically heavy methane under high-pressure cultivation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 10949-10954.
- Rahman, D. Y., Sarian, F. D., van Wijk, A., Martinez-Garcia, M., van der Maarel, M. J. E. C. (2016) Thermostable phycocyanin from the red microalga *Cyanidioschyzon merolae*, a new natural blue food colorant, *J. Appl. Phycol.*, **29**, 1233-1239.
- Ferraro, G., Imbimbo, P., Marseglia, A., Lucignano, R., Monti, D. M., et al. (2020) X-ray structure of C-phycocyanin from *Galdieria phlegrea*: Determinants of thermostability and comparison with a C-phycocyanin in the entire phycobilisome, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 148236, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148236.
- Carfagna, S., Landi, V., Coraggio, F., Salbitani, G., Vona, V., et al. (2018) Different characteristics of C-phycocyanin (C-PC) in two strains of the extremophilic *Galdieria phlegrea*, *Algal Res.*, **31**, 406-412.
- Ferris, M. J., Sheehan, B., Kühl, M., Cooksey, K., Wigglesworth-Cooksey, B., et al. (2005) Algal species and light microenvironment in a low-pH, geothermal microbial mat community, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7164-7171.
- Nikolova, D., Weber, D., Scholz, M., Bald, T., Scharsack, J. P., et al. (2017) Temperature induced remodeling of the photosynthetic machinery tunes photosynthesis in a thermophilic alga, *Plant Physiol.*, **174**, 35-46.

35. Rossoni, A. W., Schönknecht, G., Lee, H. J., and Lupp, R. L. (2019) Cold acclimation of the thermoacidophilic red alga *Galdieria sulphuraria* – changes in gene expression and involvement of horizontally acquired genes, *Plant Cell Physiol.*, **60**, 702-712.
36. Beardal, J., and Entwisle, L. (1984) Internal pH of the obligate acidophile *Cyanidium caldarium* Geitler (Rhodophyta?), *Phycologia*, **23**, 397-399.
37. Bethmann, B., Schönknecht, G. (2009) pH regulation in an acidophilic green alga – a quantitative analysis, *New Phytologist*, **183**, 327-339.
38. Raven, J. A., and Beardall, J. (2020) Energizing the plasmalemma of marine photosynthetic organisms: the role of primary active transport, *J. Mar. Biol. Ass. UK*, **100**, 333-346.
39. Gimmler H. (2001) Acidophilic and Acidotolerant Algae, in *Algal adaptation to Environmental Stresses* (Rai, L. C., et al., eds.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 259-290.
40. Kaplan, D. (2013) Absorption and Adsorption of Heavy Metals by Microalgae, in *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (Richmond, A., and Hu, Q., eds.) Blackwell Publishing Ltd, Second Edn., pp. 602-611.
41. Nagasaka, S., Nishizawa, N. K., Watanabe, T., Mori, S., and Yoshimura, E. (2004) Metal metabolism in the red alga *Cyanidium caldarium* and its relationship to metal tolerance, *Biometals*, **17**, 177-181.
42. Edwards, C. D., Beatty, J. C., Loiselle, J. B., Vlassov, K. A., and Lefebvre, D. D. (2013) Aerobic transformation of cadmium through metal sulfide biosynthesis in photosynthetic microorganisms, *BMC Microbiol.*, **13**, 161, doi: 10.1186/1471-2180-13-161.
43. Wang, C., Maratukulam, P., Lum, A., Clark, D., and Keasling, J. (2000) Metabolic engineering of an aerobic sulfate reduction pathway and its application to precipitation of cadmium on the cell surface, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4497-4502.
44. Yoshimura, E., Nagasaka, S., Satake, K., and Mori, S. (2000) Mechanism of aluminium tolerance in *Cyanidium caldarium*, *Hydrobiologia*, **433**, 57-60.
45. Padišák, J., and Naselli-Flores, L. (2021) Phytoplankton in extreme environments: importance and consequences of habitat permanency, *Hydrobiologia*, **848**, 157-176.
46. Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-I, T., Maruyama, S., Takahara, M., et al., (2004) Genome sequence of the ultra-small unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Nature*, **428**, 653-657.
47. Raven, J. A., Ball, L. A., Beardall, J., Giordano, M., and Maberly, S. C. (2005) Algae lacking carbon-concentrating mechanisms, *Can. J. Bot.*, **83**, 879-890.
48. Parys, E., Krupnik, T., Kuřák, I., Kania, K., and Romanowska, E. (2021) Photosynthesis of the *Cyanidioschyzon merolae* cells in blue, red, and white light, *Photosynth. Res.*, **147**, 61-73.
49. Uemura, K., Anwaruzzaman, Miyachi, S., and Yokota, A. (1997) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from thermophilic red algae with a strong specificity for CO₂ fixation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **233**, 568-571.
50. Eisenhut, M., Hocken, N., and Weber, A. P. M. (2015) Plastidial metabolite transporters integrate photorespiration with carbon, nitrogen, and sulfur metabolism, *Cell Calcium*, **58**, 98-104.
51. Rademacher, N., Kern, R., Fujiwara, T., Mettler-Altmann, T., Miyagishima, S.-Ya., et al. (2016) Photorespiratory glycolate oxidase is essential for the survival of the red alga *Cyanidioschyzon merolae* under ambient CO₂ conditions, *J. Exp. Bot.*, **67**, 3165-3175.
52. Gross, W., and Schnarrenberger, C. (1995) Heterotrophic growth of two strains of the acido-thermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*, *Plant Cell Physiol.*, **36**, 633-648.
53. Стадничук И. Н., Семенова Л. Р., Рахимбердиева М. Г., Тропин И. В., Усов А. И. (2006) Регуляторная роль глюкозы и света в гетеротрофном росте термоацидофильной красной микроводоросли *Galdieria*. II международный симпозиум «Сигнальные системы клеток растений: роль в адаптации и иммунитете», Казань, стр. 113-114.
54. Tischendorf, G., Oesterhelt, C., Hoffmann, S., Girmus, J., Schnarrenberger, C., et al. (2007) Ultrastructure and enzyme complement of proplastids from heterotrophically grown cells of the red alga *Galdieria sulphuraria*, *Eur. J. Phycol.*, **42**, 243-251.
55. Graverholt, O. S., Eriksen, N. T. (2007) Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 69-75.
56. Fujiwara, T., Hirooka, S., Mukai, M., Ohbayashi, R., Kanesaki, Yu, et al. (2019) Integration of a *Galdieria* plasma membrane sugar transporter enables heterotrophic growth of the obligate photoautotrophic red alga *Cyanidioschyzon merolae*, *Plant Direct*, **3**, e00134, doi: 10.1002/pld3.134.
57. Ternes, C. M. (2015) Metabolic evolution in *Galdieria sulphuraria*, *Dissertation for the Degree of Dr. Philosophy*. Oklahoma Univ. USA.
58. Weber, A. P. M., Oesterhelt, C., Gross, W., Bräutigam, A., Imboden, L. A., et al. (2004) EST-analysis of the thermoacidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* reveals potential for lipid A biosynthesis and unveils the pathway of carbon export from rhodoplasts, *Plant Mol. Biol.*, **55**, 17-32.
59. Lee, J., Ghosh, S., and Saier, Jr, M. H. (2017) Comparative genomic analyses of transport proteins encoded within the red algae *Chondrus crispus*, *Galdieria sulphuraria* and *Cyanidioschyzon merolae*, *J. Phycol.*, **53**, 503-521.
60. Moriyama, T., Mori, N., and Sato, N. (2015) Activation of oxidative carbon metabolism by nutritional enrichment by photosynthesis and exogenous organic compounds in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*: Evidence for heterotrophic growth, *SpringerPlus*, **4**, 559, doi: 10.1186/s40064-015-1365-0.
61. Selosse, M.-A., Charpin, M., and Not, F. (2017) Mixotrophy everywhere on land and in water: the grand йcart hypothesis, *Ecol. Lett.*, **20**, 246-263.
62. Стадничук И. Н., Семенова Л. Р., Смирнова Г. П., Усов А. И. (2007) Высокоразветвленный запасной полиглюкан в клетках термоацидофильной красной микроводоросли *Galdieria maxima*, *Прикл. Биохим. Микробиол.*, **43**, 88-93.
63. Sakurai, T., Aoki, M., Ju, X., Ueda, T., Nakamura, Y., et al. (2016) Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfothermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*, *Biores. Technol.*, **200**, 861-866.
64. Graziani, G., Schiavo, S., and Nicolai, M. A. (2013) Microalgae as human food: Chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*, *Food Funct.*, **1**, 144-152.
65. Sinetova, M. P., Markelova, A. G., and Los, A. D. (2006) The effect of nitrogen starvation on the ultrastructure and pigment composition of chloroplasts in the acidothermophilic microalga *Galdieria sulphuraria*, *Rus. J. Plant Physiol.*, **53**, 153-162.
66. Takusagawa, M., Nakajima, Y., Saito, T., and Misumi, O. (2016) Primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae* accumulates storage glucan and triacylglycerol under nitrogen depletion, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **62**, 111-117.

67. Patron, N. J., Keeling, P. J. (2005) Common evolutionary origin of starch biosynthetic enzymes in green and red algae, *J. Phycol.*, **41**, 1131-1141.
68. Martinez-Garcia, M., Stuart, M. C. A., and Van der Maarel, M. J. E. C. (2016) Characterization of the highly branched glycogen from the thermoacidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* and comparison with other glycogens, *Int. J. Biol. Macromol.*, **89**, 12-18.
69. Pade, N., Linka, N., Ruth, W., Weber, A. P., and Hagemann, M. (2015) Floridoside and isofloridoside are synthesized by trehalose 6-phosphate synthase-like enzymes in the red alga *Galdieria sulphuraria*, *New Phytol.*, **205**, 1227-1238.
70. Горшкова Т. А. (2007) *Растительная клеточная стенка как динамичная система*, Наука, Москва, 426 с.
71. Popper, Z. A., Michel, G., Herve, C., Domozych, D. S., Willats, W. G. T., et al. (2011) Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants, *Ann. Rev. Plant Biol.*, **62**, 567-590.
72. Ohnuma, M., Misumi, O., and Kuroiwa, T. (2011) Phototaxis in the unicellular red algae *Cyanidioschyzon merolae* and *Cyanidium caldarium*, *Cytologia*, **76**, 295-300.
73. Niklas, K. J. (2004) The cell walls that bind the tree of life, *BioScience*, **54**, 831-841.
74. Bailey, R. W. (1968) The chemical composition of isolated cell walls of *Cyanidium caldarium*, *J. Gen. Microbiol.*, **54**, 269-276.
75. Oesterhelt, C., Vogelbein, S., Shrestha, R. P., Stanke, M., and Weber, A. P. M. (2008) The genome of the thermoacidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* encodes a small family of secreted class III peroxidases that might be involved in cell wall modification, *Planta*, **227**, 353-362.
76. Allen, C. F., Good, P., and Holton, R. W. (1970) Lipid composition of *Cyanidium*, *Plant Physiol.*, **46**, 748-751.
77. Lang, I., Hodac, L., Friedl, T., and Feussner, I. (2011) Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection, *BMC Plant Biol.*, **11**, 124, doi: 10.1186/1471-2229-11-124.
78. Sato, N., and Moriyama, T. (2007) Genomic and biochemical analysis of lipid biosynthesis in the unicellular rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae*: lack of a plastidic desaturation pathway results in the coupled pathway of galactolipid synthesis, *Eukaryotic Cell*, **6**, 1006-1017.
79. Vitová, M., Goecke, F., Sigler, R., and Řezanka, T. (2016) Lipidomic analysis of the extremophilic red alga *Galdieria sulphuraria* in response to changes in pH, *Algal Res.*, **13**, 218-226.
80. Bendall, D. S., Howe, C. J., Nisbet, E. G., and Nisbet, R. E. (2008) Photosynthetic and atmospheric evolution, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **363**, 2625-2628.
81. Ago, H., Adachi, H., Umena, Y., Tashiro, T., Kawakami, K., et al. (2016) Novel features of eukaryotic photosystem II revealed by its crystal structure analysis from a red alga, *J. Biol. Chem.*, **291**, 5676-5687.
82. Antoshvili, M., Caspy, I., Hippler, M., and Nelson, N. (2019) Structure and function of photosystem I in *Cyanidioschyzon merolae*, *Photosynth. Res.*, **139**, 499-508.
83. Vanselow, C., and Weber, A. P. M., Krause, K., and Fromme, P. (2009) Genetic analysis of the photosystem I subunits from the red alga, *Galdieria sulphuraria*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 46-59.
84. Marquardt, J. (1998) Effects of carotenoid-depletion on the photosynthetic apparatus of a *Galdieria sulphuraria* (Rhodophyta) strain that retains its photosynthetic apparatus in the dark, *J. Plant Physiol.*, **152**, 372-380.
85. Большевцева Ю. В., Тропин И. В., Стадничук И. Н. (2021) Состояния 1 и 2 в фотосинтетическом аппарате красных микроводорослей и цианобактерий, *Биохимия*, **86**, 1055-1066.
86. Stadnichuk, I. N., Bulychev, A. A., Lukashev, E. P., Sinetova, M. P., Khristin, M. S., et al. (2011) Far-red light-regulated efficient energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in the red microalga *Galdieria sulphuraria* and photosystems-related heterogeneity of phycobilisome population, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 227-235.
87. Salbitani, G., Bottone, C., and Carfagna, C. (2017) Determination of reduced and total glutathione content in extremophilic microalga *Galdieria phlegrea*, *Bioprotocol*, **7**, e2372, doi: 10.21769/BioProtoc.2372.
88. Stadnichuk, I. N., Rakhimberdieva, M. G., Bolychevtseva, Yu. V., Yurina, N. P., Karapetyan, N. V., et al. (1998) Inhibition by glucose of chlorophyll *a* and phycocyanobilin biosynthesis in the unicellular red alga *Galdieria partita* at the stage of coproporphyrinogen III formation, *Plant Sci.*, **136**, 11-23.
89. Войцеховская О. В. (2019) Фитохромы и другие (фото)рецепторы информации у растений, *Физиол. Раст.*, **66**, 163-177.
90. Asimgil, H., and Kavakli, I. (2012) Purification and characterization of five members of photolyase/cryptochrome family from *Cyanidioschyzon merolae*, *Plant Sci.*, **185-186**, 190-198, doi: 10.1016/j.plantsci.2011.10.005.
91. Tardu, M., Dikbas, U. M., Baris, I., and Kavakli, I. H. (2016) RNA-seq analysis of the transcriptional response to blue and red light in the extremophilic red alga, *Cyanidioschyzon merolae*, *Funct. Integr. Genomics*, **16**, 657-669.
92. Mishra, S., and Khurana, J. P. (2017) Emerging roles and new paradigms in signaling mechanisms of plant cryptochromes, *Crit. Rev. Plant Sci.*, **36**, 1-27.
93. Nishida, K., Yagisawa, F., Kuroiwa, H., Nagata, T., and Kuroiwa, T. (2005) Cell cycle-regulated, microtubule-independent organelle division in *Cyanidioschyzon merolae*, *Mol. Biol. Cell*, **16**, 2493-2502.
94. Дорошенко А. С., Данилова М. Н., Медведева А. С., Кузнецов В. В. (2019) Участие компонентов сигналинга синего света в регуляции цитокинин-зависимого зеления проростков *Arabidopsis thaliana*, *Физиол. Раст.*, **66**, 403-411.
95. Kobayashi, Y., Ando, H., Hanaoka, M., and Tanaka, K. (2016) Abscisic acid participates in the control of cell cycle initiation through heme homeostasis in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*, *Plant Cell Physiol.*, **57**, 953-960.
96. Stadnichuk, I. N., and Tropin, I. V. (2017) Phycobiliproteins: Structure, functions and biotechnological applications, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **53**, 1-10.
97. Sørensen, L., Hantke, A., and Eriksen, N. T. (2013) Purification of the photosynthetic pigment C-phycocyanin from heterotrophic *Galdieria sulphuraria*, *J. Sci. Food Agric.*, **93**, 2933-2938.
98. Zienkiewicz, M., Krupnik, T., Drozak, A., Golke, A., and Romanowska, E. (2017) Transformation of the *Cyanidioschyzon merolae* chloroplast genome: Prospects for understanding chloroplast function in extreme environments, *Plant Mol. Biol.*, **93**, 171-183.
99. Lang, I., Bashir, S., Lorenz, M., Rader, S., and Weber, G. (2020) Exploiting the potential of Cyanidiales as a valuable resource for biotechnological applications, *Appl. Phycol.*, doi: 10.1080/26388081.2020.1765702.
100. Fukuda, S., Hirasawa, E., Takemura, T., Takahashi, S., Chokshi, K., et al. (2018) Accelerated triacylglycerol production without growth inhibition by overexpression of a glycerol-3-phosphate acyltransferase in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*, *Sci. Rep.*, **8**, 12410, doi: 10.1038/s41598-018-30809-8.

POLYEXTREMOPHILIC EUKARYOTES CYANIDIALES

Review

I. N. Stadnichuk^{1*} and I. V. Tropin²

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

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

The red microalgae Cyanidiales were named “enigmatic algae” due to their polyextremophilic features, which were thought to be impossible for eukaryotes. Cyanidiales inhabiting hot sulfur springs in volcanic areas with pH 0-4, temperatures up to 56 °C, and high concentrations of dissolved heavy metals, integrate eukaryotic cell organization with characteristics unsurpassed by any other algal group and typical only for extremophilic species of living prokaryotes. Owing to their exceptional properties and minimal genome size, Cyanidiales have become one of the most perspective objects of research in plant cell physiology, biochemistry, molecular biology, phylogenomics, algology and evolutionary biology. They play an important role in the study of many features of oxygenic photosynthesis and chloroplast origin. The unique properties were acquired by Cyanidiales from archaea and bacteria through multiple acts of horizontal gene transfer. Thanks to this, the possibility of gene transfer between the superkingdoms of archaea, bacteria, and eukaryotes was discovered, being a milestone in the understanding of the origin of cell domains of life and the endosymbiotic origin of chloroplasts. At present, the study of these organisms with fully sequenced genomes of some their representatives is an interdisciplinary field of biology with excellent biotechnological perspectives and delineation the limits of adaptive changes compatible with the origin of life.

Keywords: acido-thermophily, microalgae, Cyanidiales, *Cyanidium caldarium*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Galdieria sulphuraria*

УДК 577.1

УВЕЛИЧЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ НАТРИЯ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ЭНДОТЕЛИИ

© 2022 Д.А. Федоров, С.В. Сидоренко, А.И. Юсипович, О.В. Букач,
А.М. Горбунов, О.Д. Лопина, Е.А. Климанова*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: klimanova.ea@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.02.2022

После доработки 26.04.2022

Принята к публикации 26.04.2022

Гиперосмотическая стимуляция клеток эндотелия часто приводит к его дисфункции, сопровождающейся в том числе возникновением провоспалительного ответа. Механизмы этого явления до конца не ясны. Оно может возникать вследствие увеличения концентрации Na^+ в плазме за счёт повышения осмолярности внеклеточной среды, увеличения внутриклеточного соотношения $\text{Na}_i^+/\text{K}_i^+$ и/или изменения «жесткости» клетки. В настоящей работе исследованы эффекты кратковременного повышения осмолярности внеклеточной среды на количество мРНК некоторых генов, важных для функционирования эндотелия (включая $\text{Na}_i^+/\text{K}_i^+$ -чувствительные), и эквивалентную константу упругости мембран клеток эндотелия пупочной вены человека. Гиперосмотическая стимуляция этих клеток с помощью NaCl , но не маннитола приводила к накоплению ионов Na^+ внутри клеток, несмотря на активацию Na, K-ATPазы , а также сопровождалась уменьшением их эквивалентной константы упругости. Количество мРНК *IL1 α* снижалось при увеличении осмолярности внеклеточной среды, а количество мРНК *ATF3*, *PAR2* и *PTGS2* увеличивалось только в ответ на повышение концентрации NaCl . При этом в условиях наших экспериментов мы не детектировали изменения экспрессии осмопротекторного транскрипционного фактора NFAT5. Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение внеклеточной концентрации Na^+ в физиологическом диапазоне является независимым фактором, который влияет на внутриклеточное соотношение $\text{Na}_i^+/\text{K}_i^+$ и регулирует экспрессию некоторых генов (в частности, *ATF3*, *PAR2*, *PTGS2*) в клетках эндотелия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: натрий, калий, Na, K-ATPаза , эндотелий, регуляция транскрипции.

DOI: 10.31857/S0320972522050062, **EDN:** ATKDKW

ВВЕДЕНИЕ

Градиент ионов Na_i^+ и K_i^+ на плазматической мембране является основой жизни любой клетки животных. Он поддерживается работой Na, K-ATPазы , и его диссипация опосредует различные ответы клеток. Изменение внутриклеточного соотношения $\text{Na}_i^+/\text{K}_i^+$ может возникать в ответ на такие стимулы, как гипоксия, воспаление, изменение осмолярности внеклеточной жидкости. Это, в свою очередь, влияет на клеточный метаболизм через процессы, регулирующие экспрессию генов.

Принятые сокращения: OPX – оптическая разность хода; ТХУ – трихлоруксусная кислота; ФИ – фазовое изображение; ATF3 – транскрипционный фактор 3, зависимый от циклического AMP; FOS – транскрипционный фактор семейства AP-1; IL1 α – интерлейкин 1 α ; NFAT5 – ядерный фактор активированных T-клеток 5; NOS3 – эндотелиальная синтаза оксида азота; PAR2 – активируемый протеазой рецептор 2; PTGS2 – простагландин-эндопероксид синтаза 2.

* Адресат для корреспонденции.

В настоящее время в литературе представлено множество данных о том, что обработка различных типов клеток высокими концентрациями NaCl приводит к приобретению ими провоспалительного фенотипа [1]. С этой точки зрения эндотелий представляет особый интерес, так как он, выстилая стенки сосудов, находится в непосредственном контакте с плазмой крови, где концентрация ионов $[\text{Na}^+]_o$ колеблется обычно в пределах 128–140 мМ [2]. В то же время концентрация ионов $[\text{Na}^+]_o$ при некоторых состояниях организма (обезвоживание, старение, перенесённые инфекции, оперативное вмешательство), именуемых гипо- и гипернатриемией, может быть меньше 128 мМ, а также превышать 165 мМ соответственно [3–5]. Несмотря на то что этот параметр строго контролируется и в нормальных физиологических состояниях практически постоянен, концентрация ионов Na^+ в тканях варьирует. Так, в обширном исследовании Minegishi et al. [6] было показано, что при долговременном потреблении чрезмерного количества NaCl (5 г/день) избыток Na^+ не вы-

водится почками, а накапливается в тканях, клетки которых имеют обширную сеть гликозаминогликанов (в частности, в коже и мышцах). При некоторых патологических состояниях (например, диабет 1-типа и хроническая почечная недостаточность) наблюдается нарушение целостности сети гликозаминогликанов, что сопровождается высвобождением ионов Na^+ и изменением его локальной концентрации [7]. Для нормального функционирования эндотелия его клетки должны обладать определённой поверхностной жёсткостью. Это физическая характеристика клеток, которая зависит в первую очередь от состояния гликокаликса (у эндотелиальных клеток эта структура хорошо развита и представляет собой обширную сеть прикреплённых к мембране клетки гликозаминогликанов). Считается, что он выполняет роль своеобразного «натриевого буфера». Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что избыток ионов $[\text{Na}^+]_o$ нарушает целостность эндотелиального гликокаликса, что влечёт за собой вход Na^+ внутрь клетки с последующей полимеризацией примембранного G-актина. Суммарно эти события приводят к увеличению жёсткости эндотелиальной клетки, сопровождающейся нарушением барьерной функции мембраны эндотелия и снижением продукции оксида азота [8].

Повышение внеклеточной концентрации $[\text{Na}^+]_o$, в свою очередь, будет приводить к увеличению осмолярности внеклеточной среды, что повлечёт за собой уменьшение объёма клетки с последующим регуляторным его увеличением за счёт работы различных транспортеров, обеспечивающих внутриклеточный транспорт ионов и воды. Вследствие этих событий происходит увеличение внутриклеточной ионной силы, что не может не сказаться на функционировании макромолекул [9]. Одним из самых известных механизмов адаптации клетки к таким условиям можно считать регуляцию экспрессии генов с участием транскрипционного фактора NFAT5, который, как считается, чувствителен к увеличению внутриклеточной ионной силы. NFAT5 впервые был идентифицирован в клетках почечной медуллы как осмопротекторный фактор, позже было показано, что он обеспечивает клеточный ответ на различные стимулы, не связанные с увеличением осмолярности внеклеточной среды, такие как ишемия, гипоксия, метаболический стресс и др. [10].

Наши предыдущие исследования убедительно свидетельствуют о том, что дисбаланс Na^+/K^+ вследствие ингибирования Na,K-АТФазы у бабином или за счёт инкубации клеток в бескальциевой среде сам по себе вызывает обширные изме-

нения транскриптома в различных типах клеток через Ca_i^{2+} -независимые механизмы [11, 12]. Эти эксперименты позволили нам идентифицировать Na^+/K^+ -чувствительные гены. Среди них есть гены раннего ответа, многие из которых кодируют белки, являющиеся транскрипционными факторами (*FOS*, *ATF3*), а также гены провоспалительного ответа (*IL1 α* , *PTGS2*, *PAR2*).

Ингибирование Na,K-АТФазы существенно увеличивает внутриклеточное соотношение Na^+/K^+ , в связи с этим целью настоящей работы было определение характера и механизма воздействия кратковременных изменений концентрации NaCl во внеклеточной среде в физиологическом диапазоне на экспрессию отдельных транскрипционных факторов (*FOS*, *ATF3*, *NFAT5*), провоспалительных генов (*IL1 α* , *PTGS2*, *PAR2*), а также эндотелиальной NO синтазы (*NOS3*), которая необходима для нормального функционирования сердечно-сосудистой системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе были использованы реактивы следующих фирм-производителей: RbCl («Chemimpex», США); ТХУ, набор для усиленной хемилюминесценции SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, реагент Trizol, коктейль ингибиторов фосфатаз 100X Halt™, буфер RIPA («ThermoFisher Scientific», США); коктейль ингибиторов протеаз («Amresco», США); тиорфан («Cayman Chemical», США); NaCl и KCl («MP Biomedicals», США); маннитол («AppliChem», Германия); MgCl_2 («Honeywell», США); вторичные антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Millipore», США); антитела против NFAT5 («ThermoFisher Scientific»); антитела против β -актина, ATF3 и PTGS2 («Cell Signaling Technology», США); колонки для выделения РНК Quick-RNA MicroPrep («Zymo Research», США); набор для проведения обратной транскрипции ImProm-ИТМ Reverse Transcription System («Promega», США); набор для выделения ДНК из гелей QIAquick Gel Extraction Kit («Qiagen», США). Если не указано иное, все реактивы были особо чистой квалификации.

Культура клеток. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) («Cell Applications», США) культивировали до 4-го пассажа при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 , заменяя ростовую среду («Cell Applications») каждые 48 ч. Затем клетки высевали в 6-луночные планшеты, содержащие среду для роста эндотелиальных клеток при плотности 2×10^4 клеток на лунку, и

выдерживали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂, заменяя ростовую среду каждые 48 ч. Через 5–7 дней после посева клетки достигали 80–85%-ной конfluenceности и далее инкубировались в присутствии нормальной (в стандартной среде для культивирования клеток, содержащей 125 мМ Na⁺) или повышенной концентрации Na⁺ в течение 3 ч. С целью увеличения концентрации Na⁺ до 150, 160 и 170 мМ в контрольную ростовую среду вносили дополнительно 25, 35 и 45 мМ NaCl соответственно. Так как добавление NaCl в среду вызывает не только увеличение концентрации Na⁺ и Cl⁻ в среде, но и повышает её осмолярность, в качестве контроля мы также использовали маннитол, который, в отличие от NaCl, является непроницающим в клетку и недиссоциирующим осмолитом. В связи с этим контроль осмолярности осуществляли путём внесения в лунки, содержащие ростовую среду, дополнительно 50, 70 и 90 мМ маннитола с последующей инкубацией клеток в течение 3 ч. Для ингибирования Na,K-АТФазы и увеличения внутриклеточной концентрации Na⁺ к клеткам, содержащимся в контрольной среде, добавляли 0,1 мкМ убаина и инкубировали в течение 3 ч.

Определение внутриклеточного содержания Na⁺, K⁺ и Rb⁺ методом атомно-абсорбционной спектроскопии. После окончания инкубации планшеты помещали в лёд, среду отбрасывали, а клетки промывали трижды 3 мл ледяного раствора 0,1 М MgCl₂. Затем в каждую лунку вносили по 1,5 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и инкубировали в течение нескольких часов при 4 °С, после чего содержимое лунок соскребали и переносили под ламинарным воздушным потоком в пробирки типа эппендорф. Полученные образцы центрифугировали в течение 20 мин при 18 000 g, супернатант отбирали в отдельные пробирки под ламинарным потоком воздуха, остатки ТХУ аспирировали вакуумным насосом, после чего осадок растворяли в 0,1 М NaOH при 65 °С в течение 1 ч и определяли в нём концентрацию белка методом Лоури [13].

Содержание Na⁺ и K⁺ в экстрактах ТХУ измеряли методом пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии на спектрометре «Квант-2м1» («Кортек», Россия) в пропано-воздушной смеси при длине волны 589 нм и 766,5 нм соответственно. Для калибровки использовали растворы KCl (0,5–4 мг/литр K⁺) и NaCl (0,05–2 мг/литр Na⁺), содержащие 5% ТХУ. Содержание Rb⁺ определяли тем же методом при длине волны 780 нм, используя в качестве калибровки раствор RbCl (0,2–4 мг/литр Rb⁺), содержащий 5% ТХУ.

В части экспериментов мы оценивали внутриклеточный вход Rb⁺, который является аналогом K⁺. В отличие от K⁺, внутриклеточная концентрация [Rb⁺]_i крайне низка, в связи с этим зафиксировать незначительные изменения его входа в клетку легче. Кроме того, основная часть транспорта Rb⁺ обеспечивается Na,K-АТФазой (которая связывает K⁺ и активируется им так же, как и ионами Rb⁺), а дополнительный транспорт производится Na,K,2Cl-котранспортёром и K-каналами [14]. Таким образом, вход Rb⁺ по большей мере отражает активность Na,K-АТФазы. Клетки эндотелия пупочной вены человека инкубировали при условиях, указанных выше, после чего вносили в каждую лунку 2,5 мМ RbCl и инкубировали в течение 10 мин, поскольку область линейной зависимости входа Rb⁺ внутрь клетки от времени составляет ~10 мин [14]. После окончания инкубации планшеты помещали в лёд, среду отбрасывали, а клетки промывали трижды 3 мл ледяного раствора 0,1 М MgCl₂, и далее проводили подготовку проб вышеописанным способом. Содержание Na⁺, K⁺ и Rb⁺ в каждой лунке нормировали на количество белка в той же лунке.

Измерение клеточного объема HUVEC проводили с помощью метода DISUR (Double Image Surface Reconstruction Technique), используя прикрепленные клетки, которые предварительно инкубировали в течение 1 ч в гиперосмотических средах, содержащих 180 мМ Na⁺ или 125 мМ Na⁺ в присутствии 110 мМ маннитола. В качестве контрольных образцов использовали клетки, инкубированные в течение 1 ч в среде, содержащей 125 мМ Na⁺. Метод DISUR предполагает трёхмерную реконструкцию формы клеток на основе двух обычных микроскопических изображений клеток, полученных в двух перпендикулярных направлениях [15]. Изображения клеток с бокового и верхнего ракурсов получали с помощью двух независимых миниатюрных камер Moticam 350 с зарядовой связью («Motic Instruments Inc.», Канада) с программным обеспечением Motic с интервалом 10–60 с, чтобы тщательно отслеживать быстрые изменения объёма. Изображения служили для создания набора топографических кривых поверхности клетки из оцифрованного профиля бокового вида и контура основания. Объём клетки рассчитывали по реконструированной топографической модели клетки с помощью программы MATLAB («Math Works, Inc.», США).

Оценка флуктуаций и определение эквивалентной константы упругости мембран клеток эндотелия с использованием лазерного интерференционного микроскопа. Исследование проводилось с

помощью автоматизированного интерференционного микроскопа МИА-Д, сконструированного на основе интерферометра Линника МИИ-4 («ЛОМО», Россия) во Всероссийском научно-исследовательском институте оптико-физических измерений. Данная методика позволяет получить фазовое изображение (ФИ) объекта (можно количественно оценить значение фазы или пропорциональное значение — разность оптических путей в каждой точке ФИ). Среднеквадратичная амплитуда колебаний толщины клеточной мембраны, s_t , используется для оценки величины колебаний мембраны живой клетки. Процедура измерения подробно описана в работе Yusipovich et al. [16]. Вкратце процедура измерений выглядит следующим образом: (а) запись серии ФИ (512 изображений с частотой 25 Гц); (б) расчёт z-проекции серии ФИ, представляющей собой проекцию сложенных изображений вдоль оси, перпендикулярной плоскости изображения, и содержащей среднеквадратичное значение амплитуды колебаний временной разности оптических путей (ОРХ) каждого пикселя проекции; (в) вычисление среднего значения среднеквадратичного колебания амплитуды временного колебания ОРХ для всей z-проекции клетки (без значений от границы клетки); (г) вычисление среднего значения среднеквадратичного колебания амплитуды временного колебания ОРХ s_{cell} только для клетки без шума; (д) вычисление значения s_t [17]:

$$s_t = s_{cell}/(n - n_0),$$

где n — показатель преломления клетки (1,404); n_0 — показатель преломления среды (1,335) [18]. Затем значение среднеквадратичной амплитуды колебаний клеточной мембраны, s_t , использовали для расчёта константы упругости мембран, k_e , по формуле [19]:

$$k_e = k_B T/s_t^2,$$

где k_B — константа Больцмана, T — температура (в Кельвинах). Вертикальное разрешение было равно 1,9 нм; горизонтальное разрешение составляло ~0,5 мкм; повторяемость результатов измерений составляла менее 0,1 нм. По окончании инкубации клеток в гиперосмотических условиях (см. выше) измерения проводили при 37 °С, помещая покровное стекло с прикрепленными клетками на зеркальную поверхность (клетки к зеркалу).

Анализ транскрипции генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. По окончании эксперимента планшеты пе-

реносили на лёд, клетки HUVEC (10×10^4 клеток) промывали 2 мл ледяного раствора Хэнкса без солей Ca^{2+} и Mg^{2+} , фенолового красного и добавляли 400 мкл реагента Trizol для выделения тотальной РНК. После выделения водной фазы, содержащей нуклеиновые кислоты, с помощью хлороформа и обработки 96%-ным этанолом дальнейшие этапы выделения РНК и обработки ДНКазой осуществляли на колонках Quick-RNA MicroPrep microkit. Для реакции обратной транскрипции использовали набор ImProm-ITM Reverse Transcription System в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР в реальном времени проводили с помощью Bio-Rad Real-Time PCR System («Bio-Rad», США). Праймеры («Синтол», Россия, таблица) добавляли до конечной концентрации 160 нМ.

Режимы амплификации: 95 °С — 5 мин; 95 °С — 10 с, 58 °С — 17 с, 72 °С — 20 с, 40 циклов; кривая плавления — от 72 до 95 °С, приращение 0,5 °С — 5 с. Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Beacon Designer 7, а также с использованием поисковых баз данных NCBI и BLAT. Уровень экспрессии каждого интересующего гена рассчитывали по эталонному гену ГАФД (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) и выражали в виде $\Delta C_t = C_t$ (тестируемый ген) — C_t (ГАФД) [20]. Экспрессию гена в контрольных образцах принимали за 100%. Для проверки продуктов ПЦР их секвенировали. Электрофорез проводили в 2%-ном агарозном геле с использованием буфера ТВЕ (890 мМ Tris-(гидроксиметил) аминометан, 890 мМ борная кислота, 20 мМ ЭДТА, pH 8,3) в присутствии бромистого этидия в течение ~1 ч при напряжении 75 мВ. Продукты ПЦР извлекали из геля с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование ДНК проводилось компанией «Геном», Россия. Последовательности были выровнены с помощью программы BLAST. Все последовательности ДНК соответствовали заявленным.

Оценка экспрессии ATF3, PTGS2 и NFAT5 методом Вестерн-блоттинга. После окончания инкубации клетки трижды промывали 2 мл ледяного фосфатно-солевого буфера. Затем в лунку вносили 200 мкл буфера RIPA, содержащего 0,2 мМ фенилметилсульфонилфторида и 5 мкМ тиорфана, а также коктейль ингибиторов протеаз. Полученную суспензию переносили в пробирку типа эппендорф и подвергали её обработке ультразвуком («Marshall Scientific», США) для разрушения геномной ДНК. В полученных образцах измеряли концентрацию белка методом Лоури [13]. Разделение белков проводили методом электрофореза в ПААГ в денату-

Последовательности используемых в исследовании праймеров

| Символьное обозначение гена | Название продукта гена | Последовательность олигонуклеотида | Длина ПЦР-продукта, п.н. |
|-------------------------------|--|---|--------------------------|
| <i>FOS</i> | транскрипционный фактор семейства AP-1 | For: 5'-GCAAGGTGGAACAGTTATCTC3'; Rev: 5'-GCAGACTTCTCATCTTCTAGTTG-3' | 154 |
| <i>ATF3</i> | фактор транскрипции 3, зависимый от циклического AMP | For: 5'-GAGGCGACGAGAAAAGAAATAAG-3'; Rev: 5'-CCTTCAGTTCAGCATTACAC-3' | 119 |
| <i>PAR2</i> | рецептор, активируемый протеазой 2 | For: 5'-CCATCCAAGGAACCAGTAGATC-3'; Rev: 5'-GTGAGGACAGATGCAGAAAAC-3' | 136 |
| <i>NOS3</i> | эндотелиальная синтаза оксида азота | For: 5'-GCAACCACATCAAGTATGCC-3'; Rev: 5'-TGTTCAGATTCCGGAAGTCTC-3' | 102 |
| <i>PTGS2</i> | простагландин-эндопероксид синтаза 2 | For: 5'-GTATGTATGAGTGTGGGATTTGAC-3'; Rev: 5'-CTTGAAGTGGGTAAGTATGTAGTG-3' | 156 |
| <i>IL1α</i> | интерлейкин-1 α | For: 5'-GAAGAAGACAGTTCCTCCATTG-3'; Rev: 5'-TTCAGAGATACTCAGAGACACAG-3' | 120 |
| <i>NFAT5</i> | ядерный фактор активированных Т-клеток 5 | For: 5'-GCTTACCACGGACAACAAAG-3'; Rev: 5'-GCCTTGCTGTGTCTATCTTC-3' | 220 |
| <i>GAPDH</i> | глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа | For: 5'-CCTGGTATGACAACGAATTTG-3'; Rev: 5'-CAGTGAGGGTCTCTCTTCC-3' | 131 |

рирующих условиях [21], используя 4%-ный концентрирующий и 10%-ный разделяющий гели. Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) методом полусухого электропереноса (режим «Standard SD mode» в течение 30 мин) в Tris-глициновом буфере (25 мМ Tris-HCl, 192 мМ глицин, 10% этанола, pH 8,3) на приборе Trans-blot Turbo («Bio-Rad», США). По окончании электропереноса нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,1% (v/v) Tween-20 и 5% сухого молока, в течение 1 ч, после чего проводили инкубацию в солевом Tris-HCl-буфере, TBS (20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,6), содержащем 5% сухого молока и антитела против ATF3 (в разведении 1 : 500), PTGS2 (в разведении 1 : 500) или NFAT5 (в разведении 1 : 1000), при 4 °С и постоянном перемешивании в течение ночи. Общее количество детектируемых белков нормировали на содержание β -актина. Для этого мембрану инкубировали, как описано выше, используя антитела против β -актина (разведение 1 : 1000). После этого мембраны трижды промывали 15 мл буфера TBS, содержащего 0,1% (v/v) Tween-20, и инкубировали в растворе TBS в присутствии 5% сухого молока и вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (в разведении 1 : 25 000), в течение 1 ч при постоянном переме-

шивании и комнатной температуре. Визуализацию комплексов антиген–антитело проводили методом усиленной хемилюминесценции с помощью набора SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate ECL и прибора Endolab ChemiDoc XRSplus («Bio-Rad»). Относительное содержание белка оценивали путём денситометрии, используя программное обеспечение ImageLab™ 3.0 («Bio-Rad»).

Статистический анализ данных, полученных с использованием микроскопии, проводили с помощью программного обеспечения Graphpad Prism 9.0 («GraphPad Software», США). Для проверки нормальности данных применяли обобщённый тест Д'Агостино–Пирсона ($p < 0,05$). Остальные статистические процедуры указаны в подписях к рисункам.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поверхностная жёсткость клеток эндотелия пупочной вены человека зависит от концентрации $[Na^+]$, а не от осмолярности внеклеточной среды. Поддержание нормального объёма клетки является необходимым условием для её выживания. Изменение этого параметра достигается за счёт регуляции транспорта воды через плазматическую мембрану, что, в свою очередь,

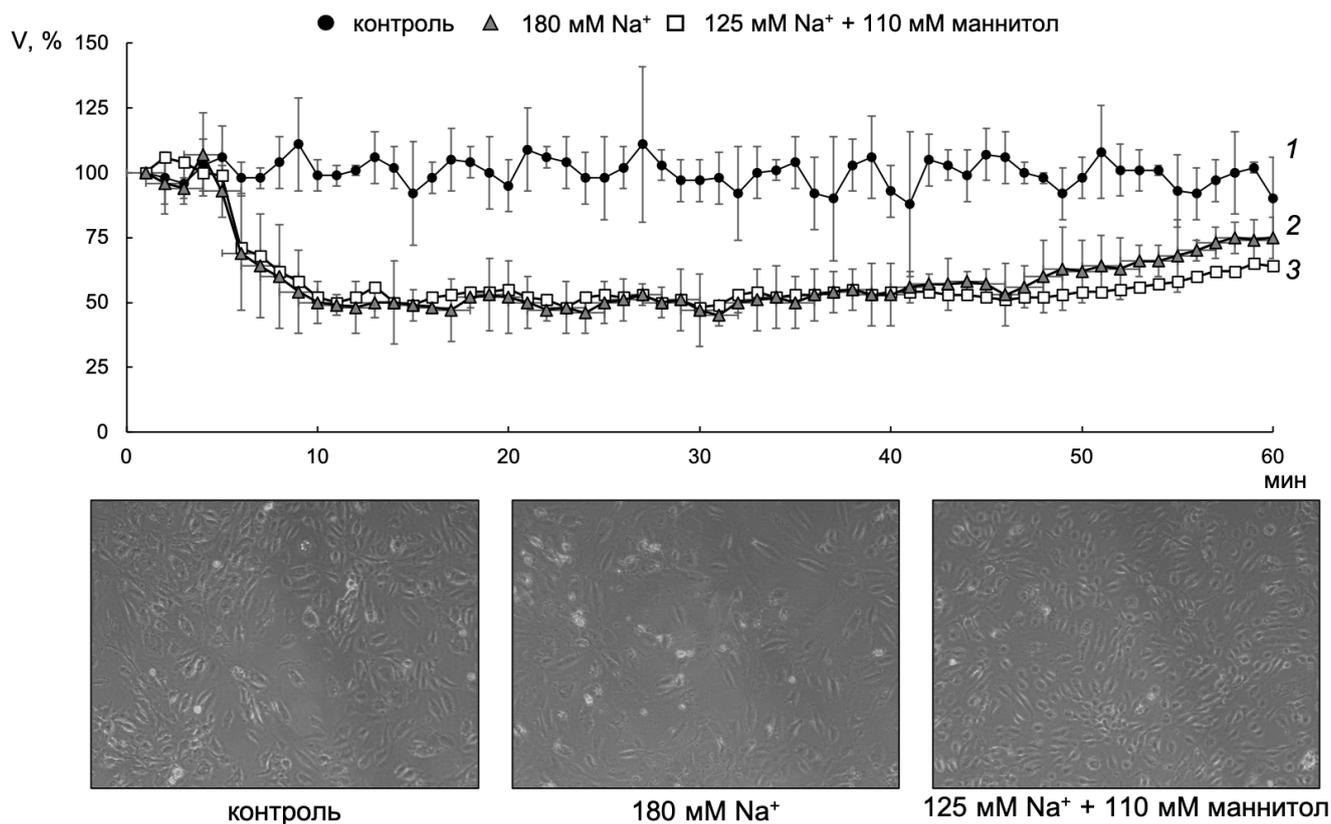


Рис. 1. Изменение объёма клеток эндотелия пупочной вены человека в зависимости от осмолярности внеклеточной среды. Клетки инкубировали в культуральной среде, содержащей 125 mM Na⁺ (1); в культуральной среде, содержащей 180 mM Na⁺ (2); в культуральной среде, содержащей 125 mM Na⁺ и 110 mM маннитола (3) в течение 1 ч. Исходный объём клеток принят за 100%. Представлены средние значения и стандартное отклонение (SD) четырёх независимых экспериментов

опосредовано изменением активности различных переносчиков [22]. Увеличение или уменьшение осмолярности внеклеточной среды приводит к изменению объёма клеток, что влечёт за собой изменение экспрессии ряда генов. Для создания гиперосмотических условий мы использовали два подхода: в первом случае в культуральную среду добавляли NaCl так, чтобы концентрация [Na⁺]_o была равной 180 mM, во втором — 110 mM маннитола поверх 125 mM [Na⁺]_o для контроля осмолярности среды (см. «Материалы и методы»). В обоих случаях происходило одинаковое уменьшение объёма клеток (до 50% от исходного значения), которое достигало максимума через 10 мин после помещения клеток в гиперосмотические условия. По мере увеличения времени инкубации мы регистрировали так называемое регуляторное увеличение объёма (RVI) клеток (рис. 1).

Известно, что для живых клеток характерны локальные колебания мембраны, называемые также динамическими флуктуациями [23]. Амплитуда колебаний определяется свойствами са-

мой клеточной мембраны, она зависит также от осмолярности, бокового поверхностного натяжения, клеточной адгезии [24]. Кроме того, колебания мембран могут быть обусловлены работой ионных насосов и состоянием цитоскелета клетки [25]. Регистрируя колебания мембран, можно оценить эквивалентную константу упругости клеточных мембран, k_e , которая зависит от модуля упругости, бокового поверхностного натяжения и в меньшей степени от других параметров [19]. Таким образом, получив значения констант упругости клеточных мембран в ответ на исследуемые стимулы, мы можем оценить изменения поверхностной жёсткости клетки. Ранее мы показали, что для изучения этого параметра метод лазерной интерференционной микроскопии также применим, как и метод силовых кривых [26].

Для нормального функционирования эндотелиальных клеток важна их «пластичность» [27]. Исследование влияния повышенной осмолярности внеклеточной среды на константу упругости мембран клеток эндотелия пу-

почной вены человека показало, что инкубация HUVEC в среде, содержащей 150–170 мМ $[Na^+]_o$, приводит к уменьшению значения k_e . В то же время увеличение осмолярности внеклеточной среды посредством добавления маннитола не оказывало влияния на этот параметр (рис. 2). Таким образом, несмотря на изменение клеточного объёма в результате увеличения ионной силы внеклеточной среды, поверхностная жёсткость эндотелиальных клеток зависела именно от внеклеточной концентра-

ции $[Na^+]_o$, а не от осмолярности внеклеточной среды.

Увеличение концентрации $[Na^+]_o$ активирует Na,K-АТФазу в клетках эндотелия пупочной вены человека. В предыдущих работах было показано, что диссипация градиента Na^+_i/K^+_i за счёт ингибирования Na,K-АТФазы приводит к транскриптомным изменениям в различных типах клеток [11, 12]. Логично предположить, что в ответ на увеличение $[Na^+]_o$ происходит усиление входа этого иона внутрь клетки и увеличе-

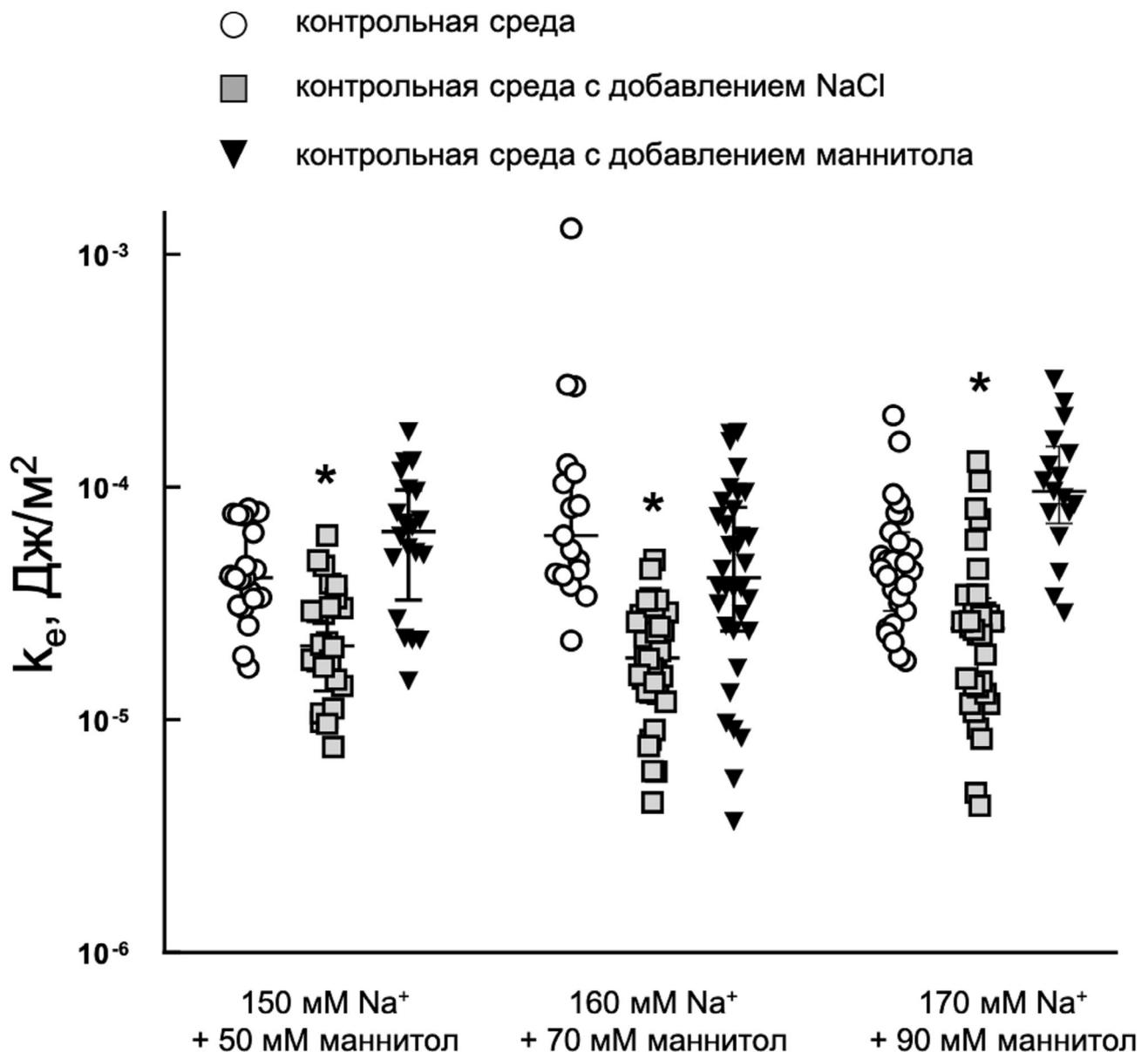


Рис. 2. Влияние осмолярности внеклеточной среды на значение эквивалентной константы упругости клеточных мембран клеток эндотелия пупочной вены человека. Данные представлены в виде экспериментальных значений (точки) и медианы с межквартильным размахом (черные линии). Значимые различия были рассчитаны с помощью теста Краскела–Уоллиса, $p < 0,05$. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными клетками, инкубированными в течение 3 ч

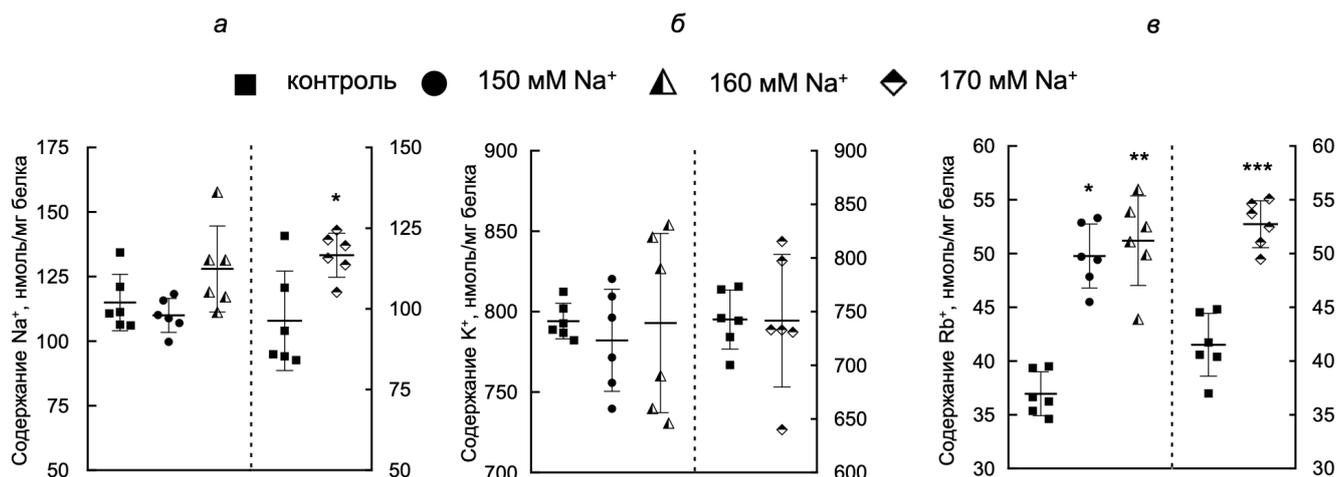


Рис. 3. Зависимость содержания ионов Na^+ (а), K^+ (б), Rb^+ (в) в клетках эндотелия пупочной вены человека от концентрации Na^+ во внеклеточной среде. Клетки инкубировали в среде, содержащей 150, 160 и 170 мМ Na^+ , в течение 3 ч. Значимые различия были рассчитаны с помощью теста Краскела–Уоллиса, $p < 0,05$. * $p = 0,0192$; ** $p = 0,0017$; *** $p = 0,0003$ по сравнению с контрольными образцами

ние внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ . В настоящей работе исследовано влияние $[\text{Na}^+]_o$ в концентрации 150–170 мМ в течение 3 ч на содержание одновалентных катионов в клетках эндотелия пупочной вены человека (рис. 3). При выдерживании клеток в среде с концентрацией натрия в диапазоне 150–160 мМ мы не обнаружили статистически достоверного изменения содержания этого иона в клетках. Однако инкубация клеток в присутствии 170 мМ Na^+ приводила к увеличению внутриклеточного содержания натрия примерно на 20% (рис. 3, а). В то же время внутриклеточное содержание K^+ в условиях наших экспериментов практически не изменялось (рис. 3, б). Поскольку содержание этого иона в клетке велико, то небольшие изменения этого параметра сложно детектировать. Поэтому мы оценили вход Rb^+ в клетки, так как Rb^+ является аналогом K^+ , и его используют для изучения транспорта K^+ [14]. Инкубация HUVEC в присутствии 150, 160 и 170 мМ $[\text{Na}^+]_o$ сопровождалась достоверным усилением входа Rb^+ в клетки на 35, 39 и 27% соответственно (рис. 3, в). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что при увеличении внеклеточной концентрации $[\text{Na}^+]_o$ происходит его усиленный транспорт внутрь клетки с последующей активацией Na, K-АТФазы, что согласуется с нашими предыдущими наблюдениями [26].

В качестве контроля осмолярности внеклеточной среды мы использовали непроникающий осмолит маннитол. Однако мы не обнаружили никаких изменений во внутриклеточном содержании и транспорте одновалентных кати-

онов в присутствии дополнительно добавленного маннитола до концентрации 30–90 мМ (данные не представлены). Таким образом, можно заключить, что увеличение внеклеточной концентрации $[\text{Na}^+]_o$ (но не осмолярности) оказывает влияние на транспорт Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану и сопровождается активацией Na, K-АТФазы.

Гиперосмотическая стимуляция клеток эндотелия пупочной вены человека в течение 3 ч изменяет количество мРНК некоторых Na^+/K^+ -чувствительных генов и не оказывает влияния на экспрессию NFAT5. Задачей данного исследования было изучение эффекта диссипации градиента Na^+/K^+ на транскрипцию некоторых генов в клетках эндотелия в ответ на гиперосмотическую стимуляцию. Ранее мы показали, что количество мРНК генов раннего ответа (*EGR1*, *FOS*, *ATF3*, *ZFP36*, *JUN*) в клетках эндотелия, инкубируемых в гиперосмотических условиях, возрастает за счёт увеличения $[\text{Na}^+]_i$, а не уменьшения клеточного объёма [28]. В этой работе мы изучили, как инкубация клеток в присутствии $[\text{Na}^+]_o$ в концентрации 150–170 мМ в течение 3 ч влияет на транскрипцию генов *FOS*, *ATF3*, *PAR2*, *NOS3*, *PTGS2* и *IL1 α* . В качестве контроля влияния осмолярности внеклеточной среды на транскрипцию этих генов использовали 50–90 мМ маннитол, который добавляли в среду инкубации. Положительным контролем служили клетки, инкубированные в присутствии 0,1 мкМ убаина в течение 3 ч. Такое воздействие приводит к ингибированию Na, K-АТФазы и увеличению внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ [28].

В условиях наших экспериментов убаин увеличивал количество мРНК *FOS* в 4 раза, а *ATF3*, *PTGS2* и *IL1 α* – в 1,5–2 раза, при этом уровень мРНК *NOS3* и *PAR2* не изменялся (рис. 4). Количество мРНК *ATF3* и *PAR2* увеличилось в 3 и в 1,5 раза соответственно только в присутствии 170 мМ $[Na^+]_o$ (рис. 4, 5, *a*). Количество мРНК *PTGS2* возросло примерно в 2 раза в ответ на увеличение $[Na^+]_o$ в диапазоне 160–170 мМ. Ни 150 мМ $[Na^+]_o$, ни маннитол не оказывали никакого эффекта на транскрипцию этого гена (рис. 5, *b*). Количество мРНК *IL1 α* уменьшилось примерно в 2 раза как при действии 150–170 мМ $[Na^+]_o$, так и в присутствии дополнительно добавленного маннитола в концентрации 50–90 мМ. Увеличение осмолярности внеклеточной среды за счёт добавления NaCl или маннитола в среду инкубации не повлияло на транскрипцию генов *FOS* и *NOS3* (рис. 4). Таким образом, мы можем заключить, что транскрипция *PTGS2* и *ATF3* имеет Na^+ -зависимый характер, тогда как транскрипция *IL1 α* зависит от осмолярности внеклеточной среды. Регуляция транскрипции *PAR2*, по всей видимости, опреде-

ляется внеклеточной концентрацией Na^+ . В то же время количество белка ATF3 увеличивалось в присутствии 160 и 170 мМ Na^+ (рис. 5, *b*), тогда как существенного изменения экспрессии *PTGS2* не наблюдалось (рис. 5, *c*).

Одним из участников сигнального каскада, приводящего к изменению транскрипции генов в клетках, подверженных осмотическому стрессу, является осмотический транскрипционный фактор NFAT5 [9, 29]. Его мишенью, в частности, может являться *PTGS2* [30]. Несмотря на то что мы детектировали увеличение мРНК этого гена в клетках, подверженных действию убаина и 160–170 мМ $[Na^+]_o$, нам не удалось зафиксировать достоверного изменения экспрессии NFAT5 как на уровне мРНК (рис. 6, *a*), так и на уровне содержания белка (рис. 6, *b*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе были исследованы эффекты кратковременного увеличения внеклеточной концентрации $[Na^+]_o$ на экспрессию от-

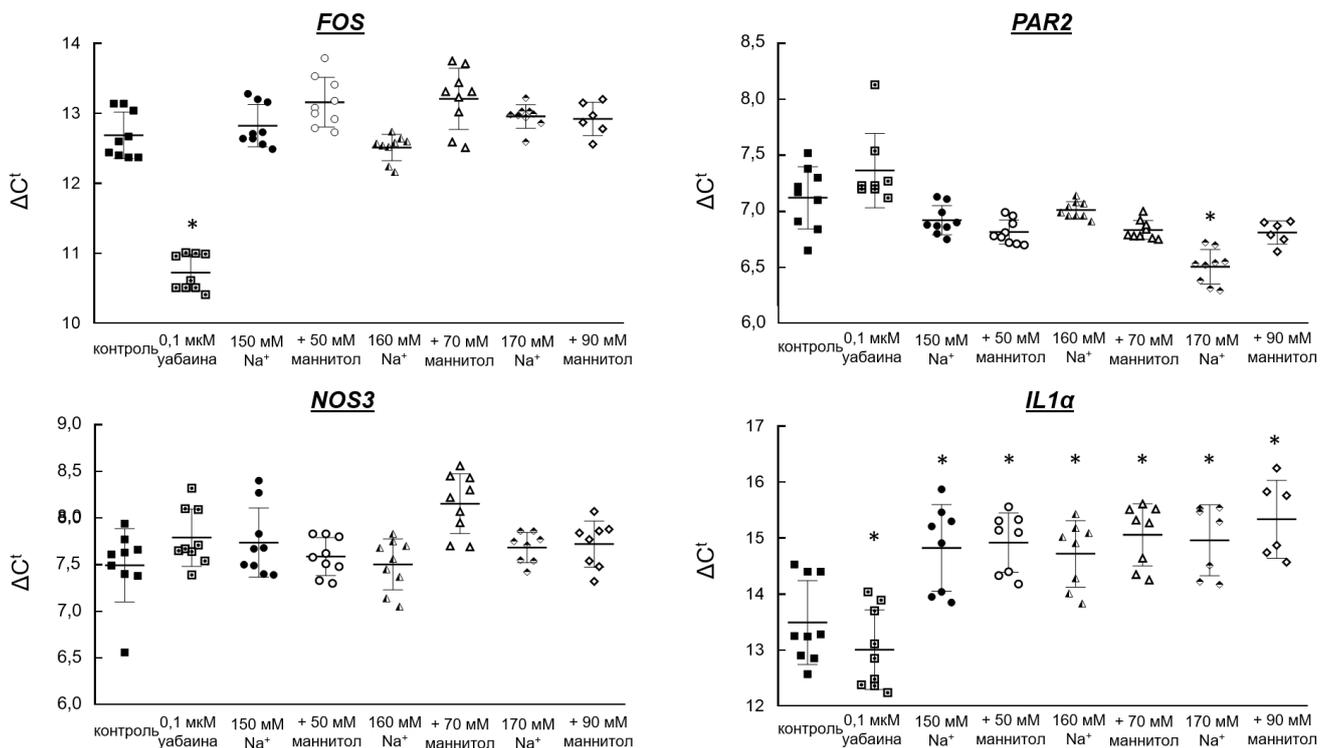


Рис. 4. Влияние осмолярности и убаина на уровень мРНК генов *FOS*, *PAR2*, *NOS3* и *IL1 α* в эндотелиальных клетках почечной вены человека. Для повышения концентрации Na^+ до 150, 160 и 170 мМ к контрольной ростовой среде, содержащей 125 мМ Na^+ , добавляли 25, 35 и 45 мМ NaCl соответственно. Исоосмолярность контролировали путём добавления 50, 70 и 90 мМ маннитола в контрольную среду. Для ингибирования Na,K-АТФазы и увеличения внутриклеточной концентрации Na^+ в клетки, содержащиеся в контрольной среде, добавляли 0,1 мкМ убаина. Инкубацию проводили в течение 3 ч. Значимые различия рассчитывали с помощью One-way ANOVA, $p < 0,05$. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными образцами

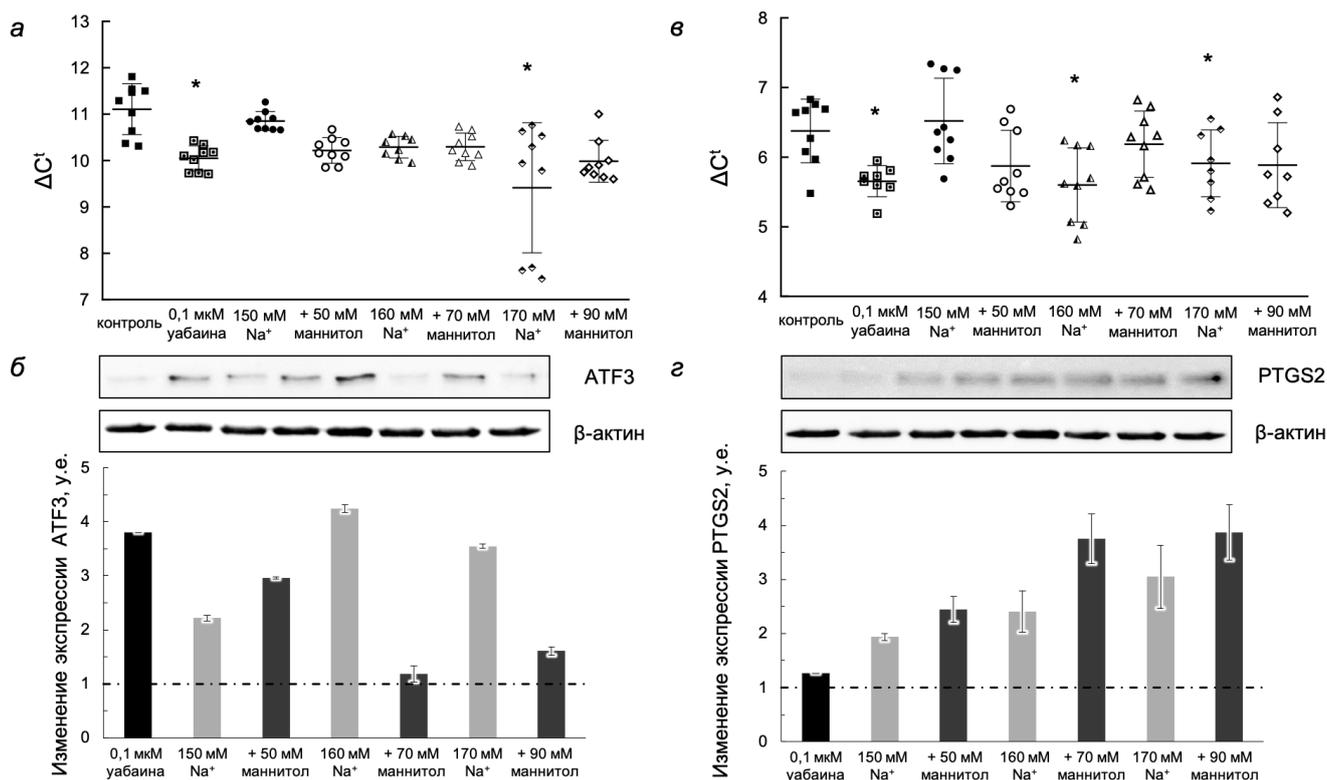


Рис. 5. Влияние осмолярности и уабаина на уровень мРНК гена и количество белка ATF3 (а и б) и PTGS2 (в и г) в эндотелиальных клетках пупочной вены человека. Для повышения концентрации Na⁺ до 150, 160 и 170 мМ к контрольной ростовой среде, содержащей 125 мМ Na⁺, добавляли 25, 35 и 45 мМ NaCl соответственно. Изоосмолярность контролировали путём добавления 50, 70 и 90 мМ маннитол в контрольную среду. Для ингибирования Na⁺,K-АТФазы и увеличения внутриклеточной концентрации Na⁺ в клетки, содержащиеся в контрольной среде, добавляли 0,1 мкМ уабаина. Инкубацию проводили в течение 3 ч. Значимые различия рассчитывали с помощью One-way ANOVA, $p < 0,05$. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными образцами

дельных транскрипционных факторов (*FOS*, *ATF3*, *NFAT5*), провоспалительных генов (*IL1α*, *PTGS2*, *PAR2*), а также эндотелиальной NO синтазы (*NOS3*) и эквивалентную константу упругости мембран клеток эндотелия, характеризующую их жёсткость. Роль транскрипционного фактора NFAT5 в регуляции экспрессии генов в клетках, подверженных гиперосмотическому стрессу, хорошо описана в литературе [29]. Однако стоит иметь в виду, что NFAT5-опосредованная регуляция не может рассматриваться как универсальный механизм адаптации клеток к гиперосмотическим условиям. Действительно, сайленсинг NFAT5 в макрофагах мыши не влиял на некоторые гены, транскрипция которых изменялась в условиях повышенной концентрации NaCl [31]. Кроме того, активация NFAT5 может происходить независимо от изменений осмолярности среды, также как и ответ клеток на гиперосмотическую стимуляцию может происходить с участием других факторов, таких как NO, ангиотензин II, фактор некроза опухоли α (TNF-α), трансформирующий фактор роста β (TGF-β) и др. [32].

Мы показали, что гиперосмотическая стимуляция клеток эндотелия пупочной вены человека за счёт добавления во внеклеточную среду дополнительного количества NaCl или маннитол приводит к уменьшению их объёма с последующим его регуляторным увеличением. В то же время мы детектировали увеличение поверхностной жёсткости клеток в основном в ответ на увеличение $[Na^+]_o$, а не маннитол. Таким образом, мы можем заключить, что жёсткость эндотелиальных клеток зависит от концентрации $[Na^+]_o$, а не от осмолярности внеклеточной среды. В пользу этого свидетельствуют также экспериментальные данные, которые показывают, что увеличение концентрации $[K^+]_o$ во внеклеточной среде оказывает противоположный по сравнению с $[Na^+]_o$ эффект на поверхностную жёсткость клеток эндотелия аорты быка GM7373 [33].

Инкубация HUVEC в среде, содержащей 150–170 $[Na^+]_o$, в течение 3 ч изменяла внутриклеточный ионный состав и сопровождалась усиленным входом Rb⁺ в клетки, т.е. активацией Na⁺,K-АТФазы, что мы показали и ранее [26].

При действии 160–170 мМ $[\text{Na}^+]_o$ наблюдалась тенденция к накоплению ионов Na^+ внутри клетки (рис. 3). Вероятно, это связано с увеличением поверхностной жёсткости эндотелиаль-

ных клеток: в таких условиях нарушается целостность гликокаликса, который является своеобразным буфером для ионов Na^+ [8], что приводит к усиленному входу этого иона внутрь клет-

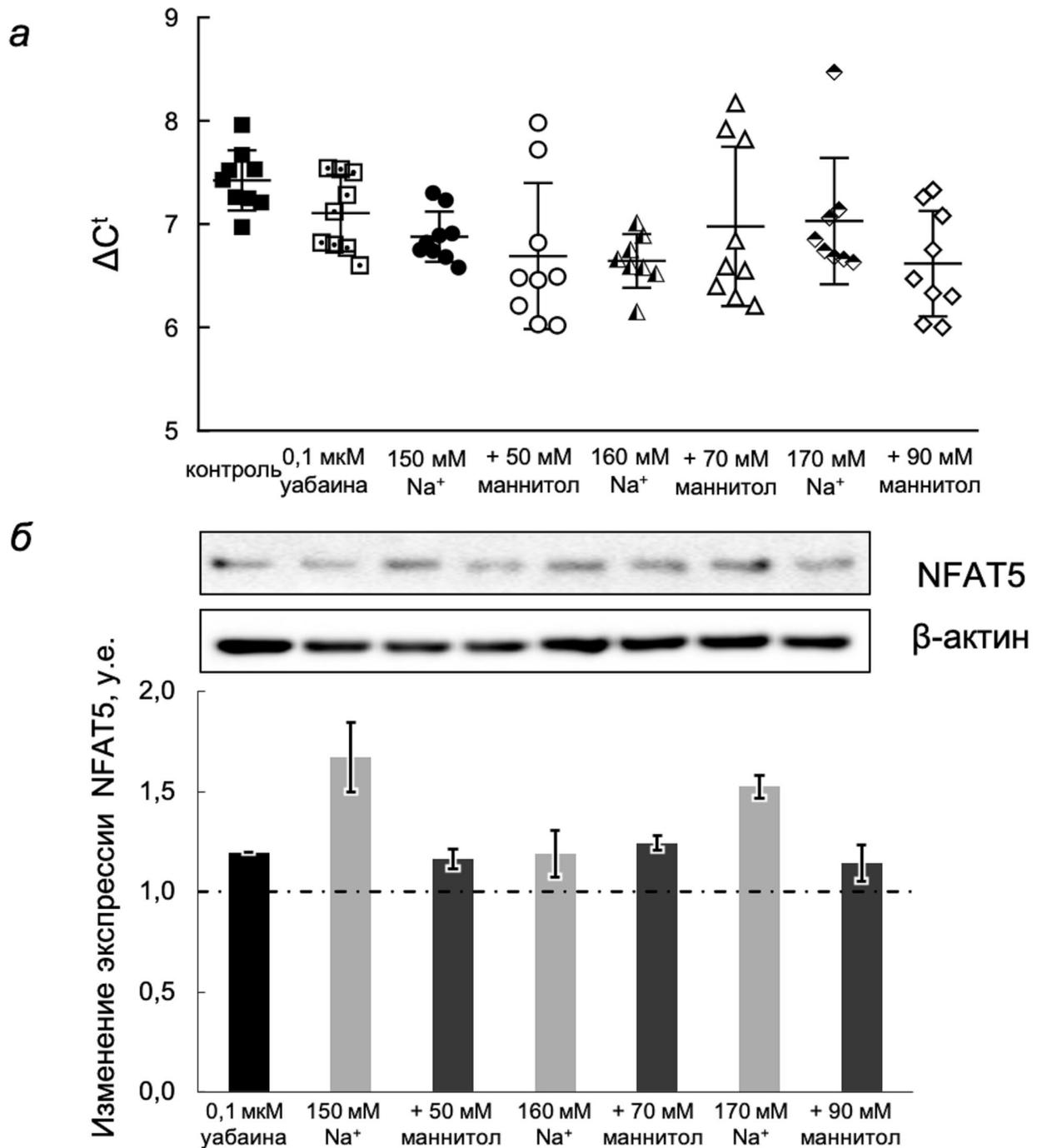


Рис. 6. Влияние осмолярности и убаина на количество мРНК (а) и общее содержание белка (б) NFAT5 в эндотелиальных клетках пупочной вены человека. Для повышения концентрации Na^+ до 150, 160 и 170 мМ к контрольной ростовой среде, содержащей 125 мМ Na^+ , добавляли 25, 35 и 45 мМ NaCl соответственно. Изоосмолярность контролировали путём добавления 50, 70 и 90 мМ маннитола в контрольную среду. Для ингибирования Na,K -АТФазы и увеличения внутриклеточной концентрации Na^+ в клетки, содержащиеся в контрольной среде, добавляли 0,1 мкМ убаина. Инкубацию проводили в течение 3 ч

ки, несмотря на активацию Na,K-АТФазы. Поскольку увеличение осмолярности внеклеточной среды за счёт маннитола не оказывало влияния на внутриклеточное содержание ионов Na^+ и K^+ , мы можем заключить, что изменение транспорта одновалентных катионов через плазматическую мембрану зависит, скорее, от концентрации этих ионов во внеклеточной среде, чем от её осмолярности.

Поскольку поддержание градиента Na^+/K^+ является критически важным для функционирования клетки животного, логично предположить, что даже незначительное его изменение может затронуть процессы экспрессии генов. Действительно, из шести тестируемых генов (*FOS*, *ATF3*, *PAR2*, *NOS3*, *PTGS2* и *IL1 α*) четыре оказались чувствительны к увеличению осмолярности внеклеточной среды (*ATF3*, *PAR2*, *PTGS2* и *IL1 α*). Нашего особого внимания заслуживают гены *ATF3* и *PTGS2*, поскольку уровень их мРНК увеличивался как в ответ на увеличение внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ при ингибировании Na,K-АТФазы убаином, так и в ответ на увеличение осмолярности внеклеточной среды с помощью NaCl, но не маннитола. Эти результаты совпадают с нашими предыдущими наблюдениями того, что регуляция транскрипции упомянутых выше генов опосредована Na^+/K^+ -зависимыми механизмами [11, 28]. Любопытным является тот факт, что транскрипция *IL1 α* увеличивается при ингибировании Na,K-АТФазы, но уменьшается в ответ на увеличение осмолярности внеклеточной среды. При этом мы не регистрировали изменение экспрессии NFAT5 как на уровне транскрипции, так и на уровне белка. Тогда как в работе Kim et al. [34] показано, что NFAT5 ингибирует транскрипцию *IL1 α* в эпителиальных клетках хрусталика человека. Не исключено, что в условиях наших экспериментов происхо-

дила транслокация NFAT5 в ядро, но мы не изучали этот аспект в данной работе. Можно предположить, что именно изменение жёсткости эндотелиальной клетки и активация механочувствительных сигнальных путей опосредует изменение транскрипции исследуемых генов [35]. Однако ранее мы показали, что увеличение $[\text{Na}^+]_o$ от 125 до 140 мМ влияет на транскрипцию генов, но не оказывает никакого эффекта на поверхностную жёсткость эндотелиальных клеток [26]. В литературе описаны данные о том, что представленность NFAT5 в клетках почечного эпителия увеличивается под действием механочувствительной нерецепторной тирозинкиназы FAK (Focal adhesion kinase) в ответ на осмотический стресс [36]. Однако мы не детектировали достоверное увеличение экспрессии NFAT5 как в присутствии 150–170 мМ $[\text{Na}^+]_o$, так и в присутствии дополнительного 50–90 мМ маннитола, несмотря на то что жёсткость клеток увеличивалась в присутствии 150–170 мМ $[\text{Na}^+]_o$.

Все эти данные демонстрируют, что увеличение $[\text{Na}^+]_o$ (и, как следствие, дисбаланс Na^+/K^+) само по себе, а не только увеличение осмолярности внеклеточной среды и/или изменение поверхностной жёсткости клетки может независимо регулировать экспрессию некоторых генов в эндотелиальных клетках.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-10009).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wenzel, U. O., Bode, M., Kurts, C., and Ehmke, H. (2019) Salt, inflammation, IL-17 and hypertension, *Br. J. Pharmacol.*, **176**, 1853-1863, doi: 10.1111/bph.14359.
2. Aramburu, J., and López-Rodríguez, C. (2019) Regulation of inflammatory functions of macrophages and T lymphocytes by NFAT5, *Front. Immunol.*, **10**, 535, doi: 10.3389/fimmu.2019.00535.
3. Zimmer, M. A., Zink, A. K., Weißer, C. W., Vogt, U., Michelsen, A., et al. (2020) Hypernatremia – a manifestation of COVID-19: A case series, *A A Pract.*, **14**, e01295, doi: 10.1213/XAA.0000000000001295.
4. Hawkins, R. C. (2003) Age and gender as risk factors for hyponatremia and hypernatremia, *Clin. Chim. Acta*, **337**, 169-172, doi: 10.1016/j.cccn.2003.08.001.
5. Staiger, R. D., Sarnthein, J., Wiesli, P., Schmid, C., and Bernays, R. L. (2013) Prognostic factors for impaired plasma sodium homeostasis after transsphenoidal surgery, *Br. J. Neurosurg.*, **27**, 63-68, doi: 10.3109/02688697.2012.714013.
6. Minegishi, S., Luft, F.C., Titze, J., and Kitada, K. (2020) Sodium handling and interaction in numerous organs, *Am. J. Hypertens.*, **33**, 687-694, doi: 10.1093/ajh/hpaa049.
7. Olde Engberink, R. H. G., Rorije, N. M. G., van den Born, B.-J. H., and Vogt, L. (2017) Quantification of nonosmotic sodium storage capacity following acute hypertonic saline infusion in healthy individuals, *Kidney Int.*, **91**, 738-745, doi: 10.1016/j.kint.2016.12.004.

8. Oberleithner, H., and Wilhelmi, M. (2015) Vascular glyco-calyx sodium store – determinant of salt sensitivity? *Blood Purif.*, **39**, 7-10, doi: 10.1159/000368922.
9. Burg, M. B., Ferraris, J. D., and Dmitrieva, N. I. (2007) Cellular response to hyperosmotic stresses, *Physiol. Rev.*, **87**, 1441-1474, doi: 10.1152/physrev.00056.2006.
10. Choi, S. Y., Lee-Kwon, W., and Kwon, H. M. (2020) The evolving role of TonEBP as an immunometabolic stress protein, *Nat. Rev. Nephrol.*, **16**, 352-364, doi: 10.1038/s41581-020-0261-1.
11. Koltsova, S. V., Trushina, Y., Haloui, M., Akimova, O.A., Tremblay, J., et al. (2012) Ubiquitous $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -sensitive transcriptome in mammalian cells: Evidence for Ca^{2+} -independent excitation-transcription coupling, *PLoS One*, **7**, e38032, doi: 10.1371/journal.pone.0038032.
12. Klimanova, E. A., Sidorenko, S. V., Smolyaninova, L. V., Kapilevich, L. V., Gusakova, S. V., et al. (2019) *Current Topics in Membranes*, Academic Press.
13. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, doi: 10.1016/0304-3894(92)87011-4.
14. Vereninov, A., Rubashkin, A., Goryachaya, T., Moshkov, A., Rozanov, Y., et al. (2008) Pump and channel K^+ (Rb^+) fluxes in apoptosis of human lymphoid cell line U937, *CPB*, **22**, 187-194, doi: 10.1159/000149796.
15. Ponomarchuk, O. O., Boudreault, F., Shiyani, A. A., Maksimov, G. V., Grygorczyk, R., et al. (2018) A method to simultaneously detect changes in intracellular Ca^{2+} concentration and cell volume, *Biophysics*, **63**, 369-374, doi: 10.1134/S000635091803020X.
16. Yusipovich, A. I., Parshina, E. Yu., Baizhumanov, A. A., Pirutin, S. K., Ivanov, A. D., et al. (2021) Use of a laser interference microscope for estimating fluctuations and the equivalent elastic constant of cell membranes, *Instr. Exp. Tech.*, **64**, 877-885, doi: 10.1134/S0020441221060129.
17. Rappaz, B., Barbul, A., Hoffmann, A., Boss, D., Korenstein, R., et al. (2009) Spatial analysis of erythrocyte membrane fluctuations by digital holographic microscopy, *Blood Cells Mol. Dis.*, **42**, 228-232, doi: 10.1016/j.bcmd.2009.01.018.
18. Yusipovich, A. I., Parshina, E. Yu., Brysgalova, N. Yu., Brazhe, A. R., Brazhe, N. A., et al. (2009) Laser interference microscopy in erythrocyte study, *J. Appl. Phys.*, **105**, 102037, doi: 10.1063/1.3116609.
19. Popescu, G., Ikeda, T., Goda, K., Best-Popescu, C. A., Laposata, M., et al. (2006) Optical measurement of cell membrane tension, *Phys. Rev. Lett.*, **97**, 218101, doi: 10.1103/PhysRevLett.97.218101.
20. Chandra, S., Narang, R., Sreenivas, V., Bhatia, J., Saluja, D., et al. (2014) Association of angiotensin II type 1 receptor (A1166C) gene polymorphism and its increased expression in essential hypertension: A case-control study, *PLoS one*, **9**, e101502, doi: 10.1371/journal.pone.0101502.
21. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
22. Lang, F. (2007) Mechanisms and significance of cell volume regulation, *J. Am. College Nutr.*, **26**, 613S-623S, doi: 10.1080/07315724.2007.10719667.
23. Brochard, F., and Lennon, J. F. (1975) Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes, *J. Phys. France*, **36**, 1035-1047, doi: 10.1051/jphys:0197500360110103500.
24. Kononenko, V. L. (2009) Flicker in erythrocytes. II. Results of experimental studies, *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, **3**, 372-387, doi: 10.1134/S1990747809040035.
25. Turlier, H., and Betz, T. (2018) Fluctuations in active membranes, ArXiv: 1801.00176.
26. Fedorov, D. A., Sidorenko, S. V., Yusipovich, A. I., Parshina, E. Y., Tverskoi, A. M., et al. (2021) Na^+/K^+ imbalance contributes to gene expression in endothelial cells exposed to elevated NaCl, *Heliyon*, **7**, e08088, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08088.
27. Lang, F. (2011) Stiff endothelial cell syndrome in vascular inflammation and mineralocorticoid excess, *Hypertension*, **57**, 146-147, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.164558.
28. Shiyani, A. A., Sidorenko, S. V., Fedorov, D., Klimanova, E. A., Smolyaninova, L. V., et al. (2019) Elevation of intracellular Na^+ contributes to expression of early response genes triggered by endothelial cell shrinkage | cell physiologist biochem, *Cell. Physiol. Biochem.*, **53**, 638-647.
29. Neuhofer, W. (2010) Role of NFAT5 in inflammatory disorders associated with osmotic stress, *Curr. Genomics*, **11**, 584-590, doi: 10.2174/138920210793360961.
30. Favale, N. O., Casali, C. I., Lepera, L. G., Pescio, L. G., and Fernández-Tome, M. C. (2009) Hypertonic induction of COX2 expression requires TonEBP/NFAT5 in renal epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **381**, 301-305, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.189.
31. Neubert, P., Weichselbaum, A., Reitingner, C., Schatz, V., Schröder, A., et al. (2019) HIF1A and NFAT5 coordinate Na^+ -boosted antibacterial defense via enhanced autophagy and autolysosomal targeting, *Autophagy*, **15**, 1899-1916, doi: 10.1080/15548627.2019.1596483.
32. Halterman, J. A., Kwon, H. M., and Wamhoff, B. R. (2011) Tonicity-independent regulation of the osmosensitive transcription factor TonEBP (NFAT5), *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **302**, C1-C8, doi: 10.1152/ajpcell.00327.2011.
33. Oberleithner, H., Callies, C., Kusche-Vihrog, K., Schillers, H., Shahin, V., et al. (2009) Potassium softens vascular endothelium and increases nitric oxide release, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 2829-2834, doi: 10.1073/pnas.0813069106.
34. Kim, G.-N., Hah, Y.-S., Seong, H., Yoo, W.-S., Choi, M.-Y., et al. (2021) The role of nuclear factor of activated T cells 5 in hyperosmotic stress-exposed human lens epithelial cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6296, doi: 10.3390/ijms22126296.
35. Chien, S. (2007) Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **292**, H1209-H1224, doi: 10.1152/ajpheart.01047.2006.
36. Neuhofer, W. (2014) Focal adhesion kinase regulates the activity of the osmosensitive transcription factor TonEBP/NFAT5 under hypertonic conditions, *Front. Physiol.*, **5**, 123, doi: 10.3389/fphys.2014.00123.

**INCREASED EXTRACELLULAR SODIUM CONCENTRATION
AS A FACTOR REGULATING GENE EXPRESSION IN ENDOTHELIUM****D. A. Fedorov, S. V. Sidorenko, A. I. Yusipovich, O. V. Bukach,
A. M. Gorbunov, O. D. Lopina, and E. A. Klimanova****Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; E-mail: klimanova.ea@yandex.ru*

There is a positive correlation between high table salt intake and endothelial dysfunction, as well as with the development of many socially significant diseases. Despite the obvious pathophysiological consequences, the early responses of the endothelium to increased NaCl in the extracellular medium remain poorly understood. Consumption of excessive amounts of salt may contribute to pathologies through signals induced by increases in extracellular sodium $[Na^+]_o$, chloride $[Cl^-]_i$ and/or increases in the osmolarity of the extracellular fluids determined by combined increases in $[Na^+]_o$ and $[Cl^-]_i$. In the present study we investigated the effects of a short-term increase in the osmolarity of the extracellular medium on gene transcription and mechanical properties of human umbilical vein endothelial cells. Hyperosmotic stimulation of these cells with NaCl but not mannitol led to the accumulation of Na^+ ions inside the cells and Na,K-ATPase activation and was accompanied by an increase in cell stiffness. Transcription of *IL1 α* decreased with increasing osmolarity of the extracellular medium, while transcription of *ATF3*, *PAR2*, and *PTGS2* increased only in response to increasing NaCl concentration. At the same time, the amount of *ATF3*, *PTGS2*, and *IL1 α* mRNA increased upon Na,K-ATPase inhibition by ouabain. However, under the conditions of our experiments, we did not detect significant changes in the expression of the osmoprotective transcription factor NFAT5. The data obtained allow us to conclude that an increase in $[Na^+]_o$ can regulate gene expression in endothelial cells independently of the osmolarity of the extracellular medium and/or an increase in cell stiffness.

Keywords: sodium, potassium, Na,K-ATPase, endothelium, transcription regulation

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

EDN: ATLPDA

1. Общие положения

1.1. Ежемесячный международный журнал «Биохимия»/Biochemistry (Moscow), учрежденным которого является Российская академия наук, издается и распространяется одновременно на русском и английском языках.

1.2. Журнал «Биохимия» публикует работы по всем разделам биохимии, а также концептуально важные работы по биохимическим аспектам смежных областей (молекулярной биологии, биофизики, биоорганической химии, микробиологии, иммунологии, физиологии, нейробиологии, геронтологии, биомедицинских наук и др.), направленные на понимание молекулярных и клеточных основ биологических процессов. Тематика журнала также охватывает новые экспериментальные методики в области биохимии, теоретические достижения, имеющие значение для биохимии, обзоры современных биохимических тем исследования и мини-обзоры. **Журнал не рассматривает** чисто феноменологические работы, которые описывают изменения биохимических параметров или маркеров биологических процессов **без связи с механизмами**, вызвавшими эти изменения или являющимися следствием таких изменений, а также работы по клонированию и экспрессии (в том числе в трансгенных животных и растениях) индивидуальных генов и материалы по анализу геномных полиморфизмов.

1.3. К публикации принимаются законченные оригинальные работы, содержащие новые экспериментальные результаты; методические работы, включающие описание новых методов биохимических исследований; материалы теоретического характера с изложением новых принципов, подходов для решения тех или иных биохимических задач. Не принимаются статьи с результатами, новизна которых заключается только в том, что изучаемый хорошо известный объект получен из другого источника.

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 1–2 месяца.

Журнал печатает заказанные редколлегией (или предлагаемые авторами и одобренные ред-

коллегией) **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 последних 5 лет; 3) обзор не должен быть пересказом и, подчас, дословным цитированием кусков ранее опубликованных работ, в нем должен быть критический разбор цитируемых материалов и своя концепция, свое видение проблемы, побудившее авторов написать данный обзор. Редакция и рецензенты строго следят за плагиатом.

Раздел «**Дискуссии**» предоставляет авторам возможность опубликовать комментарии, критические замечания и иные соображения по поводу напечатанных ранее на страницах журнала работ, выступить с новой гипотезой. Раздел носит полемический характер и печатает ответные реплики затронутых в публикациях сторон.

1.4. Журнал индексируется и включен в библиографические базы данных Web of Sciences, Biochemistry and Biophysics Citation Index, Biological Abstracts, BIOSIS Database, Chemical Abstracts, Chemical Titles, Current Contents/Life Science, Excerpta Medica, Index Internationale de Cardiologia, Index Medicus (MEDLINE/Pubmed), International Abstracts of Biological Sciences, The ISI Alerting Service, Science Citation Index, Science Citation Index Expanded, SCOPUS, Compendx; РИНЦ. Журнал включен в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК.

1.5. Правила для авторов и информацию о журнале можно найти на сайтах журнала <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya> и <https://biochemistrymoscow.com>, а также на порталах издательств Pleiades <https://pleiades.online/ru/journal/biochmsc/> и Springer <https://www.springer.com/journal/10541>. На сайте журнала на английском языке представлены содержания всех выпусков, начиная с 1996 г., с резюме статей, ключевыми словами и адресами авторов, а также в полном объеме – тематические выпуски журнала, посвященные наиболее актуальным проблемам биохимии.

1.6. Импакт-фактор Biochemistry (Moscow) в 2020 г. составил 2.487, импакт-фактор РИНЦ для «Биохимии» – 3.038. По данным Scopus журнал

находится во 2-й квартили (Q2) среди журналов биохимического и медико-биологического профилей.

1.7. Для увеличения охвата читательской аудитории и повышения цитируемости своей работы вы можете опубликовать статью в Biochemistry (Moscow) в режиме открытого доступа (Open Access). Вся информация о публикации статьи в свободном доступе можно найти на сайте издательства: <https://pleiades.online/ru/authors/openaccess/> или обратившись в редакцию.

2. Порядок подачи рукописей

2.1. Редакция принимает на рассмотрение рукописи, присланные по электронной почте в форме присоединенных файлов (attachment) на адреса редакции: editorial@biochemistrymoscow.com или ozgina@bio.chem.msu.ru, а также поданные через Авторский портал издательства: <https://publish.sciencejournals.ru>.

2.2. Материал статьи – текст, включая резюме на русском и английском языках, список литературы, рисунки с подписями и таблицы – оформляется одним файлом; каждый рисунок дополнительно оформляется отдельным файлом. Если пересылаемый материал велик по объему, следует использовать программы для архивирования.

Все страницы рукописи, в том числе содержащие список литературы, таблицы и подписи к ним, следует пронумеровать; строки также следует последовательно пронумеровать.

На отдельной странице прилагаются сведения об авторах с указанием адресов, контактных телефонов, факса и электронной почты, а также указывается автор, ответственный за переписку с редакцией и работу с корректурой.

2.3. Одновременно с русским желателно представить аутентичный английский вариант рукописи.

2.4. При подаче рукописи авторам следует прислать в редакцию **сопроводительное письмо**, в котором надо указать, что: 1) представленный материал (или его части) не был ранее нигде опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях; 2) авторы ознакомились с этическими нормами, предписанными международными соглашениями о публикациях научных статей, и соблюдают их; 3) авторами представлена информация о потенциальных конфликтах интересов; 4) авторы оз-

накопились с правилами проведения исследований с участием человека и/или животных и соблюдают их; 5) каждый соавтор сообщает о своем согласии на авторство в статье (см. соответствующие Положения на сайтах журнала и на порталах Springer и Pleiades).

3. Требования к оформлению рукописей

3.1. Текст статьи должен быть изложен по возможности сжато и тщательно отредактирован, но без ущерба для ее понимания и воспроизведения результатов.

3.2. Рукопись должна быть построена следующим образом: 1) индекс УДК; 2) заглавие; 3) инициалы и фамилии авторов; 4) полные названия учреждений, индекс, город и электронная почта (аффилиация); 5) резюме на русском языке; 6) ключевые слова; 7) краткое заглавие статьи (колонтитул); 8) текст статьи, включающий список цитированной литературы, таблицы, подписи к рисункам; 9) резюме на английском языке (с переводом названия статьи, фамилий авторов, аффилиации и ключевых слов).

Индекс УДК (уникальной десятичной классификации) выделяется *курсивом* и ставится в верхнем левом углу первой страницы.

Заглавие должно быть максимально кратким, информативным и без сокращений.

Если авторы статьи являются сотрудниками разных учреждений, то учреждения следует пронумеровать и после каждой *фамилии* надстрочным знаком указать соответствующий номер; звездочкой справа от цифры необходимо отметить автора, ответственного за переписку с редакцией. Для каждого из авторов приводится полное название учреждения с индексом, городом и страной; для автора, ответственного за переписку, указывается также адрес электронной почты. Авторы, внесшие равный вклад в работу, обозначаются знаком решетки (#).

Резюме должно быть кратким (не более 250 слов), сжато и ясно описывающим основные конкретные результаты работы и вытекающие из них выводы.

Ключевых слов – не более 15.

При использовании нестандартных сокращений должен быть добавлен раздел *Принятые сокращения*.

Текст экспериментальной статьи следует разбить на разделы: 1) Введение, 2) Материалы и методы, 3) Результаты исследования, 4) Обсуждение результатов (объединенный раздел «Результаты и их обсуждение» допускается в тех случаях, когда обсуждение невелико по объему),

5) Заключение, 6) Список литературы, 7) Резюме на английском языке.

Во *введении* кратко излагается история вопроса с обязательным рассмотрением работ, в которых аналогичные или близкие исследования уже проводились, и формулируется цель исследования.

Основное требование к изложению *методов исследования* состоит в том, чтобы процедуры были описаны максимально кратко, но по описанию можно было воспроизвести эксперименты; сюда же должны быть включены использованные в работе материалы, реактивы и приборы с указанием фирмы и страны-производителя, например: глицерин («Sigma-Aldrich», США), электронный микроскоп JEM 100C («JEOL», Япония). Только новые методы следует детально описывать; на ранее опубликованные и общеизвестные достаточно сослаться в списке литературы, указав автора и/или название метода (например, концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [7]). Если метод известен не слишком широко, желательно изложить его принцип и указать автора. **Не допускаются** ссылки на методы по типу «нуклеазу измеряли методом [7]» или «по [7]» (ссылка не может быть самостоятельным членом предложения).

Результаты исследования обычно представлены рисунками и таблицами; те эксперименты, которые не нуждаются в документации, описываются в тексте. В этом разделе не следует приводить обсуждение результатов, можно ограничиться объяснением причинно-следственных связей между описываемыми экспериментами.

Раздел «*Обсуждение результатов*» должен содержать интерпретацию результатов (но не их повторение) и сравнение с ранее опубликованными результатами. Желательно основные результаты иллюстрировать простой и наглядной схемой.

В случае необходимости рукопись завершается *заключением*, которое отделяется от раздела «Обсуждение результатов» отбивкой.

В связи с участием журнала в международном Комитете по этике публикаций (Committee on Publication Ethics – COPE) авторам следует внести в конце статьи несколько фраз, демонстрирующих приверженность международным этическим стандартам. Ниже приведены образцы представления соответствующих разделов в заключительной части статьи.

1) Следует описать вклад каждого из авторов в работу и подготовку рукописи (раздел «Вклад авторов»). Например: А.Б. Иванов и В.Г. Петров – концепция и руководство работой; Д.Е. Сидоров и З.И. Дроздов – проведение экспериментов; А.Б. Семенов и В.Г. Петров – об-

суждение результатов исследования; С.И. Холодов и В.Г. Антонов – написание текста; А.Б. Иванов, В.Г. Петров, А.Б. Семенов – редактирование текста статьи.

2) 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.

3) 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.

4) В разделе «Конфликт интересов» авторы заявляют о наличии или отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере. Данный раздел является обязательным.

5) Обязательным является также раздел «Соблюдение этических норм». Если исследования проводились на животных, то в данном разделе указывается: «Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций».

Если исследования проводились с участием людей, то в разделе «Соблюдение этических норм» указывается: «Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие».

Если в статьях не содержится описания исследований с участием людей или использованием животных и выполненных кем-либо из авторов, в разделе «Соблюдение этических норм» указывается: «Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов».

6) Если статья содержит персональную информацию об участниках исследования, то необходимо включить следующее положение в раздел «Информированное согласие»: «От всех участников, чья персональная информация со-

держится в этой статье, получено дополнительное письменное добровольное согласие».

Список цитируемой литературы должен быть максимально кратким (не более 150 ссылок), но содержащим ссылки на все принципиально важные последние публикации по данному вопросу. В журнале принята последовательная нумерационная система цитирования, т.е. по ходу изложения указывается порядковый номер процитированного источника (в квадратных скобках), соответствующий номеру в Списке литературы. Авторам следует очень внимательно проверить последовательность нумерации ссылок в тексте и соответствие номера каждой ссылки в тексте и списке литературы. **Не допускается** включение в список литературы ссылок на веб-сайты, необходимо ссылаться на публикации авторов, предлагающих эти электронные ресурсы (программы/базы данных). Если такие публикации отсутствуют, ссылка дается в тексте так же, как на другие неопубликованные материалы (например, База данных структур бактериальных углеводов, <http://csdb.glycoscience.ru/bacterial>).

Ссылки на **неопубликованные** данные не допускаются. Можно сослаться на личное сообщение кого-либо, в таком случае необходимо указать инициалы и фамилию источника, а также же место работы.

Следует избегать появления **дублированных** ссылок в списке литературы, а также ссылок на **отозванные** статьи.

Список литературы печатается как отдельный раздел рукописи с указанием фамилий и инициалов всех авторов, названия цитируемой статьи и выходных данных. Кроме этого, желательно дать DOI статьи. Ниже приводятся примеры ссылок на журналы, книги, сборники, диссертации.

1. Beltrami, C., Besnier, M., Shantikumar, S., Shearn, A. I. U., Rajakaruna, C., et al. (2017) Human pericardial fluid contains exosomes enriched with cardiovascular-expressed microRNAs and promotes therapeutic angiogenesis, *Mol. Ther.*, **25**, 679-693, doi: 10.1016/j.ymthe.2016.12.022.

2. Sloan-Dennison, S., and Schultz, Z. D. (2018) Label-free plasmonic nanostar probes to illuminate *in vitro* membrane receptor recognition, *Chem. Sci.*, **10**, 1807-1815, doi: 10.1039/c8sc05035j.

3. Анисимов В. Н. (2008) *Молекулярные и физиологические механизмы старения*, Наука, СПб.

4. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

5. Tanphaichitr, V. (2001) in *Handbook of vitamins* (Rucker, R., and Suttie, J., eds), Marcell Dekker, N.Y., pp. 275-316.

6. Гендролис А. А., Серебрянников Н. В., Гандель В. Г. (1978) В кн. *Простагландины* (под ред. Ажгихина И.С.), Медицина, Москва, с. 332-347.

7. Гандельман О. А. (1992) *Кинетика и механизм 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/S00062979-13110035.

Для авторов, использующих систему EndNote, редакция предоставляет стиль, который поддерживает форматирование цитат в тексте и список литературы. Стилиевой файл можно найти на сайтах журнала <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya> и <https://biochemistrymoscow.com> в разделах для авторов.

В конце статьи дается *резюме на английском языке*, являющееся аутентичным переводом заглавия статьи, инициалов и фамилий авторов в английской транскрипции, названий учреждений с индексами, названиями городов и адресами электронной почты, текста аннотации и ключевых слов.

3.3.1. Объем экспериментальной статьи, включая список литературы, таблицы, рисунки (3 рисунка считаются за 1 страницу) и подписи к ним, резюме на английском языке, не должен превышать 20 машинописных страниц, количество рисунков — не более 8; **краткое сообщение** — не более 12 страниц (включая не более 4 рисунков и/или таблиц); **мини-обзор** — не более 16 страниц (включая не более 5 рисунков); **обзор** — не более 35 страниц (включая не более 8 рисунков); сообщения в разделе «**Дискуссии**» — до 4 страниц.

3.3.2. Текстовые файлы следует представлять в формате Microsoft Word (версия 6.0 и более поздние), шрифты для основного текста — Times New Roman и Symbol, размер букв 12, полтора интервала, в одну колонку без выравнивания по правому краю, без переноса слов, с полями 3 см с левой стороны, на странице — не более 30 строк.

Для оформления текста можно использовать курсив, полужирные начертания, подстрочные и надстрочные индексы, греческие и математические символы (шрифт Symbol) в соответствии со стилевым оформлением журнала.

Стиль оформления текстового материала должен быть простым: **без запрограммированных заголовков, вставок, шаблонов, ссылок на литературные источники (гиперссылок)**; без увеличения межстрочных и межбуквенных интервалов; без

использования шаблонов — в окне «стиль» должно быть «обычный»). Особенно это относится к «Списку литературы», т.к. запрограммированные порядковые номера при переносе в издательскую программу исчезают.

Авторы не должны использовать такие функции программы Word, как «Закладка», «Примечание», «Сноска», «Концевая сноска», потому что они неправильно интерпретируются издательской программой. Если в тексте встречается сноска (или концевая сноска), то сразу после предложения или абзаца с ее номером, следует набрать «{Footnote}», т.е. «{Сноска}», и далее непосредственно текст сноски.

Если при подготовке статьи была использована функция «Рецензирование», то перед сохранением файла нужно отменить функцию «Рецензирование» и затем использовать функцию «Принять все изменения в документе».

3.3.3. Таблицы следует приводить в тех случаях, когда данные не могут быть приведены в тексте.

Каждая таблица оформляется на отдельной странице и имеет свой заголовок. Колонки в таблице должны быть озаглавлены, с указанием через запятую размерности приводимых величин. Необходимо стремиться к максимальной краткости заголовков колонок, не давать величин, легко выводимых из имеющихся (например, разность или проценты). Повторение одних и тех же данных в тексте, в таблицах или на рисунках не допускается.

Таблицы принимаются только в формате Word (doc, docx). Если таблицы содержат графические вставки, эти вставки следует прислать в виде отдельных графических файлов высокого качества.

3.3.4. Рисунки с подрисуночными подписями следует располагать в тексте по месту ссылки на каждый рисунок. Кроме того, рисунки должны быть представлены в виде отдельных файлов, удовлетворяющих следующим требованиям:

- для схем и графиков **без полутоновых вставок**: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в черно-белом режиме (Line-art, Black-and-White, Bitmap). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg;

- для **полутоновых рисунков** или графиков **с полутоновыми вставками**: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в полутоновом черно-белом режиме (градации серого — Grayscale). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg;

- для **цветных рисунков**: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в цветном режиме CMYK (для цветной печати), RGB (для цветных рисунков в электронной версии). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg.

- независимо от типа графики, рисунок должен обладать **высоким реальным разрешением**: не ниже 300 dpi для полутоновых иллюстраций; не ниже 600 dpi для штриховых и смешанных (полутоновых/штриховых) иллюстраций. Пикселизация изображений в форматах растровой графики не должна быть грубой. Линии рисунков должны быть толщиной не менее 3 пунктов (point). Следует избегать чрезмерно мелких обозначений (букв, цифр, значков и т.д.). Пикселизированные (растровые) рисунки не следует вставлять в документ Word или переводить в формат pdf, так как это ухудшает их качество;

- рисунки должны иметь размеры, соответствующие их информативности. Размер рисунка на одну колонку не должен быть менее 8 см; на две колонки — менее 17 см. Рисунки не должны быть чрезмерно крупными;

- векторные иллюстрации не должны содержать точечных закрасок, таких как «Noise», «Black&white noise», «Top noise». Для векторной графики все использованные шрифты должны быть включены в файл;

- шрифты внутри рисунков выбираются из гарнитуры Arial размером 9 пунктов;

- следует избегать сканирования рисунков из книг и других печатных изданий, так как такие файлы дают низкое качество при печати и имеют неоправданно большой размер.

Общие требования к подготовке графиков, диаграмм и формул:

- **график** должен содержать обозначения координатных осей (измеряемый параметр и единица измерения), а также кривых и других деталей. Надписи по осям выполняются вдоль осей шрифтом Arial с заглавной буквы, единица измерения отделяется запятой, а не скобками (например, Объем элюента, мл). Линии внутри рисунка следует пронумеровать (цифры выполняются *курсивом* — 1, 2 и т.д.), и в подрисуночной подписи (не на рисунке) дать пояснения к каждой линии. Экспериментальные точки предпочтительно представлять заштрихованными и незаштрихованными кружками, квадратами, треугольниками, ромбами. Отдельные кривые могут различаться также сплошным или штриховым изображением. Все линии должны быть изображены четко с толщиной линий (обычно 3 пункта), позволяющей уменьшить рисунок до конечного размера в журнале. Координатные оси в большинстве случаев необходимо отображать черными (не серыми) линиями. Фон графика или диаграммы должен быть белым, без линий координатной сетки (за исключением случаев, когда иной цвет фона или наличие сетки необходимы для правильного восприятия);

– на **диаграммах** и **фотографиях** отдельные элементы (столбцы, дорожки геля и пр.) следует пронумеровать *курсивными* арабскими цифрами (1, 2 и т.д.) и в подрисуночной подписи (не на рисунке) дать пояснения к каждой цифре. Если помимо арабских требуется введение римских цифр (I, II, III и т.д.), эти цифры должны быть прямого начертания.

– если рисунок состоит из нескольких частей (диаграмм, графиков, схем, структур белков, фотографий, в т.ч. электрофореграмм), их нужно обозначить строчными *курсивными* буквами (a, б, в и т.д.) гарнитурой Times, размером большим, чем основной текст, и поместить эти буквы в верхних левых углах соответствующих частей. В подрисуночной подписи следует дать пояснение к каждой части рисунка;

– для написания **химических формул** в тексте используется программа ChemWindows;

– длинные и сложные **математические формулы** следует представлять в виде рисунков без подписей в одном из допустимых форматов (pdf, tiff или jpg). Каждую формулу нужно дать отдельным файлом, название которого соответствует номеру формулы; при подготовке данных файлов следует руководствоваться правилами подготовки графических материалов. Функцией «Редактор уравнений» надо пользоваться **только для развернутых уравнений** (как нумерованных, так и встречающихся в тексте), но не для небольших выражений (обозначений), вкрапленных в текст, например, ΔG , $T\Delta S$, K_m . (Для таких небольших выражений должны использоваться основные функции программы Word, как и для всего остального текста статьи.) Для выражений, в которых требуется «кернинг» (нижний и верхний индексы, расположенные один под другим), надо использовать только надстрочные и подстрочные знаки (например, NH_3^+), а «кернинг» будет выполнен макетчиком. Эти требования обусловлены тем, что издательская программа неправильно воспринимает данные, полученные с помощью функции «Редактор уравнений»;

– в ширину формула не должна превышать 8,5 см (ширина колонки журнала). Более длинные формулы должны быть разбиты автором на несколько строк. Формулы должны быть набраны шрифтами Times New Roman и Symbol. В случае если формулы предоставляются в виде пикселизированных (растровых) изображений, они должны быть представлены в черно-белом режиме (Line-art, Black-and-White, Bitmap) в формате tiff или jpg. Такие изображения должны обладать **высоким реальным разрешением** (пикселизация не должна быть грубой). Особое внимание следует уделять качеству графической передачи надписей, цифр и мелких элементов пиксе-

лизированного изображения. Пикселизированные (растровые) изображения не стоит вставлять в документ Word или переводить в формат pdf, так как это зачастую ухудшает их качество;

– **аминокислотные, нуклеотидные и пр. последовательности** часто изображаются в форме, требующей строго вертикального расположения компонентов. Поэтому во избежание ошибок и необходимости проверять большие количества сложной информации авторы должны представлять в редакцию материалы такого рода в виде, пригодном для репродукции.

Обращаем внимание на общие условия публикации иллюстраций:

– надписи и обозначения на рисунках могут меняться в русской и английской версиях при переводе, поэтому для фотографий и рисунков, где надписи наложены на сложный, неоднотонный фон, желательно предоставить второй вариант без текста и всех обозначений, для остальных иллюстраций – располагать надписи на иллюстрации так, чтобы они не соприкасались с другими ее частями. Авторы также могут сами подготовить версии рисунков с английскими надписями;

– рисунок должен иметь заголовок и информативную подрисуночную подпись, делающую его смысл понятным без обращения к тексту – указываются условия, специфические для данного эксперимента; ссылки на основной текст допускаются только чтобы избежать повторов и неясностей;

– цветные иллюстрации публикуются **бесплатно для авторов** в том случае, если они будут размещены **только в электронной версии статьи**, а в печатной версии журнала они будут в черно-белом исполнении. При этом авторы должны иметь в виду, что в печатной версии с черно-белыми рисунками сохраняются подрисуночные подписи из цветной электронной версии, поэтому следует избегать указаний на цвет в подрисуночных подписях. Авторам необходимо подбирать цвета таким образом, чтобы при черно-белой печати не утратилась информативность. Цветные линии графиков желательно размечать обозначениями, цифрами или спецсимволами, или делать различающиеся типы линий для каждого цвета. Цветные области на иллюстрациях желательно размечать различающимися обозначениями или спецсимволами, а не одинаковыми символами разных цветов. Если цветовое разделение областей находится примерно в одном цветовом тоне, то желательно провести тонкую линию границы между ними. При большом количестве цветных областей в схожих цветовых тонах желательно дополнительно обозначить области символами или штриховкой. Все

надписи и обозначения желательно делать не цветными, а черными или белыми, в зависимости от подложки;

– если электронная версия статьи содержит несколько цветных рисунков, в печатной версии возможна платная публикация всех этих рисунков в цвете, либо бесплатная публикация всех этих рисунков в черно-белом исполнении. Публикация в печатной версии только части цветных рисунков в цветном исполнении невозможна;

– подготовленные рисунки желательно распечатать, чтобы убедиться, что они хорошо выглядят в напечатанном виде: все элементы рисунка должны быть хорошо видны на распечатке, фон должен быть чистым, надписи и цифры должны легко читаться. Зачастую бывает достаточно сложно оценить качество рисунка только по тому, как он выглядит на экране компьютера.

– если авторы используют в своей рукописи иллюстрации или таблицы из других публикаций (в том числе своих собственных), то им необходимо запросить у правообладателей этих публикаций разрешение на перепечатку или использование материалов.

Несоблюдение правил подготовки графического материала приводит к необходимости переработки рисунков авторами и задержке публикации рукописи.

3.3.5. Дополнительные материалы к статьям.

Для более полного описания исследования к статье могут прилагаться дополнительные материалы (аудио- и видеофайлы, презентации, дополнительные таблицы, рисунки и пр.) при условии, что автор является правообладателем данных материалов, и автором ранее не были переданы авторские права на их использование иным (кроме издателя) лицам, либо автор имеет письменное разрешение правообладателя на их использование в целях опубликования и распространения в журнале. Дополнительные материалы должны быть законченным произведением. Не допускается выносить в дополнительные файлы материалы, критически важные для понимания статьи. Дополнительные материалы не правятся и не обрабатываются, публикуются в исходном авторском исполнении. Файлы дополнительных материалов должны именоваться по порядку, например, «ESM_1.jpg», «ESM_2.pdf», «ESM_3.xls». В тексте статьи должна быть указана ссылка на наличие дополнительных материалов («...дополнительные данные приведены в Online Resource 1», «...как показано в таблице Online Resource 2»). Дополнительные материалы являются частью статьи,

на которую распространяются все правила и требования, предъявляемые к основному тексту. Дополнительные материалы публикуются только в электронной версии журнала на сайтах <https://www.springer.com>, <http://protein.bio.msu.ru> и <https://biokhimiya/> и <https://biochemistrymoscow.com>.

3.3.6. Все физические величины рекомендуются приводить в международной системе СИ.

3.3.7. Физико-химические символы в тексте, структурные формулы органических соединений и математические формулы должны быть набраны на компьютере. В буквенных обозначениях отношений единиц в качестве знака деления следует применять косую черту, например, моль/с (моль в секунду). В более сложных выражениях одновременно с косой чертой применяют скобки, чтобы избежать двусмысленности: $a/(bc)$, но не $a/b/c$ или a/bc ; $(a/b)c$, но не $a/b \cdot c$. Отношения можно также представить в виде произведения символов единиц, возведенных в степень (положительную и отрицательную), например, моль \cdot с⁻¹. Не допускаются выражения типа мА/гель, мкмоль/мин \cdot мг белка и т.п. В таких случаях следует писать: мА на 1 столбик геля, мкмоль/мин на 1 мг белка и т.п.

3.3.8. При подготовке статьи необходимо учесть правила использования символов, сокращений, условных обозначений и пр., рекомендованные Комиссией по биохимической номенклатуре Международного союза биохимии и молекулярной биологии (<https://iubmb.org>). Сокращенные обозначения, приведенные в настоящих правилах, можно применять без специальной расшифровки (определения). Символы и сокращения, не указанные в приведенном списке, подлежат определению на первой странице, подстрочно, под заголовком «Принятые сокращения».

Следует помнить, что сокращения создают помехи для читателя, поэтому их применение должно быть сведено к минимуму. Ясность и недвусмысленность важнее краткости. С другой стороны, применение сокращений названий веществ и других терминов в ряде случаев представляется оправданным, в особенности в уравнениях, таблицах, на рисунках.

Названия простых веществ можно заменить их формулами, например, NaCl вместо «хлорид натрия», CH₃COOH или AcOH вместо «уксусная кислота». При составлении сокращенных обозначений веществ следует широко пользоваться стандартными химическими символами (C, H, O, P, S, Na, Cl и т.д.), тривиальными названиями (фолат и т.п.) и их символами (Me – метил, Pr – пропилен, Ac – ацетил и т.д.).

Для обозначения аминокислотных остатков в полипептидах и белках рекомендуется использовать одно- или трехбуквенные символы:

| | | |
|-------------------------------------|-----|---|
| Аланин | Ala | A |
| Аргинин | Arg | R |
| Аспарагин | Asn | N |
| Аспарагиновая кислота | Asp | D |
| Аспарагиновая кислота или аспарагин | Asx | B |
| Валин | Val | V |
| Гистидин | His | H |
| Глицин | Gly | G |
| Глутамин | Gln | Q |
| Глутаминовая кислота | Glu | E |
| Глутаминовая кислота или глутамин | Glx | Z |
| Изолейцин | Ile | I |
| Лейцин | Leu | L |
| Лизин | Lys | K |
| Метионин | Met | M |
| Пролин | Pro | P |
| Серин | Ser | S |
| Тирозин | Tyr | Y |
| Треонин | Thr | T |
| Триптофан | Trp | W |
| Фенилаланин | Phe | F |
| Цистеин | Cys | C |

Макромолекулы, построенные из повторяющихся единиц, могут быть обозначены с помощью приставки «поли» или подстрочного индекса *n*. Например, полилизин можно обозначить как поли(Lys) или (Lys)_{*n*}; полимер, построенный из чередующихся остатков аланина и лизина, — поли(Ala–Lys) или (Ala–Lys)_{*n*}; аналогичный полимер со случайным распределением остатков аланина и лизина — поли(Ala, Lys) или (Ala, Lys)_{*n*}. Индекс *n* можно заменить числом — средним, например, (Lys)₁₀, или с указанием пределов, например, (Lys)_{8–12}.

При трехбуквенном обозначении аминокислотных остатков белков следует использовать прямые буквы, из которых первая — заглавная, а остальные — строчные. Аминокислотные остатки с номером в последовательности следует приводить в виде Asn223.

Согласно правилам генетической номенклатуры для написания **генов** используют в основном трехбуквенное обозначение латинскими буквами, написанными **курсивом** (*Italic*) (кроме дрозофилы и некоторых других организмов). Соответствующие продукты (белки) обозначают заглавными буквами прямого начертания. У **прокариот** нормальные гены обозначают строчными буквами со знаком «плюс» в верхнем индексе (например, *proA*⁺); мутантные гены — также строчными буквами с номером мутации (например, *proA22*). У **эукариот** нормаль-

ные гены обозначают заглавными буквами (например, *LEU2*), мутантные — строчными буквами с номером мутации, если необходимо (например, *leu2–3*).

При описании в статье новой последовательности гена **необходимо предварительное депонирование ее** в базе данных **GenBank** или другой публично доступной базе данных.

Символы, используемые для моносахаридов:

| | |
|--|--------------|
| Арабиноза | Ara |
| 2-Дезоксирибоза | dRib |
| Галактоза | Gal |
| Глюкоза | Glc |
| Ксилоза | Xyl |
| Манноза | Man |
| Рибоза | Rib |
| Фруктоза | Fru |
| Фукоза | Fuc |
| Глюкозамин, N-ацетилглюкозамин | GlcN, GalNAc |
| Галактозамин, N-ацетилгалактозамин | GalN, GlcNAc |
| Нейраминавая, N-ацетилнейраминавая кислота | Neu, NeuAc |

Если необходимо указать — фураноза или пираноза, — следует написать курсивом буквы *f* или *p* после символа моносахарида, например, Rib*f* — рибофураноза.

Для нуклеозидов, нуклеотидов и полинуклеотидов используются следующие символы:

| | |
|--|------------------|
| Аденозин | A |
| Гуанозин | G |
| Инозин | I |
| Ксантозин | X |
| Рибозилтимин | T |
| Уридин | U |
| Аденозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты | AMP, ADP, ATP |
| Гуанозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты | GMP, GDP, GTP |
| Оротидин-5'-моно-, ди- и трифосфаты | OMP, ODP, OTP |
| Риботимидин-5'-моно-, ди- и трифосфаты | rTMP, rTDP, rTTP |
| Уридин-5'-моно-, ди- и трифосфаты | UMP, UDP, UTP |
| Цитидин-5'-моно-, ди- и трифосфаты | CMP, CDP, CTP |

Соответствующие дезоксирибонуклеотиды обозначаются добавлением латинской строчной буквы d перед трехбуквенным символом, например, dATP, dGTP и т.д.

Обозначение изомеров AMP: 2'-AMP, 3'-AMP, 5'-AMP, 3' : 5'-AMP (аденозин-3' : 5'-монофосфат, cAMP).

Ниже приведены символы, используемые для нуклеиновых кислот:

| | |
|--|---|
| Дезоксирибонуклеиновая кислота | ДНК |
| Комплементарная ДНК | кДНК |
| Митохондриальная ДНК | мтДНК |
| Рибонуклеиновая кислота | РНК |
| Митохондриальная РНК | мтРНК |
| Матричная (информационная) РНК | мРНК |
| Рибосомная РНК | рРНК |
| Транспортная РНК | тРНК |
| тРНК с указанием акцепторной специфичности | тРНК ^{Ala} , тРНК ^{Glu} и т.д. |
| Изоакцепторная РНК | тРНК ₁ , тРНК ₂ и т.д. |
| Аминоацилпроизводные тРНК | Ala ^t РНК, Glu ^t РНК и т.д. |

Полифосфоинозитиды и продукты их гидролиза рекомендуется обозначать следующими символами:

| | |
|------------|-----|
| Фосфатидил | Ptd |
| Инозитид | Ins |
| Фосфат | P |

Для названия ферментов допускаются сокращения (с пояснением в сноске «Принятые сокращения») типа Г6ФДГ (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа); нет возражений против замены названия субстрата, входящего в тривиальное наименование фермента, стандартной аббревиатурой, например, АТРаза, Glu-декарбоксилаза и т.п. Прочие сокращения, не требующие специальной расшифровки:

| | |
|------------------------|---|
| БСА | бычий сывороточный альбумин |
| ДЭАЭ-целлюлоза | диэтиламиноэтилцеллюлоза |
| КМ-целлюлоза | О-карбоксиметилцеллюлоза |
| ПААГ | полиакриламидный гель |
| ТХУ | трихлоруксусная кислота |
| ЭГТА | этиленгликоль-бис-(аминоэтилэфир)тетраацетат |
| ЭДТА | этилендиаминтетраацетат |
| СоА, СоASH | коэнзим А |
| Ацил-СоА | ацилкоэнзим А |
| Ds-Na | додecilсульфат натрия |
| FAD, FADH ₂ | флавинадениндинуклеотид и его восстановленная форма |
| FMN, FMNH ₂ | рибофлавин-5'-фосфат и его восстановленная форма |
| GSH, GSSG | глутатион и его окисленная форма |
| G-белок | гуаниннуклеотидсвязывающий регуляторный белок |

| | |
|---------------------------------|--|
| IgG | иммуноглобулин G |
| NAD, NAD ⁺ , NADH | никотинамидадениндинуклеотид, его окисленная и восстановленная формы |
| NADP, NADP ⁺ , NADPH | никотинамидадениндинуклеотидфосфат, его окисленная и восстановленная формы |
| P _i | неорганический фосфат |
| PP _i | неорганический пиррофосфат |
| POPOP | 1,4-бис-(5-фенилоксазол-2)-бензол |
| PPO | 2,5-дифенилоксазол |
| Q, QH ₂ | убихинон, убихинол |

Термины, обозначающие групповые понятия (жирные кислоты, белок, вирус и т.п.), а также краткие термины (фолат, фуран и т.п.) **не сокращаются. Не следует сокращать** понятия типа «красные кровяные клетки», «внеклеточная жидкость», а также названия тканевых препаратов, буферов, суспензионных сред.

Стандартные экспериментальные физико-химические методы и связанные с ними термины могут быть обозначены в тексте общепринятыми аббревиатурами из заглавных букв русского алфавита: ДОВ – дисперсия оптического вращения, КД – круговой дихроизм, ГЖХ – газожидкостная хроматография, ЖХВД – жидкостная хроматография высокого давления, ИК- и УФ-спектроскопия – инфракрасная и ультрафиолетовая спектроскопия, ТСХ – тонкослойная хроматография, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, ЭСР – электронный спиновый резонанс, ЯМР – ядерный магнитный резонанс, Ds-Na-ПААГ-электрофорез – электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Также не требуют специальной расшифровки общепринятые сокращения ПЦР (полимеразная цепная реакция) и ИФА (иммуноферментный анализ).

3.3.9. Номенклатура веществ, меченных изотопами. Символ изотопа помещается в квадратных скобках перед названием соединений (без пробела): [¹⁴C]мочевина, [α -¹⁴C]лейцин, L-[метил-¹⁴C]метионин. Если соединение содержит больше одного атома изотопа, и позиция этих атомов не указывается, то число атомов изотопа обозначается подстрочным индексом справа от символа: [¹⁴C₂]гликолевая кислота. Символом U обозначается равномерное распределение метки: запись [U-¹⁴C]глюкоза означает, что изотоп ¹⁴C распределен равномерно между всеми шестью положениями. Символ G указывает, что все позиции содержат изотоп, но его распределение между позициями необязательно равномерно:

[G-¹⁴C]глюкоза. В последнем случае достаточно писать: [¹⁴C]глюкоза.

Приставка, указывающая изотоп, ставится перед той частью названия вещества, к которой она относится: йод[¹⁴C]уксусная кислота, 1-амино-[¹⁴C]метилциклопентанол (H₂N¹⁴CH₂C₅H₈OH), фруктозо-1,5-[1-³²P]дифосфат. Термины типа [¹³¹I]-меченный альбумин не следует сокращать до [¹³¹I]альбумин, поскольку нативный альбумин не содержит йода; приемлемо обозначение [¹³¹I]йодальбумин.

Если вещество содержит изотопы нескольких элементов, их символы располагаются в алфавитном порядке: [3-¹⁴C, 2,3-D¹⁵N]серин. Дейтерий можно обозначать символами ²H или D, тритий — ³H или T.

Положение изотопа в соединении следует обозначать арабскими цифрами, греческими буквами или приставками, которые помещаются внутри квадратных скобок перед символом изотопа и отделяются от него дефисом: [1-³H]этанол, L-[α-¹⁴C]лейцин, [карбокси-¹⁴C]лейцин, [3,4-¹⁴C, ³⁵S]метионин, L-[метил-¹⁴C]метионин.

Те же правила применяются и в том случае, если соединения обозначены стандартными символами: [α-³²P]АТР, [³²P]СМР (не СМ³²Р!). Однако радиоактивные неорганические фосфат и пирофосфат можно обозначить ³²P_i и ³²P_{Pi} соответственно.

Изотопы в простых молекулах, написанных формулами, обозначаются без квадратных скобок: ¹⁴CO₂, H₂¹⁸O, D₂O, H₂³⁵SO₄, ³²PO₄³⁻ (но [³²P]фосфат). Квадратные скобки не ставятся, когда символ изотопа присоединяется к словам, не являющимся названием определенного соединения, а также к словам, обозначающим групповые названия соединений: ¹³¹I-меченный, ³H-лиганды, ¹⁴C-стероиды, ¹⁴C-аминокислоты.

При описании результатов экспериментов с использованием изотопов радиоактивность следует, если возможно, выражать в абсолютных величинах — кюри (Ки) или беккерелях (Бк), или распадах/мин (DPM), или имп/мин (CPM).

3.3.10. Ниже приведены рекомендации по оформлению конкретных разделов, принятые в международной биохимической литературе (см. *Biochem. J.*, **289**, 1–15 (1993)).

Животные, растения, микроорганизмы. Для всех экспериментальных животных, кроме обычных лабораторных, следует указывать полные родовое и видовое названия; то же относится и к растениям. Необходимо указать разновидности, штаммы и, если возможно, источник материала. В сообщениях о влиянии изменений в питании приводится состав питательных смесей.

Названия микроорганизмов в резюме и при первом упоминании в тексте должны быть приведены **полностью**, с указанием родового и видового названий и **напечатаны** курсивом (*Italic*); далее по тексту родовое название обозначается одной заглавной (первой) буквой, а видовое печатается полностью. Необходимо указать номер в коллекции, из которой получены микроорганизмы, или номер штамма (прямым начертанием). Если обсуждаются два рода с одинаковой первой буквой, можно использовать сокращения типа *Strep.* и *Staph.*; если в тексте речь идет о семействах (например, эубактерии, молочнокислые бактерии) или о роде в целом (например, стафилококковые), то соответствующие названия печатаются обычным шрифтом.

Центрифугирование. Если условия центрифугирования имеют решающее значение, то следует сообщить необходимые сведения, позволяющие воспроизвести эксперимент: описание центрифужного ротора, количественный состав сус-пензионной среды, температуру процесса, время работы ротора с постоянной скоростью (исключая время на разгон и торможение), скорость центрифугирования в единицах g, приведенную к усредненному радиусу вращения столбика жидкости. Например, «центрифугирование проводили в течение 15 мин при 2 °C и 10 000 g (*r*_{cp} 8 см)».

При центрифугировании в градиенте плотности нужно указать тип использованной центрифуги и ротора, температуру, состав градиента. Результаты лучше всего представлять в виде зависимости от расстояния до центра ротора, а не от номера фракции; в таком случае не обязательно указывать верхнюю и нижнюю части градиента. Если используются номера фракций, то верх и низ градиента должны быть отмечены.

Ультрацентрифугирование описывается следующими символами и единицами: коэффициент седиментации (не константа) — *s*; коэффициент седиментации при нулевых концентрациях в воде при 20 °C — *s*⁰_{20,в}; единицы Сведберга — (10⁻¹³ с) — S; удельный объем частицы — *v*; коэффициент диффузии — *D*, коэффициент диффузии в воде при 20 °C — *D*⁰_{20,в}. Нужно указывать температуру, при которой проводились седиментация и диффузия.

Хроматография. Фотографии и рисунки бумажных и тонкослойных хроматограмм публикуются только тогда, когда несут информацию, которую сложно описать в тексте. Скорость движения вещества относительно фронта растворителя в бумажной или тонкослойной хроматографиях описывается величиной *R_F*. Соотношение смеси растворителей лучше всего описывать так: бутан-1-ол : CH₃COOH : H₂O (4 : 4 : 1, по объему).

Диаграммы элюирования для колоночной хроматографии должны быть представлены так, чтобы объем элюента возрастал слева направо. Единицы концентрации и объема должны быть указаны. Следует также приводить размеры колонок и, если возможно, ее свободный объем (V_0). Максимум пика элюции характеризуется величиной V_e (объем элюции) или, лучше, коэффициентом распределения (α или K_D). Калибровочные кривые для колонок (зависимость распределения молекулярных масс от V_e или K_D) не представляются.

Электрофорез. Фотографии электрофоретического разделения в гелях публикуются, если содержат важную информацию. В тексте должны быть оговорены состав среды, pH, температура, электрофоретические подвижности (m), рабочее напряжение. Для обозначения изоэлектрических точек используется символ pI.

Ферменты. В вопросах номенклатуры ферментов авторам следует придерживаться рекомендаций последнего издания «Enzyme Nomenclature» (Acad. Press, San Diego, New York, 1992) с учетом дополнений (<http://www.enzyme-database.org/news.php>). Упоминание фермента необходимо сопровождать его номенклатурным номером. В каждой статье следует оговаривать единицы количества ферментов, что может быть сделано в терминах скорости реакции, катализируемой в определенных условиях. Единица СИ для скорости составляет 1 моль превращенного субстрата (или 1 моль образующегося продукта) в 1 секунду. Это значение скорости соответствует единице количества фермента, называемой katal (символ — kat). За единицу активности фермента также можно принять его количество, обеспечивающее иную скорость реакции, например, 1 мкмоль субстрата в 1 мин.

При определении концентрации белков часто используют стандартные белковые растворы (например, БСА); в таких случаях следует указать тип белка, его источник и, если возможно, влажность.

Константы скорости прямых и обратных реакций в многостадийном ферментативном процессе следует обозначать k_{+n} и k_{-n} соответственно. Константа Михаэлиса (K_m) определяется как концентрация субстрата ($[S]$), при которой $v = V/2$, где $V(V_{max})$ — скорость реакции в условиях насыщения фермента субстратом, v — скорость образования продукта или расходования субстрата. Если в реакции участвуют два субстрата — А и В, то $K_m^A = [A]$ при $v = V/2$ и $[B]$, стремящейся к бесконечности; значение $[A]$ при $v = V/2$ и конечной концентрации В, которая должна быть указана, следует называть кажущейся константой Михаэлиса для А ($K_m^{A \text{ каж}}$). В

ферментативной кинетике используются также понятия: K_s — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, K_i — константа диссоциации фермент-ингибиторного комплекса, $[I]_{50}$ — концентрация ингибитора, вызывающая полумаксимальное торможение реакции, h — коэффициент Хилла — параметр уравнения Хилла, используемого для описания негиперболических зависимостей v от концентрации субстрата или модификатора (см. также рекомендации по символам и терминологии в ферментативной кинетике в «Arch. Biochem. Biophys.» за 1983 г. (224, 732–740)).

Количество вещества, молекулярная масса и дальтон, молярная концентрация. В Международной системе единиц СИ за единицу количества вещества (n) принят моль — количество вещества, содержащее столько же структурных единиц (молекул, атомов, ионов, электронов или др.), сколько атомов углерода содержит 0,012 кг углерода¹² (постоянная Авогадро $N_A = 6,02 \cdot 10^{23}$ 1/моль показывает число структурных единиц в 1 моле любого вещества). Молярная масса (M) — масса 1 моля вещества (m/n), имеет размерность г/моль или кг/моль. Ясно, что масса вещества (m , г), количество вещества (n , моль) и молярная масса (M , г/моль) — понятия разные и между ними существует простое соотношение: $m = nM$. Для обозначения массы биохимических объектов преимущественно используют величины относительной молекулярной массы (M_r , прежнее наименование — «молекулярный вес») — отношение массы молекулы вещества к 1/12 массы атома углерода¹², следовательно, величина безразмерная, и молекулярной массы — массы одной молекулы вещества, выраженной в дальтонах (Да — дальтон — 1/12 массы атома углерода¹² или M/N_A). Таким образом, про некий белок можно сказать, что он имеет относительную молекулярную массу 50 000 ($M_r = 50\,000$) или молекулярную массу 50 000 Да (лучше 50 кДа). Некорректно выражать M_r в дальтонах, по всей статье следует использовать либо M_r , либо молекулярную массу (кДа).

При описании растворов следует давать **молярную концентрацию** (М, мМ, мкМ и т.д.), показывающую, сколько молей вещества содержится в 1 л раствора, но не **нормальную** концентрацию (н.). Концентрацию указывают в десятичной системе (0,25 М HCl). Использование процентных выражений концентрации следует уточнять дополнением: m/m или m/V или V/V , например, 5%-ный раствор (m/V) означает 5 г на 100 мл. Для растворов солей, выраженных в процентах, следует указывать, были ли использованы кристаллогидраты или безводные соли.

Нуклеотидная последовательность. Авторам следует помнить, что последовательность нуклеотидов должна быть определена в обеих цепях ДНК. Для публикации обычно достаточно четкого описания таких определений и наличия полной последовательности.

Степени в таблицах и на рисунках. Часто авторы, желая избежать чисел с большим количеством знаков, в заголовках таблиц или на рисунках используют степени; в таких случаях необходима большая аккуратность. Здесь лучше пояснить примерами: 1) концентрацию 0,00015 М можно записать $15 \cdot 10^{-5}$ М, лучше степень заменить соответствующей приставкой – 0,15 мМ или 150 мкМ; если же речь идет о выражении данной концентрации в таблице или на рисунке, то под заголовком «Концентрация, мМ» следует писать 0,15 или под заголовком «Концентрация, мкМ» – 150, или, если заголовок «Концентрация $\times 10^5$, М», то 15 (но не 15 под заголовком «Концентрация, М $\times 10^5$!»); 2) если значение некоего k равно 0,002, то следует писать 2 под заголовком « $10^3 k$ »; если указано 2 под заголовком « $10^{-3} k$ », то это означает, что k равно 2000; 3) сложные количественные выражения записываются аналогично: выражение $1/[S] = 200 \text{ М}^{-1}$ будет выглядеть как 2 под заголовком « $10^{-2}/[S]$, мМ $^{-1}$ » или как 0,2 под заголовком « $1/[S]$, мМ $^{-1}$ ». Удобно пользоваться квадратными скобками для обозначения концентрации.

Ниже приведены десятичные приставки к единицам измерения и соответствующие символы, которыми рекомендуется пользоваться.

| Степень | Приставка | Символ |
|------------|-----------|--------|
| 10^{12} | тера | Т |
| 10^9 | гига | Г |
| 10^6 | мега | М |
| 10^3 | кило | к |
| 10^2 | гекто | г* |
| 10 | дека | да* |
| 10^{-1} | деци | д* |
| 10^{-2} | санти | с* |
| 10^{-3} | милли | м |
| 10^{-6} | микро | мк |
| 10^{-9} | нано | н |
| 10^{-12} | пико | п |
| 10^{-15} | фемто | ф |
| 10^{-18} | атто | а |

* По возможности избегать (за исключением см).

Комбинация приставки и символа единиц измерения считается одним символом и может возводиться в степень без скобок, например, мМ $^{-1}$ и см 2 .

Буферные растворы следует так описывать, чтобы читатель мог воспроизвести условия эксперимента. Полезно бывает дать в разделе «Материалы и методы» или при первом упоминании полный состав буферного раствора, например: 0,09 М CH_3COONa /0,01 М CH_3COOH , рН 5,6 (это означает, что буферная смесь приготовлена из данных компонентов в указанных концентрациях). Далее по тексту можно коротко указать: 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 5,6 – суммарную концентрацию всех входящих в раствор ионизированных веществ. Если буфер содержит два и более видов ионизированных веществ, например, пиридин и CH_3COOH , то следует указать концентрацию каждого компонента.

Некоторые буферы широко известны по тривиальным названиям, образованным первыми буквами их химических названий, и не нуждаются в расшифровке:

| | |
|---------|--|
| Aces | 2-[(2-Амино-2-оксоэтил)амино]этансульфоновая кислота |
| Ada | [(Карбоимилметил)амино]диуксусная кислота |
| Bes | 2-[Бис-(2-гидроксиэтил)амино]этансульфоновая кислота |
| Bicine | N,N-Бис-(2-гидроксиэтил)глицин |
| Bistris | 2-[Бис-(2-гидроксиэтил)амино]-2-(гидрокси-метил)пропан-1,3-диол |
| Hepes | 4-(2-Гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота |
| Heppps | 4-(2-Гидроксиэтил)-1-пиперазин-пропан-сульфоновая кислота |
| Mes | 4-Морфолин-этансульфоновая кислота |
| Mops | 4-Морфолин-пропансульфоновая кислота |
| Pipes | 1,4-Пиперазин-диэтансульфоновая кислота |
| Taps | 3-[(2-Гидрокси-1,1-бис-(гидроксиметил)-этил)амино]-1-пропансульфоновая кислота |
| Tes | 2-[(2-Гидрокси-1,1-бис-(гидроксиметил)-этил)амино]-1-этансульфоновая кислота |
| Tricine | N-[2-Гидрокси-1,1-бис-(гидроксиметил)-этил]глицин |
| Tris | 2-Амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол |

Для инкубационных сред типа раствора Кребса–Рингера, среды Игла, среды Веймоуса следует дать ссылку на литературный источник либо указать их состав.

Спектры и данные спектроскопии. Полные спектры печатаются только в тех случаях, если они содержат новую или важную информацию. Спектры поглощения в УФ- и видимой областях, флуоресценции, кругового дихроизма и дисперсии оптического вращения должны иметь шкалу длин волн (в нм или мкм). По возможности при описании поглощения, оптического вращения или кругового дихроизма нужно пользоваться терминами молярности. Как указыва-

лось выше, аббревиатуры методов ДОВ, КД, ЭПР, ЭСР, ЯМР являются общепринятыми и не требуют расшифровки.

Видимая и УФ-абсорбционная спектроскопия. Величина $\lg(I_0/I)$ характеризует оптическую плотность раствора; если рассеянием и отражением можно пренебречь, то эта величина практически характеризует поглощение. Если рассеяние учитывается, например, при количественной оценке клеточной плотности в культуре, следует употреблять более общий термин – пропускание (T). В других случаях используется термин «поглощение» (абсорбция, A), но не «экстинкция» или «оптическая плотность». Принятые символы: A – поглощение ($\lg(I/I_0)$), a – удельный коэффициент поглощения (л/г на 1 см), иногда используют $A^{1\%_{\text{см}}}$; ε – молярный коэффициент поглощения (численно равен поглощению 1 М раствора в кювете с длиной оптического пути 1 см), можно использовать единицы л/моль на 1 см или $\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, но не $\text{см}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$. Длины волн (нм), при которых проводилось измерение, приводят без указания единиц: A_{280} . Знак равенства не пишется между ε или A и численной величиной.

ИК-Спектры приводятся в процентах трансмиссии (T) как функция длины волны (в мкм) или частоты (в см^{-1}).

Оптическое вращение описывается величиной удельного вращения $[\alpha]_{\lambda}^t$, численно равной вращению (в градусах) в растворе с концентрацией 1 г/мл при длине оптического пути 1 дм (10 см), длине волны λ и температуре t . Необходимо указывать концентрацию раствора (г/100 мл) и растровитель, например, $[\alpha]_{420}^{27,5^\circ}$ (2 г на 100 мл метанола). Можно представлять данные в молярном выражении (молярное вращение): $[M] = [\alpha] \cdot M_r$ и $[m] = [\alpha] \cdot M_r/100$.

В случае биополимеров приводят дисперсию оптического вращения за счет усредненного остатка ($[m]_{\text{м.т.в}}$); размерность $[m]$ – град $\cdot \text{см}^2/\text{дмоль}$.

Дисперсия оптического вращения характеризуется как изменение $[\alpha]$ или $[m]$ в зависимости от длины волны или частоты.

Круговой дихроизм описывается величиной молярного адсорбционного коэффициента ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$, где ε_L и ε_R – коэффициенты поглощения света, поляризованного по кругу влево и вправо) или молярной эллиптичностью $[\theta]_M$. Для биополимеров часто используют молярные концентрации в расчете на усредненный остаток (M_r). Единицы молярного адсорбционного коэффициента – л/моль на 1 см или $\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, единицы молярной эллиптичности те же, что для оптического вращения $[m]$ в расчете на усредненный остаток; соотношение между $\Delta\varepsilon$ и $[\theta]_M$ выражается уравнением $[\theta]_M = 3300 \cdot \Delta\varepsilon$.

Флуоресцентная спектроскопия. При описании спектров возбуждения и излучения флуоресценции (F) следует указывать, является ли спектр относительным, нормализованным или скорректированным (указать способ коррекции). Данные поляризации флуоресценции и спектры описываются величиной степени поляризации P или анизотропии A , обе величины безразмерные.

Статистическая обработка результатов. Данные значительного числа независимых экспериментов должны быть представлены так, чтобы можно было оценить их воспроизводимость и значимость. Если целью работы являлось определение количественных или статистических характеристик популяции, то существенная информация обычно выражается следующим образом: 1) число независимых экспериментов (повторные измерения на одном животном или результаты, полученные из целого ряда тканей, и т.д. дают только одну независимую оценку); 2) среднее значение; 3) стандартное отклонение; коэффициент вариации стандартной ошибки в оценке среднего значения. Следует ясно указать, использовались ли стандартное отклонение или стандартная ошибка. Удобной формой включения этих данных в таблицу является, например, такая: $263 \pm 2,5 (10)$, где цифра в скобках указывает число значений, использовавшихся для подсчета среднего.

Если утверждается значимость результатов, то следует провести тест на определение значимости и оценить вероятность. Если не указано другое, подразумевается, что используется статистика для нормального распределения.

Громоздкие данные, которые трудно или невозможно привести в печатном варианте журнала (такие как большие таблицы идентифицированных белков в протеомных исследованиях), рекомендуется давать в виде приложений, которые будут доступны читателю только на интернет-сайте журнала. Текст статьи должен содержать ссылки на такие приложения.

4. Порядок работы с рукописями (рецензирование, редакционная подготовка, корректура)

4.1. Поступившей в редакцию правильно оформленной рукописи присваивается регистрационный номер и фиксируется дата поступления, о чем редакция информирует авторов по электронной почте. **Рукописи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам без рассмотрения.**

4.2. Рецензирование. При подаче рукописи авторы могут указать двух потенциальных рецензентов (ФИО, адрес электронной почты) из

числа специалистов в данной области исследований, а также тех, чье участие в рецензировании нежелательно.

Все рукописи рассматривает Ответственный ученый секретарь (Executive Editor-in-Chief) и направляет Ответственному Редактору по соответствующей конкретной области исследований; он, в свою очередь, указывает двух-трех специалистов для рецензирования рукописи. Список Ответственных Редакторов и членов редколлегии размещен на сайте журнала, а также на сайтах Biochemistry (Moscow) на порталах Pleiades и Springer.

На основании экспертных заключений редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи и в спорных случаях привлекает дополнительных рецензентов. По решению редколлегии рукопись может быть принята к публикации в представленном виде, отправлена авторам на доработку или отклонена. Основанием для отклонения рукописи являются недостаточно высокие оценки при рецензировании вследствие несоответствия профилю или уровню публикации журнала.

Рукопись, получившая высшую оценку двух независимых рецензентов, печатается со специальной пометкой «Ускоренная публикация» (срок публикации – 1–2 месяца).

В случае необходимости рукопись направляется авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, после чего она повторно рецензируется, и редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости рукописи для публикации. В начале публикуемой статьи приводятся даты первоначального поступления рукописи в редакцию, поступления после окончательной доработки и принятия к публикации.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение трех месяцев после получения авторами отзыва; в противном случае рукопись рассматривается как вновь поступившая – ей присваивается новый регистрационный номер и ставится новая дата поступления в редакцию.

В журнале принято «одностороннее слепое рецензирование» (single-blind review), т.е. авторам недоступны имена рецензентов, и редакция строго соблюдает конфиденциальность рецензентов. Все редакционные письма авторам идут за подписью Ответственного ученого секретаря журнала.

4.3. С 2003 г. редакция приступила к практике предварительной публикации рукописей (*Papers in Press*) на сайте *Biochemistry (Moscow)* (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>) до выхода в свет статьи. На сайте размещаются экспериментальные статьи на английском языке, получившие высшие оценки при рецензировании и принятые к публикации.

4.4. На всех стадиях работы с рукописями, а также для общения с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи адресу электронной почты и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

4.5. Через месяц после сдачи очередного выпуска журнала в печать редакция рассылает авторам по электронной почте корректуру статьи в виде pdf-файла и инструкцию по работе с ней.

На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если все же это необходимо, то вопрос решается редколлекцией; в крайнем случае, статья переносится в другой номер.

4.6. Мы приветствуем размещение препринтов – неопубликованных и не прошедших рецензирование рукописей – на серверах препринтов, веб-сайтах авторов или исследовательских организаций. При подаче рукописи в журнал авторы должны проинформировать редакцию о размещении препринта, включая doi и условия лицензирования. После публикации рукописи автор несет ответственность за появление на странице препринта ссылки на публикацию, включая doi и URL-ссылку на опубликованную статью.

5. Англоязычный вариант журнала

5.1. Каждый выпуск журнала готовится одновременно на русском и английском языках.

Перевод статей осуществляет группа высококвалифицированных переводчиков-биохимиков. В ходе работы у переводчиков часто возникает необходимость связаться с авторами и устранить неточности в русском тексте статьи.

Авторы, достаточно хорошо владеющие профессиональным английским языком, представляют в редакцию свой **аутентичный** перевод статьи.

5.2. Переводы редактируются английской редакцией журнала, и подготовленный текст направляется авторам для корректировки. Согласованные с авторами исправления вносятся и в русский, и в английский тексты в формате Word. На стадии pdf-корректуры не допускается замена фрагментов текста, таблиц и иллюстраций.

5.3. Статьи, прошедшие ускоренную редакционную подготовку, могут быть опубликованы в режиме Online First на сайте Springer.

5.4. После выхода журнала в свет редакция рассылает авторам оттиски русского и английского вариантов статей в виде pdf-файлов.

**СПЕЦИАЛЬНЫЙ ВЫПУСК, ПОСВЯЩЕННЫЙ
ПАМЯТИ А.Д. ВИНОГРАДОВА**

EDN: ATOVZS

Номер 8 2022 г. журнала «Биохимия» будет специализированным. Выпуск будет посвящен памяти Андрея Дмитриевича Виноградова. Специалист в области биохимии митохондрий, биоэнергетики и энзимологии, заслуженный профессор МГУ им. Ломоносова, лауреат Государственной премии СССР, член редакционной коллегии журнала А.Д. Виноградов ушел из жизни 16 марта 2021 года.

На протяжении многих лет Андрей Дмитриевич Виноградов руководил научной группой, занимающейся изучением ферментов дыхательной цепи митохондрий. В специальном выпуске «Биохимии», приуроченном к его 80-летию, будут представлены экспериментальные и обзорные статьи коллег и учеников Виноградова из разных стран.